

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Daniel Kolařík

Metodiky detekce antigen-specifických T lymfocytů ex vivo
Antigen-specific T cell ex vivo detection methods

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2016

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, 11. 08. 2016

Podpis

Rád bych vyjádřil své poděkování všem, kteří mi pomohli radou či nápadem ke zpracování bakalářské práce, jmenovitě především svému školiteli Karlu Drbalovi za vedení a podnětné připomínky.

Abstrakt: Antigen-specifické T buňky jsou zásadní složkou adaptivní imunity. Podílejí se na ochraně organismu před extracelulárními i intracelulárními patogeny i před vznikem nádorového bujení. Porucha jejich funkce může vést ke vzniku autoimunitních poruch nebo alergií. Proto je jejich detekce a případná další manipulace zásadní pro klinickou imunologii. V této práci jsou rozebrány dvě významné metody, které v současné době slouží ke studiu antigen-specifických T buněk. Jedná se o zjištění okamžitého stavu průtokovou cytometrií a o časovou detekci jednotlivých buněk v mikrojamkách. Informace získané těmito kompatibilními metodami mají potenciál pro medicínské využití jak v oblasti prevence, tak v oblastech diagnostiky a terapie relevantních lidských patologií.

Klíčová slova: antigenní peptid, buněčná imunitní odpověď, frekvence naivních prekursorů T buněk, hmotnostní cytometrie, MHC-Ig dimer, mikrojamky, nepřímá aktivace T buněk, pMHC dextramer, pMHC tetramer, pMHC pentamer, struktura TCR, T buňka

Abstract: Antigen-specific T cells are an essential component of adaptive immunity. They are involved in protection of organism against extracellular and intracellular pathogens as well as against tumor cells. A defect of their function may lead to autoimmune disorders or allergies. That is why their detection and any further manipulation are essential for clinical immunology. In this thesis, I am going to describe two important methods which are useful for studies of antigen-specific T cells. It involves analysis of static snapshot using flow cytometry and kinetic single-cell detection in microwells. The information obtained by those compatible methods is potentially useful for medical practice in both prevention as well as diagnostics and therapy of relevant human pathologies.

Key words: antigenic peptide, cell-mediated immunity, indirect T cell activation, mass cytometry, MHC-Ig dimer, microwells, naive T cell precursor frequency, pMHC dextramer, pMHC pentamer, pMHC tetramer, T cell, TCR structure,

Seznam použitých zkratk:

zkratka	český výklad	z anglického
Ag	antigen	„Antigen“
APC	antigen prezentující buňka	„Antigen Presenting Cell“
CD	předpona k označení povrchových molekul	„Cluster of Differentiation“
CyTOF	hmotnostní cytometrie	„Cytometric Time of Flight“
DAMP	molekulární znaky typické pro poškození tkáně	„Danger Associated Molecular Pattern“
DC	dendritické buňky	„Dendritic Cells“
ER	endoplasmatické retikulum	„Endoplasmic Reticulum“
GA	Golgiho aparát	„Golgi Apparatus“
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex	„Major histocompatibility complex“
MHC I	MHC glykoproteiny I. třídy	-
MHC II	MHC glykoproteiny II. třídy	-
MHC-Ig	MHC=imunoglobulinový dimer	-
M ϕ	makrofág	-
NKT	NKT buňka	„natural killer T cell“
NOD	inbrední kmen imunodeficitní myši	„nonobese diabetic“
PAMP	molekulární znaky typické pro patogenní organismy	„Patogen Associated Molecular Pattern“
pMHC	peptid-MHC komplex	-
T _c	cytotoxická T buňka	„cytotoxic T-cell“
TCR	receptor T-buněk	„T-cell receptor“
T _h	pomocná T-buňka	„helper T-cell“
Treg	regulační T-lymfocyty	-

Obsah:

Abstrakt:	iv
Klíčová slova:	iv
Abstract:	v
Key words:	v
Seznam použitých zkratk:	vi
Obsah:	vii
1. Úvod	1
1.1 Adaptivní (antigen-specifická) imunita	1
1.2 T lymfocyty	2
1.3 Typy onemocnění a role imunitního systému	2
1.4 Způsoby detekce Ag-specifických T buněk – přímé a nepřímé	4
2. T lymfocyty	5
2.1 Specifita TCR	5
2.2 TCR - VDJ rekombinace a selekční tlaky	6
3. Technologie průtokové a hmotnostní cytometrie	8
3.1 Technologie průtokové cytometrie	8
3.2 Technologie hmotnostní cytometrie	9
4. Přímá a nepřímá detekce Ag-specifických T buněk průtokovou cytometrií	11
4.1 Přímá detekce	11
4.1.1 MHC tetramery	12
4.1.2 MHC dextramery	14
4.1.3 MHC-Ig dimery	16
4.1.4 MHC pentamery	16
4.1.5 CD1 oligomery	17
4.1.6 UV-zprostředkovaná výměna peptidu v pMHC	18
4.1.7 Kombinatoriální značení	19
4.2 Nepřímá detekce	21
4.2.1 Detekce cytokinů	21
4.2.2 Degranulační testy	22
5. Analýza antigen-specifických T buněk v mikrojamkách	22
6. Porovnání současných možností dostupných technologií	24
Závěr	26
Reference	27
Reference	27
Internetové zdroje:	35

1. Úvod

1.1 Adaptivní (antigen-specifická) imunita

Adaptivní (nebo také antigen (Ag)-specifická) imunita je součástí imunitního systému vyskytující se pouze u obratlovců a některých druhů členovců. Na rozdíl od přirozené imunity je pro ni charakteristická vysoká diverzita, klonalita a imunologická paměť. Ta je zodpovědná za rychlejší a efektivnější reakci při opakovaném setkání se stejným Ag. To také vysvětluje, proč je vakcinace efektivní pro prevenci infekčních onemocnění (Smith 2012).

Adaptivní imunita nefunguje v organismu samostatně, ale spolupracuje s přirozenou imunitou. Propojení těchto dvou systémů zajišťují profesionální Ag-prezentující buňky (dále APC), mezi které patří makrofágy (dále $M\phi$) a především dendritické buňky (dále DC). V případě, že tyto buňky zaznamenají svými receptory takzvané adjuvantní látky značící ohrožení, poškození (DAMP) či látky značící přítomnost patogenního organismu (PAMP), dojde k jejich aktivaci a začnou fagocytovat (nebo v případě DC pinocytovat) antigenní materiál z okolí. Ten poté zpracují a vystaví na MHC II molekulách (z anglického „Major Histocompatibility Complex“) na svém povrchu, kde je pak k dispozici Ag-specifickým pomocným Th lymfocytům (Kindt et al., 2007, s. 14).

MHC molekuly se dělí do dvou skupin. MHC molekuly I. třídy se přirozeně vyskytují na každé jaderné buňce našeho organismu, s výjimkou spermií. Slouží k prezentaci buněčného obsahu cytotoxickým T buňkám (dále T_c), které zajišťují imunitu proti vnitrobuněčným patogenům, především virům, bakteriím a prvokům (Kindt et al., 2007, s. 198). Prezentovaný antigenní peptid rozpoznávají T buňky pomocí svého receptoru (dále TCR). Dále se na MHC I molekulu váže také CD8 koreceptor. Pokud T_c pozná na MHC I peptid, který rozezná svým T buněčným receptorem (TCR), spustí v cílové buňce apoptózu. MHC II molekuly jsou exprimovány na APC, mezi které kromě dříve uvedených patří (mimo jiné) ještě B lymfocyty, které zajišťují humorální složku imunitní odpovědi. S MHC II interagují pomocné T buňky (dále T_h) pomocí svého TCR a CD4 koreceptoru (Kindt et al., 2007, s. 35). Pokud je Ag rozpoznán a T buňka dostane zároveň od APC signál v podobě kostimulačních molekul o přítomnosti PAMP nebo DAMP v okolí, dochází k aktivaci T buňky. Ta pak prochází klonální expanzí, přičemž tyto buňky dále diferencují do dvou skupin – do efektorových T buněk a paměťových T buněk. Efektorové T buňky mají mnoho funkcí – regulují ostatní buňky imunitního systému skrze sekretované cytokiny, aktivují B lymfocyty, podílí se na imunitní reakci proti vnitrobuněčným patogenům i na protinádorové

imunitě. Paměťové T buňky jsou zodpovědné za rychlejší a efektivnější sekundární odpověď, tj reakci na opakované setkání se stejným Ag-peptidem (Kindt et al., 2007, s. 35).

1.2 T lymfocyty

T lymfocyty, jsou jedny z buněk adaptivní imunity. Jako všechny buňky hematopoetické vývojové řady vznikají v kostní dřeni, hlavní vývoj většiny pak probíhá v brzlíku a odtud pochází jejich název (z latinského „thymus“) (Smith 2012).

T lymfocyty se dají rozlišit podle svého TCR na dvě subpopulace. Tato práce je zaměřena především na $\alpha\beta$ T lymfocyty. Oba řetězce jejich TCR podléhají během zrání thymocyty výrazné přestavbě, která je rozebrána v kapitole zabývající se T lymfocyty. Tak vznikají populace T buněk s unikátní specifitou (Kindt et al., 2007, s. 226) Druhou skupinou jsou $\gamma\delta$ T lymfocyty. I u nich probíhá přestavba řetězců tvořících TCR, ale ve výrazně menší míře. Proto bývají často označovány za invariantní lymfocyty (Kindt et al., 2007, s. 227). $\gamma\delta$ T lymfocyty však nejsou stěžejní pro mou práci, a proto tvorba jejich řetězce není v práci více rozebrána.

Dále se v rámci T lymfocytů rozlišuje několik subpopulací podle jejich funkce. Většinou diferenciací cestou vznikají cytotoxické, nebo pomocné T lymfocyty (Klein et al. 2014), alternativními cestami NKT buňky a regulační T buňky (Girardi a Zajonc 2012).

1.3 Typy onemocnění a role imunitního systému

Imunitní systém zodpovídá za zachování integrity organismu. Jeho poruchy jsou tedy kritické a jejich studium u člověka je klíčové pro pochopení, diagnózu a následnou terapii významných lidských patologií (Fooksman et al. 2010). Jedná se především o infekční choroby, autoimunitní onemocnění a nádory. Tato práce je zaměřena na detekci Ag-specifických T lymfocytů, která může být zásadní pro diagnózu a následnou terapii těchto patologií. Základní princip působení těchto patologií je rozebrán v následujících odstavcích.

Jako infekční choroby jsou označovány patologie způsobené množením parazitického agens a jeho překonáním bariér v organismu. To může být rozmanitého původu, může jít o mnohobuněčné parazity, jednobuněčné prvoky nebo bakterie, viry, nebo dokonce samotné bílkoviny, označované jako priony. Tyto patogeny mohou narušovat integritu organismu na mnoha úrovních: mohou produkovat toxiny nebo fyzicky, chemicky i biologicky narušovat

strukturu nebo funkci buněk. Samotná infekce je však pouze pomnožení mikroorganismů v hostiteli, nemusí tedy způsobovat onemocnění a v mnoha případech ho také nezpůsobuje. Lidský organismus tvoří přibližně 10^{13} lidských buněk a za fyziologického stavu žije na jeho strukturách asi 10^{14} bakterií (Davis 1996). Tyto bakterie tělu neublíží, jsou označovány jako komenzální, tj. takové, které hostiteli neškodí, ale zároveň z něj mají užitek. Zároveň často komenzální mikroorganismy tělu pomáhají tím, že brání usazení jiných, patogenních mikroorganismů. Imunitní systém proto musí tyto případy odlišovat a v případě komenzálů zapojovat dráhy vedoucí k toleranci (Omenetti a Pizarro 2015). T lymfocyty se účastní této regulace i buněčné ochrany proti intracelulárním i extracelulárním patogenům. To se projevuje mimo jiné i změnami ve frekvencích jednotlivých populací. Proto je kvalitativní a kvantitativní detekce T buněk jednou z klíčových metod pro přesnou diagnózu pacienta.

Druhou skupinou poruch jsou autoimunitní onemocnění. Jde o patologie vzniklé chybnou regulací imunitního systému, při kterých tento systém napadá tělu vlastní struktury. Příčin pro tuto chybu může být více. Jednou z nich je snížená aktivita regulačních T buněk (dále Treg), a tedy častější napadání buněk jedince na periférii (Tadokoro et al. 2006). Jde o buňky se střední specifitou pro vlastní antigeny (Kindt et al., 2007, s. 406), které při správné funkci suprimují imunitní odpověď proti vlastním strukturám, například zkrácením kontaktu mezi DC a Th buňkou (Tadokoro et al., 2006). Druhou z možných příčin může být chyba v regulaci negativní selekce T buněk v brzlíku, která vede ke vzniku autoreaktivních T_c a T_h buněk s vysokou afinitou pro vlastní peptidy. (Zhang et al. 2012, s. 24). Detekce T buněk (ať už Treg, T_h , nebo T_c) specifických pro vlastní peptidy je proto klíčová pro diagnózu autoimunitních poruch.

Poslední zde více popisovanou skupinou je nádorové bujení. Nádorové bujení je jev, který vzniká při chybě v regulaci buněčného cyklu. Nádorová buňka se neomezeně dělí a kvůli nedostatku času na reparační mechanismy nabírá stále více mutací. Tím postupně ztrácí svou původní funkci a v mase nádorových buněk se hromadí buňky, které ztrácejí kontaktní inhibici i závislost na růstových faktorech a získávají schopnost unikat imunitnímu systému a apoptóze. K tomu využívají mimo jiné i regulační T lymfocyty, které umí potlačovat imunitní reakci a běžně slouží k ochraně před autoimunitními poruchami (Fooksman et al. 2010). Kromě samotného množení ovlivňují nádorové buňky i buňky ve svém okolí a dávají tak vzniknout nádorovému mikroprostředí. V tom se vyskytují regulační T buňky, které suprimují imunitní odpověď vůči nádoru (Wang 2006). Oproti tomu cytotoxické T buňky jsou schopné

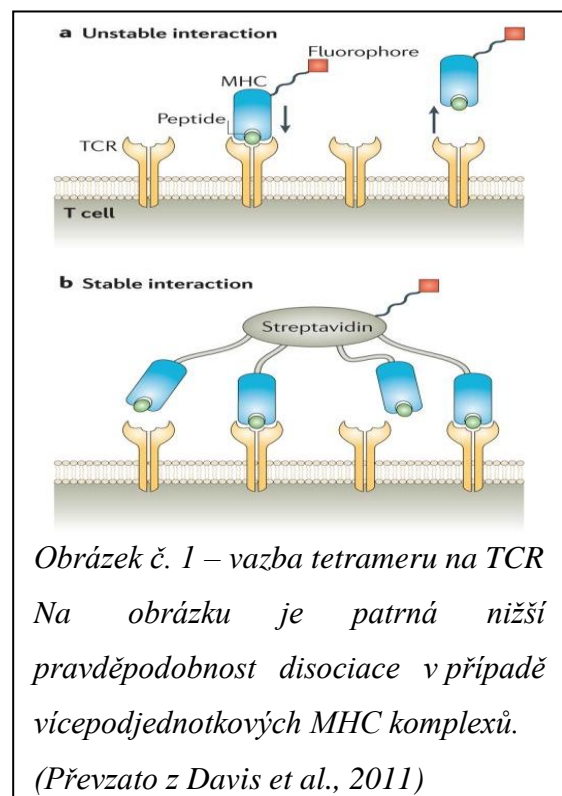
rozeznat nádorem indukovanou zvýšenou expresi některých vlastních genů i nové mutované neoepitopy (Dolton et al. 2014). Proto je možnost detekce jejich specifity a pochopení principu jejich aktivace klíčová pro zajištění efektivní imunoterapie.

1.4 Způsoby detekce Ag-specifických T buněk – přímé a nepřímé

T lymfocytů koluje v krevním řečišti obrovské množství. Vzhledem k výrazné diverzifikaci využívající somatické mutace (viz níže) se však jednotlivé Ag-specifické populace vyskytují v nízkých frekvencích – například antigen-specifické T_h buňky se v krvi vyskytují ve frekvencích od 1:1 000 (krátce po imunizaci) až po 1:100 000, naivní T buňky dokonce ve frekvenci okolo 1:1 000 000 (Nepom 2012). Proto bylo nutno vyvinout metody, které jsou schopny i tyto nepatrné koncentrace zaznamenat. Tyto metody jsou schopny sledovat velká množství buněk, ale zároveň je snaha zvýšit i množství parametrů zaznamenaných na buňku. Tato práce se věnuje především jedné z těchto technik, kterou je průtoková cytometrie (Newell a Davis 2014) a dále také technice využívající destičky s mikrojamkami (Varadarajan et al. 2012).

Jedním ze způsobů, kterými lze určit specifita T buněk pro určitý antigen, je značení jeho TCR pomocí MHC molekul s navázaným peptidem (dále pMHC komplex). Sílu vazby mezi receptorem a ligandem udává afinita (veličina odvozená od rovnovážné konstanty K_a). Vazba mezi pMHC a TCR bývá ovšem často slabá a nestálá (afinita je nízká), poločas disociace je často nižší než minuta, proto se běžně používají multivalentní pMHC oligomery (Newell a Davis 2014). Takto vzniká stabilnější vazba, jejíž sílu měříme jako aviditu (ta je dána afinitou jednotlivých receptorů a ligandů, a zároveň i počtem vazebných míst, které se současně uplatňují – valencí).

Mezi používané oligomery patří pMHC-Ig dimery, pMHC pentamery, pMHC dexamery a dodnes nejpoužívanější pMHC tetramery (viz obrázek č. 1). Značení TCR pomocí pMHC



oligomerů nazýváme přímou detekcí nebo také přímým značením. Použité oligomery na sobě mají navázanou sondu, kterou následně detekujeme. Touto sondou může být fluorofor, nebo v případě hmotnostní cytometrie atom kovu.

Druhým způsobem určení T buněčné antigenní (Ag) specifity je měření vlastností buněk po jejich aktivaci. Jde především o značení cytokinů a diferenciacích markerů (Bacher a Scheffold 2013). Tyto je možné detegovat jako intracelulární markery, pokud v buňkách po jejich aktivaci inhibujeme exocytózu, nebo jako membránové proteiny při využití jiných technik. Samotnou aktivaci T buněk můžeme vyvolat podle potřeby pomocí antigenů od úrovně proteinů až po lyzáty patogenů (Bacher a Scheffold 2013).

2. T lymfocyty

Každý T lymfocyt musí být svým TCR schopen rozeznat a vázat jen několik různých komplexů pMHC s různou afinitou k peptidu. Pro T buňky je tato vazba zásadní, ovlivňuje totiž většinu fází jejich diferenciaci, viz kapitola 2.1. Pro zralé T lymfocyty je na ní závislá konečná diferenciaci a proliferace. Vazba určuje výslednou buněčnou i látkovou odpověď, díky níž mohou T lymfocyty reagovat na patogeny i na nádorová onemocnění (Dustin 2014). V průběhu zrání thymocytů tato vazba určuje, jestli následně projdou diferenciací do běžných CD4⁺ T buněk nebo CD8⁺ T buněk, nebo alternativní diferenciací cestou vedoucí například k regulačním T buňkám nebo NKT buňkám. Pro většinu nezralých thymocytů (progenitorů T lymfocytů v brzlíku) je ovšem tato vazba signálem pro zahájení apoptózy (Klein et al. 2014).

2.1 Specifita TCR

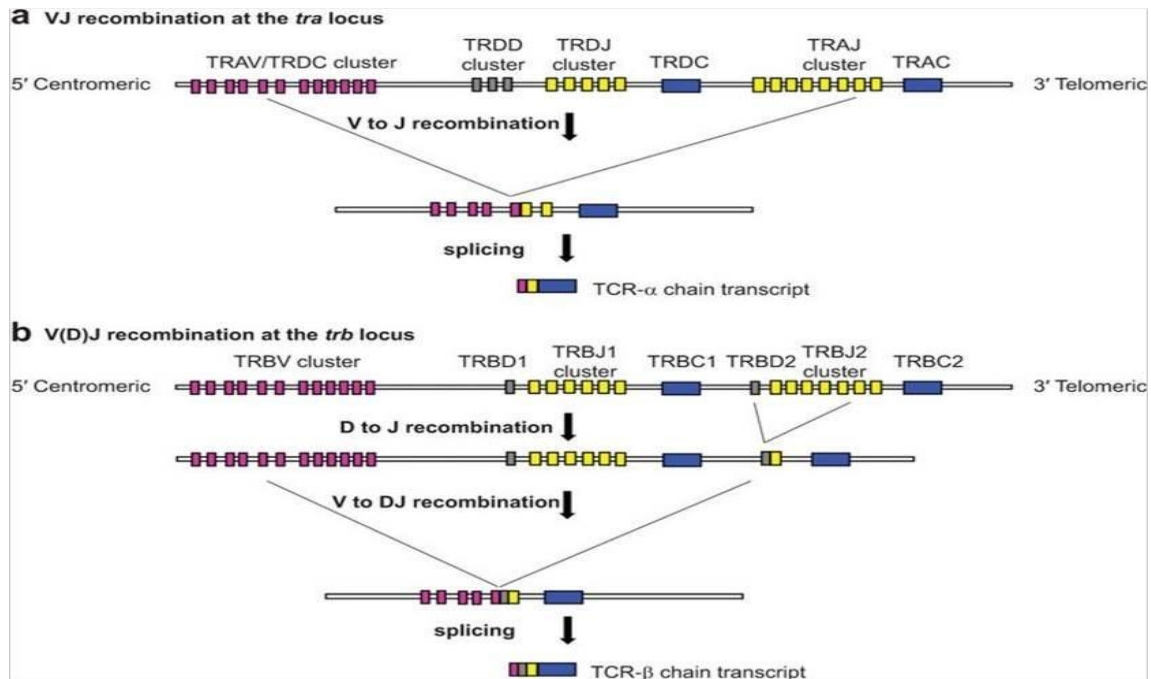
Oproti protilátkám, které jsou tvořeny B lymfocyty, TCR má výrazně omezenější možnosti vazby, i přes určitou strukturní homologii vazebního místa. Zatímco protilátky jsou schopny vázat jak proteinové úseky, tak uhlovodíky, malé organické částice a dokonce i samotné nukleové kyseliny, receptory T buněk běžně interagují s antigenem navázaným na jednu specifickou MHC molekulu I. nebo II. třídy (Bjorkman 1997). K interakci s MHC molekulou I. třídy potřebuje T_c krom TCR i CD8 koreceptor, v případě MHC molekuly II. třídy využívá T_h CD4 koreceptor.

2.2 TCR - VDJ rekombinace a selekční tlaky

Abychom pochopili variabilitu T buněk, musíme pochopit několik procesů vedoucích k jejich vzniku. V brzlíku thymocyty procházejí diferenciací a působí zde na ně postupně několik selekčních tlaků. Prvním z těchto selekčních tlaků je beta-selekce, proces, kdy jsou selektovány buňky, které mají vzájemně kompatibilní pre- α řetězec s β řetězcem, dohromady tvořící preTCR (Westernberg et al. 2016). β řetězec v průběhu diferenciaci podstupuje VDJ rekombinaci a následně α řetězec VJ rekombinaci, což jsou procesy, během nichž jsou z jejich kódovacích sekvencí vystřiženy některé úseky DNA. Dochází k nevratné změně na úrovni DNA, během které se náhodně spojí jeden z V („variable“) úseků s jedním z J („joining“) úseků v případě α řetězce (Ebert et al. 2013). V případě β řetězce se ještě mezi těmito úseky vyskytuje několik D („diversity“) úseků, z nichž se opět náhodně jeden spojí nejdříve s J segmentem během tzv. DJ rekombinace a následně se tento úsek spojí s náhodným V úsekem (viz. obrázek č. 2). Žlábek, do kterého se váže peptid, je poté tvořen dvěma CDR3 smyčkami, dvěma CDR2 smyčkami a dvěma CDR1 smyčkami (Bjorkman 1997).

Druhým selekčním tlakem v brzlíku je pozitivní selekce na základě rozpoznání vlastní MHC molekuly. Pro organismus je důležité rozpoznat vlastní MHC. Právě ty totiž budou prezentovat antigeny zralým T lymfocytům, a to včetně informace, odkud antigen pochází – jestli je vnitrobuněčný, nebo extracelulární. Proto jen takové T buňky, jejichž TCR rozpoznají vlastní MHC v brzlíku následně v rámci pozitivní selekce aktivně proliferují. Ostatní později procházejí tzv. smrtí zanedbáním (z anglického „death by neglect“). Každá T buňka musí být svým receptorem schopná rozpoznat pouze peptid navázaný na jeden z produktů vlastních MHC alel. Tomuto jevu se říká MHC-restrikce (Kindt et al., 2007, s. 207).

Byl zde předpoklad, že za specifitu pro MHC molekulu jsou zodpovědné smyčky CDR1 a CDR2, zatímco CDR3 smyčky rozpoznávají na MHC navázaný peptid. Pokusy v této oblasti ale naznačily, že na obou interakcích výrazně spolupracují všechny smyčky (Burrows et al. 2010).



Obrázek č. 2: Somatická rekombinace obou řetězců $\alpha\beta$ TCR.

V horní části obrázku je zobrazena V-J rekombinace a řetězce včetně RNA sestřihu, v dolní části je zobrazena nejprve D-J rekombinace, V-DJ rekombinace a nakonec opět sestřih RNA, podle kterých jsou pak tvořeny vlastní podjednotky TCR.

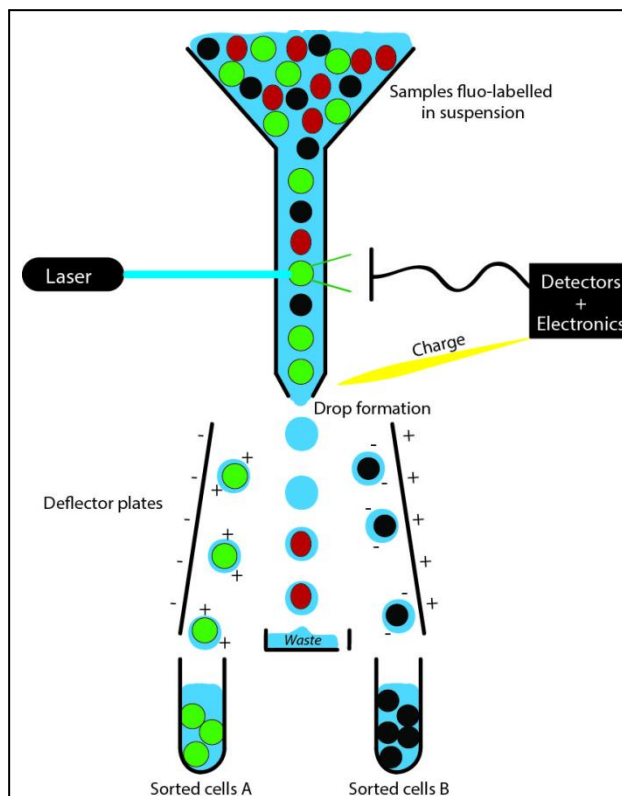
(převzato z Attaf et al. 2015)

Třetím selekčním tlakem působícím na T lymfocyty v brzlíku je negativní selekce. V brzlíku se vyskytují medulární thymové epitelární buňky, jejichž úkolem je exprimovat a vystavovat na svých MHC I. a II. třídy ohromné množství proteinů včetně takových, které jsou jinak tkáňově specifické (St-Pierre et al. 2013). Pokud T lymfocyt peptid z takového proteinu svým TCR rozpozná, je eliminován a podstupuje apoptózu (Klein et al. 2014). Tento systém tedy brání vzniku autoreaktivních T-lymfocytů a tím do určité míry i rozvoji autoimunitních onemocnění (Zhang et al. 2012).

3. Technologie průtokové a hmotnostní cytometrie

3.1 Technologie průtokové cytometrie

T-lymfocytů je v periferní krvi obrovské množství - například CD4+ T buněk je v 1 μ l periferní krve 350-1400, CD8+ T buněk v tomtéž objemu 200-1100, obě čísla se však značně liší mezi etniky (uvedená čísla vychází z výzkumu obyvatelů Keni (Bosire et al. 2013)). Zároveň mají tyto buňky obrovskou variabilitu, jednotlivé antigen-specifické buňky se vyskytují v koncentracích mezi 1:1 000 a 1:1 000 000 (Nepom 2012). Proto je nutné využívat metody, které jsou v takto ohromném množství buněk schopné detekovat i buňky v takto nízkých frekvencích. K tomuto účelu v dnešní době slouží především průtoková cytometrie. Jde o metodu, při které buňky specificky fluorescenčně označíme a následně necháváme suspenzi buněk protékat kyvetou. Aby technologie fungovala, musíme zajistit, aby v jednom okamžiku procházela vždy pouze jedna buňka, a tu během průchodu detekujeme. Abychom získali komplexní informace, je třeba sledovat větší množství charakteristik zároveň, proto se stále významně rozvíjejí techniky značení.



Obrázek č. 3: průtokový cytometr a „sorter“
Na obrázku je znázorněn průtokový cytometr se schopností třídit buňky podle jejich fluorescence. V horní části je nádoba s fluorescenčně značenými buňkami. Z ní vede dolů kyveta široká právě tak, aby jí mohly buňky protékat, ale aby se do ní nevešlo více buněk vedle sebe. Vlevo od kyvety se nachází laser a vpravo detektor, který zaznamenává fluorescenci protékajících buněk. Zároveň dává signál přístrojům, které buňce podle její charakteristiky udělují náboj. Ten rozhoduje o tom, do které baňky buňka přijde.
(převzato z <http://www.unifr.ch/pathology/en/facs>)

Dnešní průtoková cytometrie zaznamenává až 20 parametrů na buňku (Chattopadhyay a Roederer 2012), podle některých zdrojů dokonce až 50 parametrů na buňku (<https://www.bd.com/press/2016/BD-Launches-BD-FACSymphony-High-Speed-Cell->

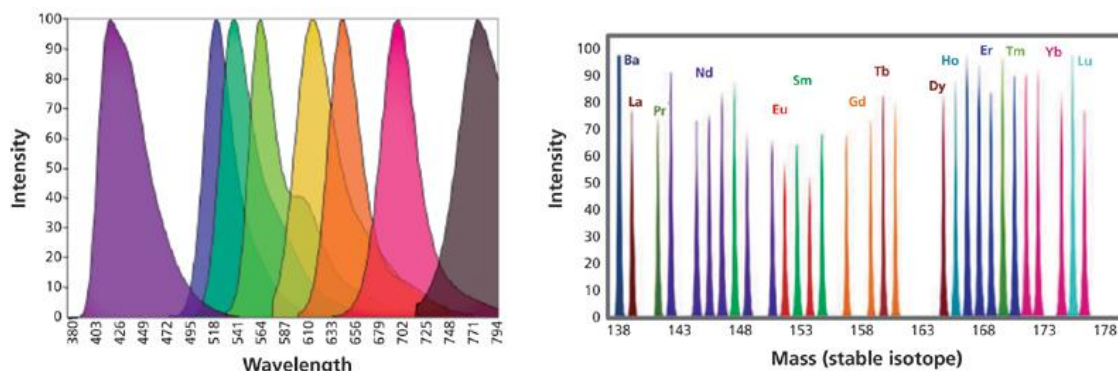
Analyzer-to-Enable-Identification-and-Analysis-of-Rare-Cell-Types.aspx) a je schopná detekovat 10 000 buněk za sekundu (Newell a Davis 2014), komerční firmy uvádějí rychlost až 70 000 buněk za sekundu (<http://www.beckman.com/getattachment/31e6cb91-c607-4cef-a0252565d48cc1ba/CyAn%20ADP%20Analyzer%20-%20Brochure>). Klasická průtoková cytometrie má určitá omezení. Ty jsou způsobeny například optickými vlastnostmi fluoroforů. Pokud navýšíme množství fluoroforů, zvyšuje se jejich spektrální překryv a to nám ztěžuje interpretaci výsledků. Zároveň v každé buňce dochází v určité míře k autofluorescenci, která vytváří jistý šum pozadí. Proto se běžně používá jen 8-10 fluoroforů (Chattopadhyay a Roederer 2012). Velkou výhodou průtokové cytometrie oproti ostatním metodám je možnost takzvaného „sortingu“, tedy třídění buněk do několika skupin podle určitých parametrů, viz obrázek č. 3 (Chattopadhyay a Roederer 2012).

3.2 Technologie hmotnostní cytometrie

Jako alternativa klasické průtokové cytometrie byla vyvinuta technologie, která nahrazuje fluorofory těžkými kovy většinou ze skupiny lanthanoidů. Tato metoda je založená na principu hmotnostní spektrometrie a nazývá se hmotnostní cytometrie, nebo také CyTOF a umožňuje zaznamenávat až 37 parametrů. (Bendall et al. 2011).

Pro značení jsou využívány protilátky nebo pMHC komplexy. pMHC komplexy mají těžké prvky navázány na streptavidinovou kostru (Newell et al. 2013), na protilátky jsou přes polymer kyseliny akrylové navázány chelátory, např. diethylen triamin pentaoctová kyselina, které nesou izotopy kovů. Jedna protilátka váže dva až čtyři polymery, na každém polymeru je navázáno až 30 izotopů. Těmito protilátkami poté intracelulárně i extracelulárně značíme aktivovanou T buňku. Poté jsou buňky v podobě jednobuněčných kapiček nastříkány do indukčně vázané argonové plazmy a zde jsou při 7000 °C vaporizovány (Davis et al. 2011). Ionizované atomy kovů v této podobě prochází hmotnostním spektrometrem, kterým je nahrazen světelný detektor z průtokové cytometrie (Chattopadhyay a Roederer 2012). Hmotnostní spektrometr je schopen stanovit a kvantifikovat prvkové složení a tím i ony těžké prvky. Aktuálně jsme takto schopni měřit 1000 buněk za sekundu (Bendall et al. 2011). Velkou výhodou oproti tradiční průtokové cytometrii je absence šumu pozadí. Ačkoliv v buňce běžně dochází k autofluorescenci, těžké prvky jako lanthanoidy se v ní nevyskytují, a tak je při správně provedeném experimentu výrazně snižena pravděpodobnost falešně

pozitivních výsledků. Proto má tato metoda potenciál pro vysokou senzitivitu (Chattopadhyay a Roederer 2012). Další velkou výhodou je, že hmotnostní spektra zaznamenané spektroskopem se nepřekrývají a dávají nám tak jasný signál (viz obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Srovnání spekter průtokové a hmotnostní cytometrie

Na obrázku je zabrázený rozdíl mezi spektry průtokové (vlevo) a hmotnostní (vpravo) cytometrie. Je na něm patrný překryv spekter v případě průtokové cytometrie - tedy důvod proč zvyšování počtu parametrů komplikuje interpretaci dat.

(převzato z <http://www.spectroscopyonline.com/mass-cytometry-evolution-icp-ms-enabling-novel-insights-single-cell-biology>)

Tým okolo Garyho Nolana experimentálně srovnával metodu CyTOF s fluorescenční cytometrií. Pro porovnání použili devítiparametrovou analýzu. Z výsledků bylo patrné, že tyto metody dávají stejně validní výsledky, pouze v případě tradiční průtokové cytometrie byla potřeba korekce pro spektrální překryv fluoroforů a poté druhá korekce na odfiltrování šumu pozadí (Bendall et al. 2011).

Ze 37 lanthanoidů, které Bjornson et al. využívali, jsme schopni 27 purifikovat z 97 % a zbylých 10 z 92 %. Při těchto výsledcích musíme zajistit, aby se nečistoty, mezi kterými mohou být i jiné lanthanoidy, nenašly místo izotopů na protilátku a nevznikaly tak falešně pozitivní výsledky (Bjornson et al. 2013). Další nevýhodou je, že některé lanthanoidy mají sklon k oxidaci, což pak ovlivňuje jejich signál a stávají se tak zaměnitelné se signálem jiného izotopu, např. praseodymium 141 ve stavu +16 elementárních nábojů je zaměnitelné za gadolinium 157 (Bjornson et al. 2013).

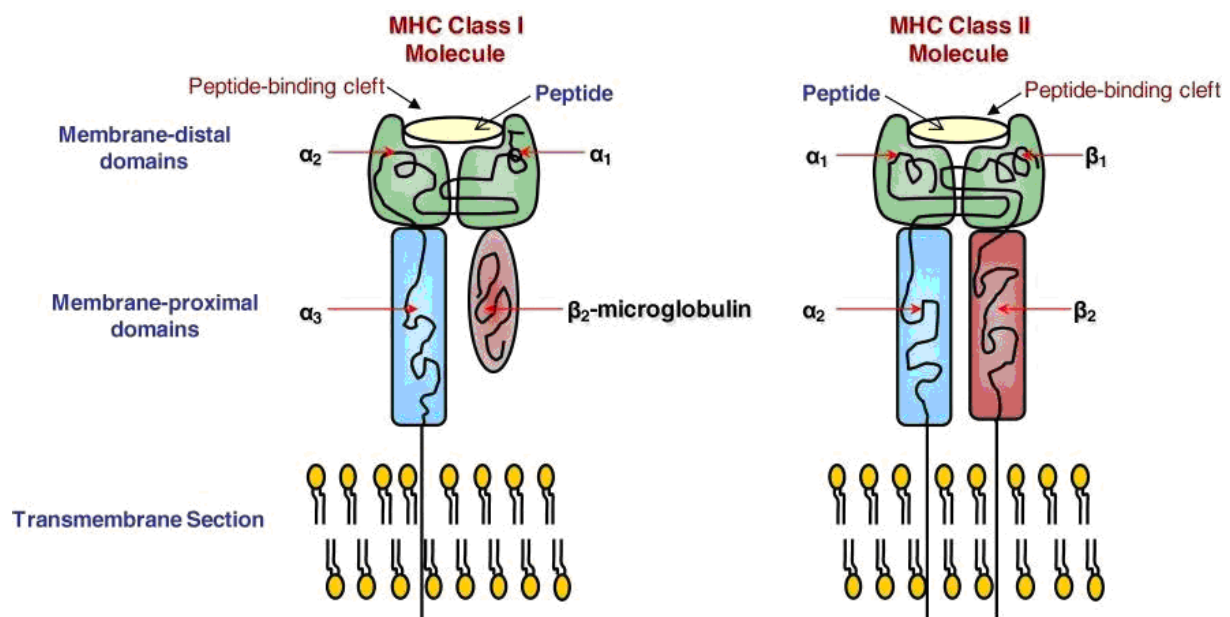
Metoda CyTOF umožňuje i další navýšení měřených parametrů, např. za využití ušlechtilých kovů. Byly prováděny pokusy s paládiem a platinou. Oba prvky mají šest stabilních izotopů. Přestože se povedlo tyto izotopy navázat na protilátky, jejich přítomnost však ovlivňovala schopnost protilátky rozeznat antigen (Majonis et al. 2011). Přesto bylo

později všech šest stabilních izotopů palladia úspěšně použito ve výzkumu (Mingueneau et al. 2014).

4. Přímá a nepřímá detekce Ag-specifických T buněk průtokovou cytometrií

4.1 Přímá detekce

Přímým značením chápeme značení Ag-specifického TCR na T buňkách pomocí pMHC oligomerů. Ty mají oproti monomerním výhodu v podobě zvýšené avidity k TCR specifickým pro daný antigen, který je na všech MHC podjednotkách navázán. Nevýhodou je potřeba přípravy oligomerů jedné z MHC alel, kterou T buňky studovaného jedince rozeznávají. V této oblasti probíhá v posledních letech velmi aktivní výzkum.



Obrázek č. 5: Schématické znázornění MHC molekul I. a II. třídy.

Na obrázku jsou schématicky znázorněny molekuly I. a II. třídy včetně základních rozdílů mezi nimi. V případě MHC molekuly I. třídy je vazebné místo tvořeno pouze α řetězcem, zatímco v případě MHC II se na vazbě peptidu podílejí oba řetězce α i β . Dále mají MHC molekuly I. třídy pouze jednu transmembránovou doménu, zatímco MHC II dvě.

(převzato z McCarty et al. 2010)

MHC molekuly I. i II. třídy jsou heterodimery. Přesto se však výrazně liší v mnoha parametrech. MHC molekuly I. třídy mají vazebný žlábek tvořený pouze doménami α -podjednotky a β_2 -mikroglobulin tvoří pouze určité lešení. Žlábek mezi doménami α -řetězce váže peptidy o osmi až deseti aminokyselinách (Rossjohn et al. 2015). MHC molekuly II. třídy mají žlábek pro vazbu antigenního peptidu mezi α - a β -podjednotkou (Rossjohn et al. 2015). V něm jsou schopny vázat peptidy o více než jedenácti aminokyselinách (Rossjohn et al. 2015). Obě molekuly jsou schématicky znázorněny na obrázku č. 5 (McCarty et al. 2010).

4.1.1 MHC tetramery

Už od vzniku metod přímé detekce pomocí oligomerů se využívají biotinylované rekombinantní MHC molekuly, které se váží na streptavidin, případně avidin (Altman et al. 1996). Výhodou tetramerů je jejich dostatečná avidita pro interakci a následný vznik stabilní vazby (Kurtulus a Hildeman 2013). MHC molekuly vznikají v buňce za pomoci chaperoninů. Peptid, který nesou, pochází z cytoplazmy štěpením v proteazomu.

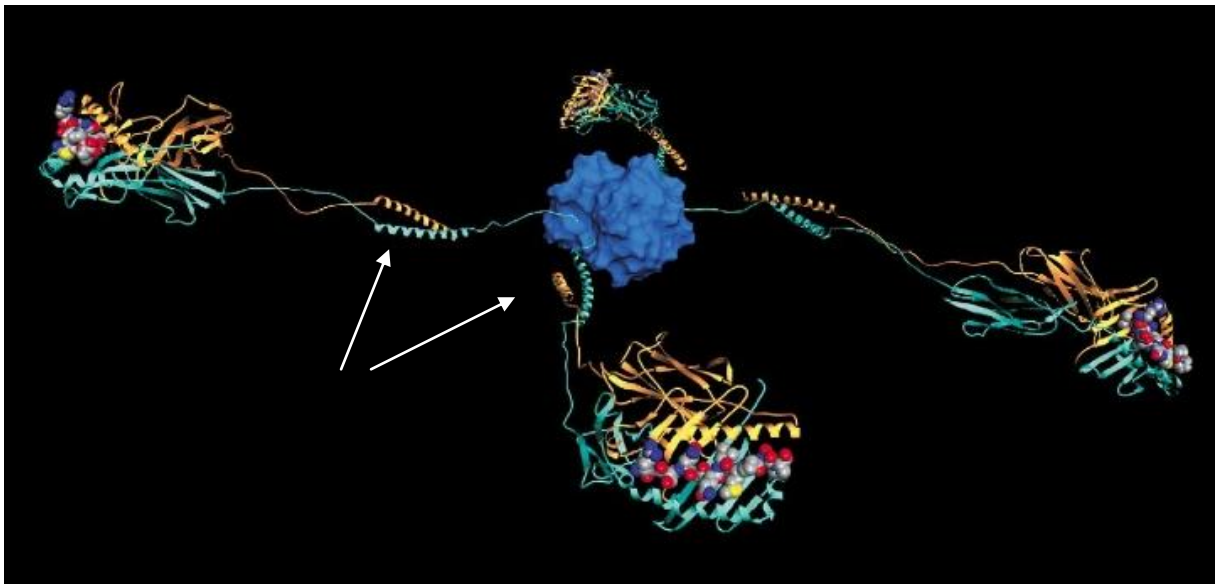
V laboratoři se podjednotky MHC molekuly I. třídy vytváří jako rekombinantní α -řetězec a β -mikroglobulin v bakteriích (Svitek et al. 2014). Ty se následně společně s peptidem našeho zájmu *in vitro* složí do funkční pMHC molekuly I. třídy. Ta je v dalším kroku specificky biotinylována na α -řetězci.

MHC molekuly II. třídy jsou také heterodimery, ale pokusy sestavit monomer MHC II složením jejich α a β řetězce neměly dlouho jednotné výsledky (Cecconi et al. 2008). Jejich schopnost *in vitro* složení heterodimeru z α a β monomerů je výrazně nižší. Proto se na rozdíl od MHC molekul I. třídy jejich skladba neprovádí *in vitro* ale přímo v buňkách hmyzích vektorů (Kurtulus a Hildeman 2013). Často se také MHC molekula II. třídy stabilizuje pomocí leucinového zipu mezi α a β -podjednotkami (Kalandadze et al. 1996). V případě MHC molekul II. třídy se využívá k biotinylaci β -řetězec, jak je patrné na obrázku č. 6.

Dále je biotinylovaný pMHC monomer navázán na streptavidin značený fluoroforem, např. fykoerytrinem nebo alofykocyaninem (Massilamany et al. 2015). Streptavidin má 4 biotin-vazebná místa, takže těmito technikami dochází ke vzniku tetrametrických barvicích činidel, zvaných MHC tetramery. Ty poté mohou být použity pro kvantifikaci antigen-specifických T lymfocytů v různých tkáních (Kurtulus a Hildeman 2013).

Vlastní navázání peptidu na MHC molekulu II. třídy lze provést vícero způsoby. Jedním z nich je kovalentní vazba peptidu na N- konec β -řetězce MHC molekuly. Hlavní výhodou této metody je stabilita výsledného pMHC II, nevýhodou ovšem je, že vzhledem ke

kovalentní vazbě nelze tyto MHC molekuly II. třídy recyklovat a tím pádem je potřeba vytvořit vlastní pMHC pro každý peptid, který chceme T buňkám jedince s určitým MHC haplotypem prezentovat. Druhou metodou je výroba samotného rozpustného MHC II. Peptid se v tomto případě neváže v okamžiku sestavení MHC molekuly II. třídy z α a β -podjednotky, ale později nekovalentně. Nevýhodou je nižší stabilita tohoto komplexu, výhodou je možnost využít MHC molekuly II. třídy pro další pokusy s jinými peptidy (Massilamany et al. 2015). Třetí metoda kombinuje tyto dva přístupy a tvoří rozpustné MHC molekuly II. třídy s asociovaným invariantním peptidovým řetězcem. Ten obsahuje místo pro štěpení thrombinem a může být po detekci T buňky odštížen. Zbylý peptidový úsek lze následně enzymaticky nahradit novým, nerozštěpeným, a takto MHC molekuly II. třídy recyklovat (Day et al. 2003).



Obrázek č. 6: MHC II tetramer

Na obrázku je zobrazen molekulární model MHC II tetrameru. Centrální molekula streptavidinu je zobrazena modře, β -řetězec zeleně a α -řetězec žlutě. Atomy uhlíku v prezentovaném antigenním peptidu jsou zobrazeny šedě. V blízkosti streptavidinu jsou patrné leucinové zipy (α -helixy), které pomáhají držet oba řetězce MHC II molekuly pohromadě (viz bílé špičky).

(Upraveno podle Kwok et al. 2002)

Vlastní navázání peptidu na MHC molekulu II. třídy lze provést vícero způsoby. Jedním z nich je kovalentní vazba peptidu na N- konec β -řetězce MHC molekuly. Hlavní výhodou této metody je stabilita výsledného pMHC II, nevýhodou ovšem je, že vzhledem ke

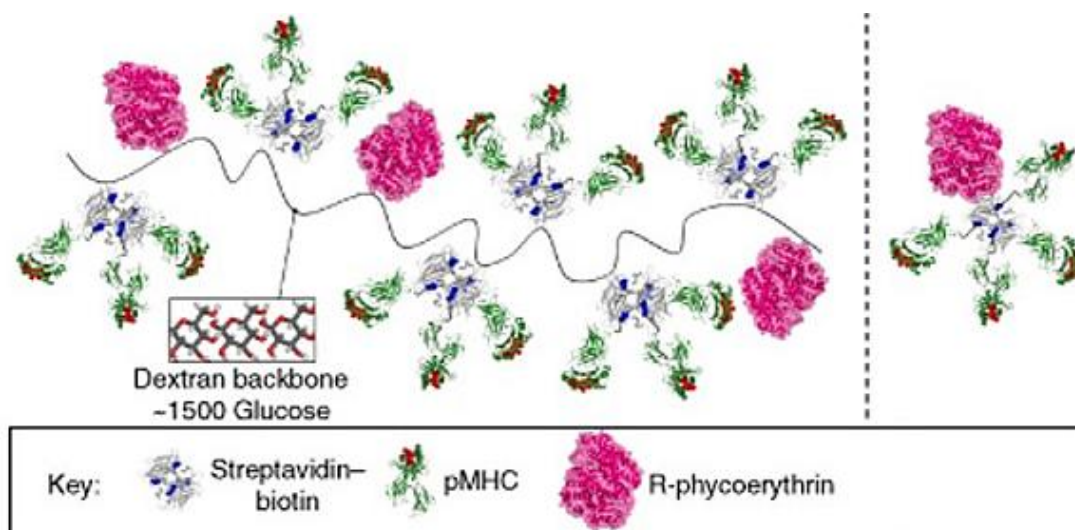
kovalentní vazbě nelze tyto MHC molekuly II. třídy recyklovat a tím pádem je potřeba vytvořit vlastní pMHC pro každý peptid, který chceme T buňkám jedince s určitým MHC haplotypem prezentovat. Druhou metodou je výroba samotného rozpustného MHC II. Peptid se v tomto případě neváže v okamžiku sestavení MHC molekuly II. třídy z α a β -podjednotky, ale později nekovalentně. Nevýhodou je nižší stabilita tohoto komplexu, výhodou je možnost využít MHC molekuly II. třídy pro další pokusy s jinými peptidy (Massilamany et al. 2015). Třetí metoda kombinuje tyto dva přístupy a tvoří rozpustné MHC molekuly II. třídy s asociovaným invariantním peptidovým řetězcem. Ten obsahuje místo pro štěpení thrombinem a může být po detekci T buňky odštěpen. Zbylý peptidový úsek lze následně enzymaticky nahradit novým, nerozštěpeným, a takto MHC molekuly II. třídy recyklovat (Day et al. 2003).

Tyto technologie jsou využívány pro studium mnoha patologií. Příkladem mohou být alergie (DeLong et al. 2011), infekční choroby (Chattopadhyay et al. 2013), autoimunitní onemocnění (Raddassi et al. 2011), (Mattapallil et al. 2011), nádorová onemocnění (Poli et al. 2013). Dále se využívají pro vývoj proteinové terapeutiky tak, aby byla proteinová léčiva co nejméně imunogenní (Nepom 2012). V dnešní době se vývojem i syntézou MHC tetramerů zabývá několik vědeckých i komerčních pracovišť. Mezi ty významné patří NIH Tetramer Core Facility a firma Proimmune.

4.1.2 MHC dextramery

Technologie MHC tetramerů velmi přispěla našemu poznání o pomocných i cytotoxických T lymfocytech. MHC I tetramery mají k TCR $CD8^+$ T lymfocytů většinou dostatečnou aviditu, a tak nebývá problém v jejich využití pro značení $CD8^+$ buněk. Přesto však, především v případě autoreaktivních a protinádorových T buněk, nemusí být jejich avidita dostatečná (Dolton et al. 2014). Proto byla vyvinuta metoda tvorby oligomerů vyšších řádů, tzv. MHC I dextramerů (viz obrázek č 7). Ta je založena na navázání biotinylovaných pMHC molekul I. třídy na streptavidin vázaný k dextranu. Dextran je polymer α -D-glukózy s vazbami mezi podjednotkami v řetězci 1,6 a větvením 1,3. Na něj je navázáno několik molekul streptavidinu, na který se zase váží biotinylované pMHC molekuly I. třídy. Tím se zvyšuje valence MHC molekul I. třídy a tím pádem má částice ještě vyšší aviditu než samotný MHC tetramer (Dolton et al. 2014).

Totéž platí i pro značení $CD4^+$ T buněk. I v tomto případě mají dextramery potenciál tetramery do budoucna nahradit, minimálně v oblasti autoreaktivních T_h buněk (Massilamany et al. 2011). MHC II dextramery nesou oproti MHC II tetramerům větší množství MHC molekul II. třídy, až 20 na molekulu dextranu. Na ten jsou biotinylované pMHC molekuly II. třídy navázány přes několik skupin streptavidinu (Dolton et al. 2014).



Obrázek č. 7 – Srovnání pMHC dextramerů a tetramerů

Na obrázku je schématicky zobrazená struktura pMHC dextramerů a pro srovnání je v pravé části obrázku strukturní zobrazení pMHC tetrameru. Z obrázku je patrné, že na jednu molekulu pMHC dextrameru připadá hned několik komplexů streptavidin-pMHC a zároveň i několik molekul fluoroforu.

(upraveno podle Dolton et al. 2014)

MHC II dextramery se aktuálně jeví jako vhodnější barvicí činidlo než tetramery, minimálně pro barvení nízkoafinních TCR. Vykazují oproti nim vyšší senzitivitu i specifitu, viz Box č. 1 (Dolton et al. 2014). Bylo zjištěno, že většina buněk značených pomocí MHC II dextramerů neprodukovala cytokiny. Z toho lze usuzovat, že značení T buněk pomocí MHC dextramerů tyto buňky většinou neaktivuje, a můžeme tedy tyto T buňky studovat ve stavu blízkému tomu, v jakém se nacházely v krvi (Massilamany et al. 2015).

Vzhledem k tomu, že se stále jedná o relativně novou technologii, vyrábí v dnešní době dextramery jen komerční firma Immudex. I přesto jsou již vyvíjené MHC II dextramery pro klinické použití, např. na pacientech s roztroušenou sklerózou (Raddassi et al. 2011).

Box č. 1 – Analytická senzitivita a specifita

Analytická senzitivita je veličina, která udává minimální množství analytu, které jsme touto metodou schopni detekovat.

Analytická specifita určuje, nakolik přesně test rozlišuje mezi analytem a ostatními složkami.

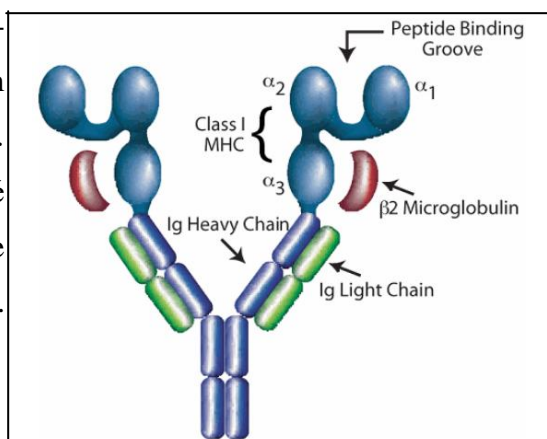
(Gaw 2008, s. 6)

4.1.3 MHC-Ig dimery

MHC-imunoglobulinové dimery (dále MHC-Ig dimery) nejsou na rozdíl od předchozích oligomerů založeny na streptavidinové kostře. V podstatě se jedná o dvě MHC molekuly spojené přes konstantní část protilátky, na kterou je navázána fluorescenční značka (Fahmy et al. 2002). Komplex je znázorněn na obrázku č. 8.

V dnešní době jsou pro značení upřednostňovány ostatní multimery. Dimery se ale využívají dále pro jejich schopnost ovlivnit aktivační stav T buněk. Byly provedeny pokusy, které dokázaly, že dimery jsou schopné spustit aktivaci a expanzi antigen-specifických T buněk *in vivo*. Takto aktivované T lymfocyty poté byly schopny inhibovat růst nádoru (Schütz et al. 2014). Naopak při použití nízkých koncentrací MHC II-Ig dimerů (1,2 nM) byly tyto dimery schopny suprimovat autoimunitní T buňky. Takto

byly MHC-Ig dimery využity pro výzkum imunoprese autoreaktivních CD4+ T buněk. Pokusy byly prováděny na myších s experimentální autoimunitní encefalomyelitidou. Jedná se o experimentální model pro terapii roztroušené sklerózy. Autoimunitní T buňky se takto povedlo potlačit z 90% (Gong et al. 2012). Obdobně byly provedeny pokusy na využití MHC-Ig dimerů pro potlačení reakce proti štěpu při transplantacích (Wigina a Jeza 2015).



Obrázek č. 8: MHC-Ig dimer
Na obrázku je MHC-Ig dimer. Imunoglobulin je zobrazen v dolní části, jeho těžké řetězce jsou znázorněny modře (Ig Heavy Chain), lehké řetězce zeleně (Ig Light Chain). Na imunoglobulin jsou navázány 2 α řetězce MHC molekuly I. třídy (světlejší modrá), na které je nekovalentně vázaný β_2 mikroglobulin.
(Převzato z <http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/551263.pdf>)

4.1.4 MHC pentamery

Druhou skupinou oligomerů nezaložených na streptavidinové kostře jsou MHC I pentamery firmy ProImmune (<https://www.proimmune.com>). Podjednotky MHC I pentameru jsou propojeny prostřednictvím coiled coil domény, na kterou jsou pak navázány fluorescenční značky. Struktura pentameru MHC molekuly I. třídy je zobrazena na obrázku č. 9.

MHC I pentamery se využívají pro značení CD8⁺ T buněk. Oproti streptavidinovým MHC tetramerům mají výhodu vyšší avidity, protože všechny peptid vazebné domény všech jejich podjednotek směřují na CD8⁺ buňku, zatímco tetraedrická struktura založená na streptavidinu umožňuje pouze tři. Mimo to mohou nést až pět fluoroforových molekul, na rozdíl od tetramerů, které jsou schopné nést pouze jednu molekulu fluoroforu. Firma ProImmune udává detekční limit pentamerů MHC molekul I. třídy 0,02 % lymfocytů (https://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=pentamer_info).

MHC I pentamery byly využity ke značení CD8⁺ T buněk pro studium mnohých patologií. Byla pomocí nich zkoumána například spjitost mezi aktuální fází infekce viru Epstein-Baarové a aktivitou T buněk při roztroušené skleróze (Angelini et al. 2013), nebo *ex vivo* expanze cytotoxických T buněk specifických pro antigeny HIV (Chapuis et al. 2011).



Obrázek č. 9 – MHC I pentamer
V horní části je modře zobrazena peptid-vazebná doména s červenými peptidy. Modrozelenou barvou je označena coiled-coil doména, na kterou jsou v dolní části obrázku navázány fluorofory, znázorněné fialově.

(Převzato z https://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=pentamer_info <https://www.proimmune.com>)

4.1.5 CD1 oligomery

CD1 molekuly patří mezi neklasické MHC molekuly I. třídy. Slouží k prezentaci vnitrobuněčných glykolipidů a dalších hydrofobních látek T lymfocytům. Skládají se v endoplazmatickém retikulu z těžkého řetězce CD1 a z lehkého β -mikroglobulinu (Girardi a Zajonc 2012), podobně jako MHC I. třídy. Lidský genom kóduje 5 produktů CD1 molekul, značených a-e. CD1a, CD1b a CD1c prezentují tyto lipidické sloučeniny klasickým $\alpha\beta$ T buňkám, zatímco CD1d je prezentují natural-killer T buňkám (dále NKT). Poslední typ CD1 molekul, CD1e, neslouží k prezentaci antigenů T buňkám, ale pomáhá při složení CD1b/antigen komplexu v pozdním endozómu (Girardi a Zajonc 2012). Pro studium T lymfocytů specifických pro hydrofobní molekuly byly vytvořeny tetramerické CD1d komplexy (Li et al. 2008) a údajně i CD1a-CD1c komplexy (Davis et al. 2011). Mimo to

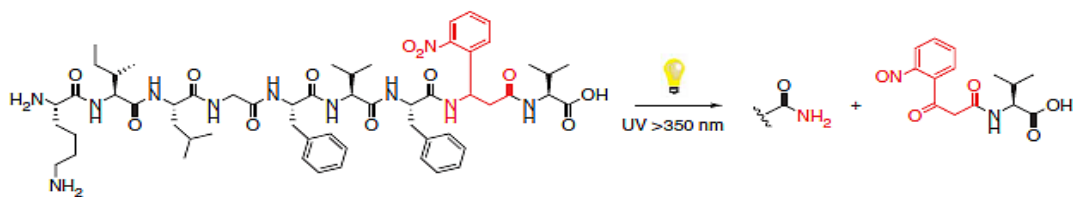
firma Immudex komerčně vyrábí i CD1d dextramery (http://www.immudex.com/products-ordering/cd1d_dextramer.aspx).

4.1.6 UV-zprostředkovaná výměna peptidu v pMHC

Jednou z technik, která rozšířila naše možnosti značení TCR je technika UV-zprostředkované výměny peptidu v MHC-peptid oligomeru (Rodenko et al. 2006). Ta slouží k recyklaci MHC molekuly I. třídy pro další měření. Techniky výměny peptidu jsou založeny na tvorbě peptidu, který se za určitých podmínek, v tomto případě za excitace UV-zářením, štěpí (Bakker et al. 2008). Principiálně může jít i o jinak stimulované štěpení, v případě MHC molekul II. třídy se například v současnosti využívá výše zmíněné štěpení thrombinem (Massilamany et al. 2015).

Vlastní UV-štěpení je způsobeno přítomností fotosensitivní aminokyseliny, obsahující (2-nitro)fenylový postranní řetězec, v hlavním řetězci ligandu. Pro tyto metody není možné využívat ligand, který jsme izolovali, veškeré ligandy je nutno nasyntetizovat *de novo* (Chang et al. 2013). Jako fotosensitivní aminokyseliny se využívají kyselina 3-amino-3-(2-nitro)fenyl-propionová a (2-nitro)fenylglycin. Hlavní výhodou kyseliny 3-amino-3-(2-nitro)fenyl-propionové je její snadná syntéza, a proto bývá využívána častěji. Má ovšem v hlavním řetězci o atom uhlíku více než běžné aminokyseliny tvořící bílkoviny, a tak ovlivňuje strukturu ligandu i jeho afinitu k MHC molekule. Princip jejího štěpení je zobrazen na obrázku č. 10 (Rodenko et al. 2006). Oproti tomu druhá používaná aminokyselina, (2-nitro)fenylglycin, má stejný počet atomů v hlavním řetězci, a tak strukturu ligandu ovlivňuje mnohem méně. Vykazuje stejnou fotosensitivitu jako 3-amino-3-(2-nitro)fenyl-propionová kyselina. Její hlavní nevýhodou je obtížnější příprava, která zahrnuje pětikrokovou syntézu z (2-nitro)fenyloctové kyseliny.

Bylo provedeno několik pokusů, jež srovnávaly fotolabilní pMHC I molekulu s klasickým peptidem vázaným na MHC I molekulu. Jejich výsledky ukazují, že při dobré volbě nahrazené aminokyseliny je tato metoda použitelná pro sledování antigenní specifity TCR. Touto metodou bylo objeveno několik nových epitopů melanomů (Bakker et al. 2008).



Obrázek č. 10: UV-zprostředkované štěpení peptidového řetězce na N-konci aminokyseliny 3-amino-3-(2-nitro)fenyl-propionové.

Z obrázku je patrné, že tato aminokyselina se liší počtem atomů, kterými přispívá do hlavního řetězce, a proto ovlivňuje strukturu oligopeptidu, v němž nahradila aminokyselinu jinou.

(převzato z Rodenko et al. 2006)

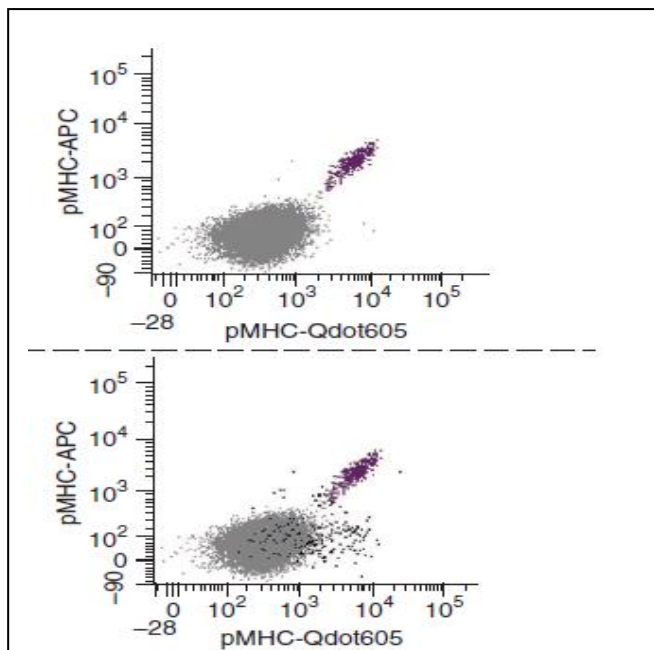
4.1.7 Kombinatoriální značení

Další metodou, která rozšířila možnosti přímého značení, je kombinatoriální značení MHC multimerů (Andersen et al. 2012). Andersenův tým využil UV-zprostředkovanou výměnu peptidu v pMHC. Využil osm fluoroforů, přičemž každou skupinu specifických pMHC označil dvěma z nich. Každá kombinace fluoroforů byla využita právě jednou. Takto byl vytvořen kód 28 unikátních kombinací dvou barev, čímž se výrazně zvýšil počet současně detegovatelných Ag-specifických CD8⁺ T-buněk. Navíc pokusy Davisova týmu ukazují, že už při použití šesti fluoroforů bychom se měli být schopní dostat na 63 různých barevných kombinací (Newell et al. 2009).

Pomocí kombinatoriálního značení byly objeveny nové epitopy u onemocnění, jako jsou maligní melanom (Hadrup et al. 2009), diabetes I. typu (Unger et al. 2011) i epitopy cytomegaloviru (Newell et al. 2009). Technologie se využívá pro současné měření přítomnosti více různých populací Ag-specifických T-lymfocytů, například při diagnostice stavu nádorové transformace a terapie (Andersen et al. 2012). Mezi další využití této metody patří sledování reaktivity buněk na různé epitopy, čehož lze využít např. při studiu autoreaktivity nebo aloreaktivity. Mezi hlavní výhody této metody patří vysoká senzitivita. Oproti konvenčnímu jednobarevnému MHC-multimerickému značení má kombinatorické značení senzitivitu 10x vyšší a její detekční limit je 0,002% CD8⁺ T lymfocytů (Andersen et al. 2012). Vzhledem k tomu, že pro zaznamenání jsou potřeba vždy právě dva signály, je omezen i prvek šumu prostředí způsobený autofluorescencí a vazbou pMHC na TCR s nižší afinitou (viz obrázek č. 11). Další výhodou je potřeba menšího množství vzorku při současném sledování více parametrů. Vlastní metoda nám nedává, a jak je zmíněno níže, ani nemůže podávat informaci o funkci buňky, ale vzhledem k tomu, že neovlivňuje stav buňky,

je možné rovnou navázat druhým krokem v podobě značení cytokinů v již rozdělených Ag-specifických populacích. Je nutno také dodat, že tato metoda je použitelná jen pro charakteristiky, kde očekáváme pouze jeden signál na buňku, jak je tomu například v případě sledování jednotlivých specifických TCR, ale již není využitelná tam, kde očekáváme signálů více, například při studiu cytokinů buňkou sekretovaných nebo dalších informací o funkčním stavu buňky. V takových případech by se signály překrývaly a rozluštění získaných dat by bylo extrémně komplikované, ne-li nemožné (Andersen et al. 2012).

To však neznamená, že by nebylo možné tuto metodu kombinovat například s metodami značení cytokinů. Právě této syntézy metod využil Davisův tým ke značení rotavirových epitopů (Newell et al. 2013). Navíc oproti dosud uvedeným metodám využili značení tetramerů kovovým atomem, navázaným na streptavidin – metodu CyTOF. Využili různé trojkombinace deseti různých kovových atomů pro označení 109 různých pMHC molekul I. třídy, které následně využili pro tvorbu tetramerů. Zároveň bylo použito 27 různých protilátek značených dalšími těžkými prvky pro nepřímou detekci. Poté byly buňky analyzovány pomocí metody hmotnostní cytometrie. Detekční limit této metody byl 0,001% CD8+ T buněk (Newell et al. 2013), tedy poloviční oproti Andersenovu.



*Obrázek č. 11: Dvojbarevné značení tetramerů
Na obrázcích je zobrazená intenzita fluorescence dvou fluoroforů, jimiž byl označen jeden typ pMHC molekuly. Buňky rozeznané jako pozitivní pro oba fluorofory jsou znázorněny fialově. V grafu jsou fialově ze statistiky vyřazeny buňky, které se fluorescenčně projevovali ve třech a více fluorescenčních kanálech. Pro srovnání je v dolní části zobrazen graf před jejich vyjmutím ze statistiky. Z obrázku je patrné, že i v případě silné autofluorescence nedojde k chybnému zařazení takové buňky mezi buňky pozitivní. Aby k tomu došlo, musela by být ona silná fluorescence ve dvou různých částech spektra, odpovídajících kombinaci fluoroforů. (upraveno podle Andersen et al. 2012)*

4.2 Nepřímá detekce

Pro pochopení funkčních parametrů buňky se využívá tzv. nepřímé značení. V rámci nepřímého značení dochází nejprve k aktivaci T buňky pomocí Ag *in vitro* a teprve poté značíme a měříme buněčné projevy jako je produkce cytokinů, degranulace, proliferační kapacita, exprese aktivačních markerů, aktivační stav a cytotoxicita (De Rosa 2012).

Vlastní aktivaci je možné vyvolat vícero způsoby, od přidání oligopeptidů nesoucích antigenní epitop, přes lyzáty patogenů (Bacher a Scheffold 2013) až po přidání specificky kultivovaných DC, které nesou na MHC molekulách ty Ag, pro které jsou specifické námi zkoumané T buňky (Wöfl et al. 2007), (Wöfl a Greenberg 2014). Jednou z nevýhod nepřímého značení je, že aktivované buňky mohou aktivovat i buňky ve svém okolí (takzvaný „bystander“ efekt), a proto například pro počítání Ag-specifických T lymfocytů není tato metoda vhodná. Její použití pro takovou detekci je možné, ale je proto nutné změřit „bystander“ efekt, například pomocí odběrů vzorků v čase (Massilamany et al. 2015). Níže jsou v detailu rozebrány metody detekce cytokinů a degranulační testy.

4.2.1 Detekce cytokinů

Abychom mohli zaznamenat produkci cytokinů přímo na buňce, je třeba zastavit jejich sekreční dráhy (Bacher a Scheffold 2013). K tomu se používají sekreční inhibitory, jako je Brefeldin A, který inhibuje anterográdní transport z ER do GA (Klausner et al. 1992), nebo Monensin, který ruší elektrochemický gradient (Łowicki a Huczyński 2013). Existují i metody, při nichž dochází k ukotvení sekretovaného cytokinu na povrchu sekretující buňky (Manz et al. 1995).

V rámci průtokové cytometrie byla nepřímá detekce Ag-specifických T buněk využita například pro studium T buněk specifických pro epitopy viru HIV. T buňky byly aktivovány pomocí peptidických produktů virových genů a inkubovány v médiu v přítomnosti Brefeldinu a Monesinu A. Poté byly označeny označeny pomocí protilátek s navázanou fluorescenční sondou, specifických pro cytokiny (Betts et al. 2006). V dalších studiích v této oblasti byly pak například zkoumány a porovnávány Ag-specifické buňky pro epitopy virových genů Gag a Env (Prebensen et al. 2016).

4.2.2 Degranulační testy

Jednou ze základních vlastností T lymfocytů je schopnost degranulace. Pokud T buňka pomocí svého receptoru rozpozná napadenou (nebo nádorovou) buňku, začne degranulovat – vypouštět obsah granulí do prostoru synapse. Zároveň na svém povrchu exprimuje molekuly (především CD107a), které ji samotnou chrání před dopady degranulace. Tyto molekuly je po aktivaci buňky antigenem možné označit protilátkami, a tak nepřímo detegovat antigen-specifické CD8⁺ T buňky (Betts et al. 2003).

Degranulační testy jsou využívány pro studium reakce CD8⁺ buněk například v souvislosti s virem HPV-indukujícím tumorigenezi (Santos et al. 2016), nebo s cytomegalovirem (Edvarlsen et al. 2016).

5. Analýza antigen-specifických T buněk v mikrojamkách

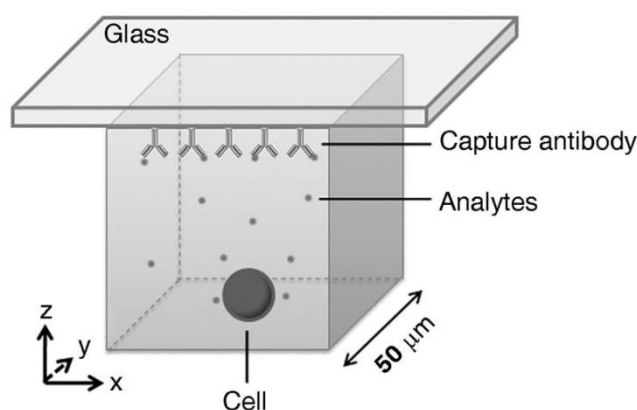
Další metodou, která je schopná studovat velké množství T buněk, je analýza na destičkách s mikrojamkami, anglicky nazývaná „microengraving“. Tato metoda je založena na destičkách, ve kterých je velké množství jamek velkých tak, aby se do každé z nich vešla právě jedna buňka. Umožňuje studium Ag-specifických T buněk včetně jejich produkce cytokinů. Jednou z výhod této metody je možnost sledování změn produkce cytokinů v čase (Varadarajan et al. 2012).

V prvním kroku dochází k přenesení buněk do jednotlivých jamek. Destičky obsahují velké množství jamek, a tak je možné měřit $10^4 - 10^5$ buněk (Han et al. 2010). V jamkách mohou být uchyceny buňky našeho zájmu pomocí protilátek (Zhu et al. 2009). Do jamek můžeme přenést již antigenem aktivované T buňky (Varadarajan et al. 2012), nebo neaktivované, které aktivujeme až v jamce. K tomu je možné využít monomerní pMHC molekuly, uchycené v destičkách (Song et al. 2010), nebo mitogen (Han et al. 2010). Pokud buňky aktivujeme až poté, co je přeneseme do jamek, vytváří tyto buňky cytokiny pouze v rámci vlastní jamky, čímž je zabráněno „bystander“ efektu. Cytokiny v jamkách je pak možné kvalifikovat i kvantifikovat (Han et al. 2012).

Oproti průtokové cytometrii má tato metoda několik výhod. Jednou z nich je právě možnost kvantifikovat množství vyprodukovaných cytokinů a následně porovnat toto množství v nezávislých studiích, což bývá pro průtokovou cytometrii komplikované (Han et al. 2010). Výhodou je i to, že na rozdíl od intracelulárního cytokinového barvení v průtokové cytometrii, tato metoda nevyžaduje zastavení sekrece, které může vést ke změně imunitní

odpovědi T buňky (Han et al. 2010). Další nezanedbatelnou výhodou je možnost měřit sekreci cytokinů v čase. K tomu se využívá technika nazývaná seriální „microengraving“.

„Microengraving“ je založený na protilátkách navázaných na druhou destičku. Tato destička se přiloží k destičce s mikrojamkami. Tím se protilátky dostanou do kontaktu s prostředím okolo buňky a naváží cytokiny, pro které jsou specifické. Poté se destička omyje a navázané cytokiny je možné značit protilátkami s navázanými fluorofory (Varadarajan et al. 2012). Princip metody je zobrazen na obrázku č. 12.



Obrázek č. 12: „Microengraving“

Na obrázku je schématicky znázorněná technika „microengravingu“. V horní části je sklíčko s navázanými protilátkami, které vychytávají námi sledované molekuly. Pro jednoduchost je zde znázorněna pouze jedna jamka.

(Převzato z Han et al. 2010)

Technika práce s buňkami v mikrojamkách byla použita jak na značení CD8⁺ T buněk, (Varadarajan et al. 2012), tak na CD4⁺ T buňky (Song et al. 2010). Technika takzvané „cytometrie na čipu“, ve které jsou v jamkách navázány monomerické pMHC molekuly, má potenciál pro vysokou senzitivitu a je tedy vhodná pro značení CD4⁺ T buněk s nízkými frekvencemi výskytu, jaké jsou běžné například u autoimunitních onemocnění (Song et al. 2010).

Vzhledem k tomu, že takto lze sklíčko přikládat opakovaně, lze tak sledovat změny sekrece v čase. Tento postup se nazývá seriální „microengraving“ (Song et al. 2010). Je možné takto měřit až 4 parametry v krátké době, tj. 3-120 minut od začátku inkubace (Han et al. 2010). Proto je možné pomocí této metody buňky dělit podle povrchových nebo sekretovaných proteinů, například podle cytokinů, ale i podle kinetiky jejich cytokinové exprese (Han et al. 2010).

Metoda byla využita například pro charakterizaci HIV specifických CD8⁺ T buněk *ex vivo* (Varadarajan et al. 2012). Jako antigen byl využitý retrovirový protein Gag, protože při HIV infekci je proti tomuto antigenu specifických 0,2-9% CD8⁺ T buněk pacienta. Detekční limit pro jeden z epitopů Gag byl určen pomocí „microengravingu“ INF- γ jako 0,004% živých CD8⁺ T buněk (Varadarajan et al. 2012).

Další velkou výhodou metody práce na destičkách s mikrojamkami je práce s živými buňkami, které je možno dále kultivovat. Vzhledem k tomu, že během technik nedochází k žádné fixaci, je možné buňky využité pro tuto analýzu použít i na další pokusy *in vitro*. Tým Christophera Lovea úspěšně vytvořil z 93% z takto studovaných buněk buněčné linie o alespoň 10^6 buněk (Varadarajan et al. 2012).

6. Porovnání současných možností dostupných technologií

V oblasti detekce antigen-specifických T lymfocytů dochází neustále k intenzivnímu vývoji. Každá z výše uvedených metod má své výhody a samozřejmě i nevýhody. Liší se například rychlostí, detekčním limitem i množstvím faktorů, které jednotlivými metodami zaznamenáme.

Nejrychlejší metodou je průtoková cytometrie se svou schopností detekovat údajně až 70 000 buněk za sekundu (<http://www.beckman.com/getattachment/31e6cb91-c607-4cef-a0252565d48cc1ba/CyAn%20ADP%20Analyzer%20-%20Brochure>). Hmotnostní cytometrie je pak na druhém místě s rychlostí desetkrát nižší (Bendall et al. 2011). Ve srovnání detekčních limitů zase vede hmotnostní cytometrie, která s využitím kombinatoriálního značení TCR byla schopná dosáhnout detekčního limitu 0,001% CD8+ T buněk (Newell et al. 2013), běžná průtoková cytometrie při využití kombinatoriálního značení dosáhla limitu 0,002% CD8+ T buněk (Andersen et al. 2012). Pomocí „microengravingu“ bylo nepřímou detekcí dosaženo detekčního limitu 0,004% CD8+ T buněk (Varadarajan et al. 2012). Velkou výhodou hmotnostní cytometrie je i vyšší množství současně měřitelných parametrů. V současnosti lze takto změřit 37 parametrů na buňku (Bendall et al. 2011). Proto je tato metoda nejvhodnější pro komplexní sběr dat. Klasická průtoková cytometrie je omezená vlastnostmi světla, jako jsou spektrální překryvy, a tak zaznamená maximálně 20 parametrů (Chattopadhyay a Roederer 2012), přestože některé firmy uvádějí limit až 50 parametrů (<https://www.bd.com/press/2016/BD-Launches-BD-FACSymphony-High-Speed-Cell-Analyzer-to-Enable-Identification-and-Analysis-of-Rare-Cell-Types.aspx>). „Microengraving“ je ještě omezenější, například při seriálním „microengravingu“, kde sledujeme kinetiku, je možné sledovat pouze 4 parametry (Han et al. 2010). Výhody „microengravingu“ spočívají především v možnosti časových sběrů a oddělení buněk při nepřímé detekci (Varadarajan et al. 2012). Dále je významným parametrem i to, že po detekci na mikrodestičkách lze

s buňkami i nadále pracovat, zatímco v případě hmotnostní cytometrie vzhledem k odpaření buněk není možná ani další práce s nimi, ani žádná recyklace použitých oligomerů. U průtokové cytometrie je možné buňky pro další práci i roztrždit podle různých parametrů, včetně Ag-specifity, viz výše.

Bylo zde uvedeno několik různých značících oligomerů pro přímou detekci s různou valencí. Vzhledem k tomu, že technologie dextramerů i technologie pentamerů jsou relativně mladé, nenalezl jsem informace pro jejich použití v kombinaci s kombinatoriálním značením. Nicméně lze předpokládat, že vzhledem k jejich výhodám oproti tradičním streptavidinovým tetramerům, v budoucnu k tomuto kroku dojde a lze tedy očekávat další zpřesnění značení.

Přímá detekce má svou výhodu v přesnosti, mezi nevýhody patří to, že pro každého pacienta je potřeba oligomerizovat MHC molekuly pacientova haplotypu. Zároveň pomocí přímého značení sledujeme pouze tu část T buněk, která je specifická nejen pro námi zvolený epitop, ale i pro námi vybranou MHC alelu. Oproti tomu nepřímá detekce nám je schopná ukázat všechny T buňky pro epitop specifické, ale hrozí při ní ovlivnění výsledků nepřímou aktivací T buněk. Tento problém ovšem částečně obchází metoda „microengravingu“, která mezi buňky před jejich aktivací umožňuje vložit fyzickou bariéru.

Závěr

T buňky jsou základní složkou adaptivní imunity. Vyznačují se obrovskou diverzitou na úrovni jedince. Pochopení jejich problematiky a schopnost jejich izolace a manipulace mohou být klíčové pro rozvoj diagnostických metod, terapie i prevence mnoha patologií. V této práci byly rozebrány dvě významné metody, které se snaží problematiku studia takto variabilních buněk vyřešit.

Nejběžněji používanou metodou je průtoková cytometrie, metoda založená na protékání fluorescenčně značených buněk květou o průměru jedné buňky. Mezi její hlavní výhody patří její počet parametrů a schopnost třídění buněk.

Dále je v práci představená novější technologie hmotnostní cytometrie, která využívá značení pomocí lanthanoidů, které se v biologickém materiálu nevyskytují. Obchází tak problematiku překryvu spekter fluoroforů a eliminuje vysoké pozadí autofluorescence. Navíc je schopná zaznamenat více parametrů než ostatní metody (dnes až 37 parametrů na buňku).

Třetí významnou technologií je detekce v mikrojamkách. Ta je sice pomalejší než předchozí dvě metody, ale její výhoda spočívá ve studiu jednotlivých izolovaných T buněk v čase.

V rámci všech tří metod lze Ag-specifické T buňky detekovat jak přímo, to znamená pomocí jejich receptoru, tak i nepřímo, to znamená detekovat až jejich reakci na aktivaci antigenem. V rámci přímých metod se často využívají pMHC oligomery pro jejich vyšší aviditu k TCR. Běžně se takto dnes využívají pMHC dimery, tetramery, pentamery a dextramery. Nepřímé metody jsou založené na aktivaci T buněk antigenem a následné detekci cytokinů nebo jiných projevů aktivace pomocí protilátek.

Detekce Ag-specifických T buněk je klíčovou metodikou moderní diagnostiky imunologicky relevantních lidských patologií. Zároveň data, které takto získáme, mohou přispět rozvoji imunoterapie. Výše zmíněné metody nám umožňují třdit, aktivovat, suprimovat a expandovat Ag-specifické T buňky a ty pak injektovat pacientovi. Tak můžeme vyvolat pacientovu reakci proti patogenům nebo nádorovému bujení, nebo naopak potlačit autoimunitní reakce, alergické reakce, reakce proti štěpu při transplantacích a další patologické jevy.

Reference

ALTMAN, John D., Paul A. H. MOSS, Philip J. R. GOULDER, Dan H. BAROUCH, Michael G. MCHEYZER-WILLIAMS, John I. BELL, Andrew J. MCMICHAEL a Mark M. DAVIS, 1996. Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes. *Science*, roč. 274, č. 5284, s. 94–96. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.274.5284.94

ANDERSEN, Rikke Sick, Pia KVISTBORG, Thomas Mørch FRØSIG, Natasja W. PEDERSEN, Rikke LYGAA, Arnold H. BAKKER, Chengyi Jenny SHU, Per thor STRATEN, Ton N. SCHUMACHER a Sine Reker HADRUP, 2012. Parallel detection of antigen-specific T cell responses by combinatorial encoding of MHC multimers. *Nature Protocols* . 5., roč. 7, č. 5, s. 891–902. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2012.037

ANGELINI, Daniela F., Barbara SERAFINI, Eleonora PIRAS, Martina SEVERA, Eliana M. COCCIA, Barbara ROSICARELLI, Serena RUGGIERI, Claudio GASPERINI, Fabio BUTTARI, Diego CENTONZE, Rosella MECHELLI, Marco SALVETTI, Giovanna BORSELLINO, Francesca ALOISI a Luca BATTISTINI, 2013. Increased CD8+ T Cell Response to Epstein-Barr Virus Lytic Antigens in the Active Phase of Multiple Sclerosis. *PLoS Pathogens* . 4., roč. 9, č. 4 [vid. 2016-04-17]. ISSN 1553-7366. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1003220

ATTAF, Meriem, Eric HUSEBY a Andrew K SEWELL, 2015. $\alpha\beta$ T cell receptors as predictors of health and disease. *Cellular and Molecular Immunology* . 7., roč. 12, č. 4, s. 391–399. ISSN 1672-7681. Dostupné z: doi:10.1038/cmi.2014.134

BACHER, Petra a Alexander SCHEFFOLD, 2013. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry Part A* ., roč. 83A, č. 8, s. 692–701. ISSN 1552-4930. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22317

BAKKER, Arnold H., Rieuwert HOPPE, Carsten LINNEMANN, Mireille TOEBES, Boris RODENKO, Celia R. BERKERS, Sine Reker HADRUP, Wim J. E. VAN ESCH, Mirjam H. M. HEEMSKERK, Huib OVAA a Ton N. M. SCHUMACHER, 2008. Conditional MHC class I ligands and peptide exchange technology for the human MHC gene products HLA-A1, -A3, -A11, and -B7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 105, č. 10, s. 3825–3830. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0709717105

BENDALL, Sean C., Erin F. SIMONDS, Peng QIU, El-ad D. AMIR, Peter O. KRUTZIK, Rachel FINCK, Robert V. BRUGGNER, Rachel MELAMED, Angelica TREJO, Olga I. ORNATSKY, Robert S. BALDERAS, Sylvia K. PLEVITIS, Karen SACHS, Dana PE'ER, Scott D. TANNER a Garry P. NOLAN, 2011. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science (New York, N.Y.)*, roč. 332, č. 6030, s. 687–696. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1198704

BETTS, Michael R., Jason M. BRENCHLEY, David A. PRICE, Stephen C. DE ROSA, Daniel C. DOUEK, Mario ROEDERER a Richard A. KOUP, 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods* . roč. 281, č. 1–2, s. 65–78. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1759(03)00265-5

BETTS, Michael R., Martha C. NASON, Sadie M. WEST, Stephen C. DE ROSA, Stephen A. MIGUELES, Jonathan ABRAHAM, Michael M. LEDERMAN, Jose M. BENITO, Paul A. GOEPFERT, Mark CONNORS, Mario ROEDERER a Richard A. KOUP, 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* . roč. 107, č. 12, s. 4781–4789. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-12-4818

BJORKMAN, Pamela J., 1997. MHC Restriction in Three Dimensions: A View of T Cell Receptor/Ligand Interactions. *Cell*, roč. 89, č. 2, s. 167–170. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80195-6

BJORNSON, Zach B., Garry P. NOLAN a Wendy J. FANTL, 2013. Single Cell Mass Cytometry for Analysis of Immune System Functional States. *Current opinion in immunology* . 8., roč. 25, č. 4 [vid. 2016-03-16]. ISSN 0952-7915. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2013.07.004

BOSIRE, Erick M, Anthony K NYAMACHE, Michael M GICHERU, Samoel A KHAMADI, Raphael W LIHANA a Vincent OKOTH, 2013. Population specific reference ranges of CD3, CD4 and CD8 lymphocyte subsets among healthy Kenyans. *AIDS Research and Therapy*, roč. 10, s. 24. ISSN 1742-6405. Dostupné z: doi:10.1186/1742-6405-10-24

BURROWS, Scott R., Zhenjun CHEN, Julia K. ARCHBOLD, Fleur E. TYNAN, Travis BEDDOE, Lars KJER-NIELSEN, John J. MILES, Rajiv KHANNA, Denis J. MOSS, Yu Chih LIU, Stephanie GRAS, Lyudmila KOSTENKO, Rebekah M. BRENNAN, Craig S. CLEMENTS, Andrew G. BROOKS, Anthony W. PURCELL, James MCCLUSKEY a Jamie ROSSJOHN, 2010. Hard wiring of T cell receptor specificity for the major histocompatibility complex is underpinned by TCR adaptability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 107, č. 23, s. 10608–10613. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1004926107

CECCONI, Virginia, Monica MORO, Sara DEL MARE, Paolo DELLABONA a Giulia CASORATI, 2008. Use of MHC class II tetramers to investigate CD4+ T cell responses: Problems and solutions. *Cytometry Part A*, roč. 73A, č. 11, s. 1010–1018. ISSN 1552-4930. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20603

DAVIS, Charles Patrick, 1996. Normal Flora. In: Samuel BARON, ed. *Medical Microbiology*. 4th vyd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston [vid. 2016-02-16]. ISBN 978-0-9631172-1-2. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/>

DAVIS, Mark M., John D. ALTMAN a Evan W. NEWELL, 2011. Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide–MHC multimer analysis. *Nature reviews. Immunology*, roč. 11, č. 8, s. 551–558. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3020

DAY, Cheryl L., Nilufer P. SETH, Michaela LUCAS, Heiner APPEL, Laurent GAUTHIER, Georg M. LAUER, Gregory K. ROBBINS, Zbigniew M. SZCZEPIORKOWSKI, Deborah R. CASSON, Raymond T. CHUNG, Shannon BELL, Gillian HARCOURT, Bruce D. WALKER, Paul KLENERMAN a Kai W. WUCHERPFENNIG, 2003. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *Journal of Clinical Investigation*, roč. 112, č. 6, s. 831–842. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI200318509

- DE ROSA, Stephen C., 2012. Vaccine applications of flow cytometry. *Methods (San Diego, Calif.)*. 7., roč. 57, č. 3, s. 383–391. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2012.01.001
- DELONG, Jonathan H., Kelly A. HETHERINGTON, Erik WAMBRE, Eddie A. JAMES, David ROBINSON a William W. KWOK, 2011. Ara h 1-Reactive T Cells in Peanut Allergic Individuals. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 5., roč. 127, č. 5, s. 1211–8.e3. ISSN 0091-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2011.02.028
- DOLTON, G, A LISSINA, A SKOWERA, K LADELL, K TUNGATT, E JONES, D KRONENBERG-VERSTEEG, H AKPOVWA, J M PENTIER, C J HOLLAND, A J GODKIN, D K COLE, M A NELLER, J J MILES, D A PRICE, M PEAKMAN a A K SEWELL, 2014. Comparison of peptide–major histocompatibility complex tetramers and dextramers for the identification of antigen-specific T cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 7., roč. 177, č. 1, s. 47–63. ISSN 0009-9104. Dostupné z: doi:10.1111/cei.12339
- DUSTIN, Michael L., 2014. The immunological synapse. *Cancer immunology research*. 11., roč. 2, č. 11, s. 1023–1033. ISSN 2326-6066. Dostupné z: doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0161
- EBERT, Anja, Jasna MEDVEDOVIC, Hiromi TAGOH, Tanja A. SCHWICKERT a Meinrad BUSSLINGER, 2013. Control of Antigen Receptor Diversity through Spatial Regulation of V(D)J Recombination. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, roč. 78, s. 11–21. ISSN 0091-7451, 1943-4456. Dostupné z: doi:10.1101/sqb.2013.78.019943
- EDVARDBSEN, Kine, Alexander HELLESEN, Eystein S. HUSEBYE a Eirik BRATLAND, 2016. Analysis of cellular and humoral immune responses against cytomegalovirus in patients with autoimmune Addison’s disease. *Journal of Translational Medicine*, roč. 14 [vid. 2016-07-13]. ISSN 1479-5876. Dostupné z: doi:10.1186/s12967-016-0822-z
- FAHMY, Tarek M., Joan G. BIELER a Jonathan P. SCHNECK, 2002. Probing T cell membrane organization using dimeric MHC-Ig complexes. *Journal of Immunological Methods*. 1. 10., roč. 268, č. 1, s. 93–106. ISSN 0022-1759.
- FOOKSMAN, David R., Santosh VARDHANA, Gaia VASILIVER-SHAMIS, Jan LIESE, David BLAIR, Janelle WAITE, Catarina SACRISTÁN, Gabriel VICTORA, Alexandra ZANIN-ZHOROV a Michael L. DUSTIN, 2010. Functional Anatomy of T Cell Activation and Synapse Formation. *Annual review of immunology*. 3., roč. 28, s. 79–105. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101308
- GIRARDI, Enrico a Dirk M. ZAJONC, 2012. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunological reviews*. 11., roč. 250, č. 1, s. 167–179. ISSN 0105-2896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01166.x
- GONG, Yeli, Zhigang WANG, Zhihui LIANG, Hongxia DUAN, Lichen OUYANG, Qian YU, Zhe XU, Guanxin SHEN, Xiufang WENG a Xiongwen WU, 2012. Soluble MOG35-55/I-Ab Dimers Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Reducing Encephalitogenic T Cells. *PLoS ONE*, roč. 7, č. 10 [vid. 2016-04-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0047435

HADRUP, Sine Reker, Arnold H. BAKKER, Chengyi J. SHU, Rikke S. ANDERSEN, Jerre VAN VELUW, Pleun HOMBRINK, Emilie CASTERMANS, Per THOR STRATEN, Christian BLANK, John B. HAANEN, Mirjam H. HEEMSKERK a Ton N. SCHUMACHER, 2009. Parallel detection of antigen-specific T-cell responses by multidimensional encoding of MHC multimers. *Nature Methods*. 7., roč. 6, č. 7, s. 520–526. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1345

HAN, Qing, Neda BAGHERI, Elizabeth M. BRADSHAW, David A. HAFLER, Douglas A. LAUFFENBURGER a J. Christopher LOVE, 2012. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 109, č. 5, s. 1607–1612. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1117194109

HAN, Qing, Elizabeth M. BRADSHAW, Björn NILSSON, David A. HAFLER a J. Christopher LOVE, 2010. Multidimensional analysis of the frequencies and rates of cytokine secretion from single cells by quantitative microengraving. *Lab on a chip*, roč. 10, č. 11, s. 1391–1400. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/b926849a

CHANG, Cynthia X L, Anthony T TAN, Ming Yan OR, Kai Yee TOH, Pei Yiing LIM, Adeline S E CHIA, Thomas M FROESIG, Karen D NADUA, Hsueh-Ling J OH, Hoe Nam LEONG, Sine R HADRUP, Adam J GEHRING, Yee-Joo TAN, Antonio BERTOLETTI a Gijsbert M GROTENBREG, 2013. Conditional ligands for Asian HLA variants facilitate the definition of CD8+ T-cell responses in acute and chronic viral diseases. *European Journal of Immunology*. 4., roč. 43, č. 4, s. 1109–1120. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201243088

CHAPUIS, Aude G., Corey CASPER, Steve KUNTZ, Jia ZHU, Annelie TJERNLUND, Kurt DIEM, Cameron J. TURTLE, Melinda L. CIGAL, Roxanne VELEZ, Stanley RIDDELL, Lawrence COREY a Philip D. GREENBERG, 2011. HIV-specific CD8+ T cells from HIV+ individuals receiving HAART can be expanded ex vivo to augment systemic and mucosal immunity in vivo. *Blood*. 19. 5., roč. 117, č. 20, s. 5391–5402. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-11-320226

CHATTOPADHYAY, Pratip K., Kiprotich CHELIMO, Paula B. EMBURY, David H. MULAMA, Peter Odada SUMBA, Emma GOSTICK, Kristin LADELL, Tess M. BRODIE, John VULULE, Mario ROEDERER, Ann M. MOORMANN a David A. PRICE, 2013. Holoendemic Malaria Exposure Is Associated with Altered Epstein-Barr Virus-Specific CD8+ T-Cell Differentiation. *Journal of Virology*. 2., roč. 87, č. 3, s. 1779–1788. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.02158-12

CHATTOPADHYAY, Pratip a Mario ROEDERER, 2012. Cytometry: Today's Technology and Tomorrow's Horizons. *Methods (San Diego, Calif.)*. 7., roč. 57, č. 3, s. 251–258. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2012.02.009

KALANDADZE, Avtandil, Michael GALLEN, Luis FONCERRADA, Jack L. STROMINGER a Kai W. WUCHERPFENNIG, 1996. Expression of Recombinant HLA-DR2 Molecules REPLACEMENT OF THE HYDROPHOBIC TRANSMEMBRANE REGION BY A LEUCINE ZIPPER DIMERIZATION MOTIF ALLOWS THE ASSEMBLY AND SECRETION OF SOLUBLE DR $\alpha\beta$ HETERODIMERS. *Journal of Biological Chemistry*, roč. 271, č. 33, s. 20156–20162. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.33.20156

KINDT, Thomas J., Richard A. GOLDSBY a Barbara Anne OSBORNE. *Kuby immunology*. 6. edition. New York: W.H. Freeman and Company, c2007. ISBN 978-1-4292-0211-4.

KLAUSNER, R. D., J. G. DONALDSON a J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of Cell Biology*, roč. 116, č. 5, s. 1071–1080. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.116.5.1071

KLEIN, Ludger, Bruno KYEWSKI, Paul M. ALLEN a Kristin A. HOGQUIST, 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. *Nature reviews. Immunology*. 6., roč. 14, č. 6, s. 377–391. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3667

KURTULUS, Sema a David HILDEMAN, 2013. Assessment of CD4+ and CD8+ T Cell Responses Using MHC Class I and II Tetramers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. roč. 979, s. 71–79. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-290-2_8

KWOK, William W, Nancy A PTACEK, Andrew W LIU a Jane H BUCKNER, 2002. Use of class II tetramers for identification of CD4+ T cells. *Journal of Immunological Methods*. roč. 268, č. 1, Oligomeric MHC molecules and their homologues, s. 71–81. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1759(02)00201-6

LI, Demin, Nan CHEN, Andrew J. MCMICHAEL, Gavin R. SCREATON a Xiao-Ning XU, 2008. Generation and characterisation of CD1d tetramer produced by a lentiviral expression system. *Journal of Immunological Methods*, roč. 330, č. 1–2, s. 57–63. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2007.10.018

ŁOWICKI, Daniel a Adam HUCZYŃSKI, 2013. Structure and Antimicrobial Properties of Monensin A and Its Derivatives: Summary of the Achievements. *BioMed Research International*. roč. 2013 [vid. 2016-03-23]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/742149

MAJONIS, Daniel, Olga ORNATSKY, Robert KINACH a Mitchell A. WINNIK, 2011. Curious results with palladium- and platinum-carrying polymers in mass cytometry bioassays and an unexpected application as a dead cell stain. *Biomacromolecules*, roč. 12, č. 11, s. 3997–4010. ISSN 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm201011t

MANZ, R, M ASSENMACHER, E PFLÜGER, S MILTENYI a A RADBRUCH, 1995. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 14. 3., roč. 92, č. 6, s. 1921–1925. ISSN 0027-8424.

MASSILAMANY, Chandirasegaran, Bharathi KRISHNAN a Jay REDDY, 2015. Major histocompatibility complex class II dextramers: New tools for the detection of antigen-specific, CD4 T cells in basic and clinical research. *Scandinavian journal of immunology*. 11., roč. 82, č. 5, s. 399–408. ISSN 0300-9475. Dostupné z: doi:10.1111/sji.12344

MASSILAMANY, Chandirasegaran, Bijaya UPADHYAYA, Arunakumar GANGAPLARA, Charles KUSZYNSKI a Jay REDDY, 2011. Detection of autoreactive CD4 T cells using major histocompatibility complex class II dextramers. *BMC Immunology*, roč. 12, s. 40. ISSN 1471-2172. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2172-12-40

- MATTAPALLIL, Mary J., Phyllis B. SILVER, Joseph J. MATTAPALLIL, Reiko HORAI, Zaruhi KARABEKIAN, J. Hugh MCDOWELL, Chi-Chao CHAN, Eddie A. JAMES, William W. KWOK, H. Nida SEN, Robert B. NUSSENBLATT, Chella S. DAVID a Rachel R. CASPI, 2011. Uveitis-associated epitopes of retinal antigens are pathogenic in the humanized mouse model of uveitis and identify autoaggressive T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, roč. 187, č. 4, s. 1977–1985. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1101247
- MCCARTY, Sara, Farhatullah SYED a Ardeshir BAYAT, 2010. Role of the HLA System in the Pathogenesis of Dupuytren's Disease. *Hand (New York, N.Y.)*. 9., roč. 5, č. 3, s. 241–250. ISSN 1558-9447. Dostupné z: doi:10.1007/s11552-009-9255-y
- MINGUENEAU, Michael, Smita KRISHNASWAMY, Matthew H. SPITZER, Sean C. BENDALL, Erica L. STONE, Stephen M. HEDRICK, Dana PE'ER, Diane MATHIS, Garry P. NOLAN a Christophe BENOIST, 2014. Single-cell mass cytometry of TCR signaling: Amplification of small initial differences results in low ERK activation in NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 111, č. 46, s. 16466–16471. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1419337111
- NEPOM, Gerald T, 2012. MHC Class II Tetramers. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, roč. 188, č. 6, s. 2477–2482. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1102398
- NEWELL, Evan W. a Mark M. DAVIS, 2014. Beyond model antigens: high-dimensional methods for the analysis of antigen-specific T cells. *Nature biotechnology*. 2., roč. 32, č. 2, s. 149–157. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.2783
- NEWELL, Evan W., Lawrence O. KLEIN, Wong YU a Mark M. DAVIS, 2009. Simultaneous detection of many T-cell specificities using combinatorial tetramer staining. *Nature methods*. 7., roč. 6, č. 7, s. 497–499. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1344
- NEWELL, Evan W, Natalia SIGAL, Nitya NAIR, Brian A KIDD, Harry B GREENBERG a Mark M DAVIS, 2013. Combinatorial tetramer staining and mass cytometry analysis facilitate T-cell epitope mapping and characterization. *Nature biotechnology*. 7., roč. 31, č. 7, s. 623–629. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.2593
- OMENETTI, Sara a Theresa T. PIZARRO, 2015. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Frontiers in Immunology*, roč. 6 [vid. 2016-04-10]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00639
- POLI, Caroline, Caroline RAFFIN, Danijel DOJCINOVIC, Immanuel LUESCHER, Maha AYYOUB a Danila VALMORI, 2013. MHC class II/ESO tetramer-based generation of in vitro primed anti-tumor T-helper lines for adoptive cell therapy of cancer. *Haematologica*. 2., roč. 98, č. 2, s. 316–322. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2012.071712
- PREBENSEN, Christian, Andreas LIND, Anne-Ma DYRHOL-RIISE a Dag KVALE, 2016. Regulation of Gag- and Env-Specific CD8+ T Cell Responses in ART-Naïve HIV-Infected Patients: Potential Implications for Individualized Immunotherapy. *PLoS ONE*, roč. 11, č. 4 [vid. 2016-07-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0153849

RADDASSI, Khadir, Sally C. KENT, Junbao YANG, Kasia BOURCIER, Elizabeth M. BRADSHAW, Vicki SEYFERT-MARGOLIS, Gerald T. NEPOM, William W. KWOK a David A. HAFLER, 2011. Increased Frequencies of MOG/MHC Class II binding CD4 cells in Patients with Multiple Sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, roč. 187, č. 2, s. 1039–1046. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1001543

RODENKO, Boris, Mireille TOEBES, Sine Reker HADRUP, Wim J. E. VAN ESCH, Annemieke M. MOLENAAR, Ton N. M. SCHUMACHER a Huib OVAA, 2006. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nature Protocols*. roč. 1, č. 3, s. 1120–1132. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.121

ROSSJOHN, Jamie, Stephanie GRAS, John J. MILES, Stephen J. TURNER, Dale I. GODFREY a James MCCLUSKEY, 2015. T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules. *Annual Review of Immunology*. roč. 33, č. 1, s. 169–200. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112334

SANTOS, Carlos, Tiago NETO, Pedro FERREIRINHA, Hugo SOUSA, Joana RIBEIRO, Margarida M. S. M. BASTOS, Ana I. FAUSTINO-ROCHA, Paula A. OLIVEIRA, Rui MEDEIROS, Manuel VILANOVA a Rui M. Gil DA COSTA, 2016. Celecoxib promotes degranulation of CD8+ T cells in HPV-induced lesions of K14-HPV16 transgenic mice. *Life Sciences*. roč. 157, s. 67–73. ISSN 0024-3205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2016.05.040

SCHÜTZ, Christian, Alessia ZOSO, Shiwen PENG, Jonathon D BENNETT, Jonathan P SCHNECK a Mathias OELKE, 2014. MHC-Ig induces memory T cell formation in vivo and inhibits tumour growth. *Immunity, Inflammation and Disease*. 11., roč. 2, č. 3, s. 181–192. ISSN 2050-4527. Dostupné z: doi:10.1002/iid3.35

SMITH, Kendall A., 2012. Toward a molecular understanding of adaptive immunity: a chronology, part I. *Frontiers in Immunology*, roč. 3 [vid. 2016-03-30]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2012.00369

SONG, Qing, Qing HAN, Elizabeth M. BRADSHAW, Sally C. KENT, Khadir RADDASSI, Björn NILSSON, Gerald T. NEPOM, David A. HAFLER a J. Christopher LOVE, 2010. On-chip activation and subsequent detection of individual antigen-specific T cells. *Analytical chemistry*, roč. 82, č. 2, s. 473–477. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac9024363

ST-PIERRE, Charles, Sylvie BROCHU, Juan Ruiz VANEGAS, Maude DUMONT-LAGACÉ, Sébastien LEMIEUX a Claude PERREAULT, 2013. Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Scientific Reports*, roč. 3 [vid. 2016-04-10]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep01860

SVITEK, Nicholas, Andreas Martin HANSEN, Lucilla STEINAA, Rosemary SAYA, Elias AWINO, Morten NIELSEN, Søren BUUS a Vishvanath NENE, 2014. Use of “one-pot, mix-and-read” peptide-MHC class I tetramers and predictive algorithms to improve detection of cytotoxic T lymphocyte responses in cattle. *Veterinary Research*. roč. 45, č. 1, s. 50. ISSN 0928-4249. Dostupné z: doi:10.1186/1297-9716-45-50

TADOKORO, Carlos E., Guy SHAKHAR, Shiqian SHEN, Yi DING, Andreia C. LINO, Antonio MARAVER, Juan J. LAFAILLE a Michael L. DUSTIN, 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, roč. 203, č. 3, s. 505–511. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20050783

UNGER, Wendy W., Jurjen VELTHUIS, Joana R. F. ABREU, Sandra LABAN, Edwin QUINTEN, Michel G. D. KESTER, Sine REKER-HADRUP, Arnold H. BAKKER, Gaby DUINKERKEN, Arend MULDER, Kees L. M. C. FRANKEN, Robert HILBRANDS, Bart KEYMEULEN, Mark PEAKMAN, Ferry OSSENDORP, Jan Wouter DRIJFHOUT, Ton N. SCHUMACHER a Bart O. ROEP, 2011. Discovery of low-affinity preproinsulin epitopes and detection of autoreactive CD8 T-cells using combinatorial MHC multimers. *Journal of Autoimmunity*. 11., roč. 37, č. 3, s. 151–159. ISSN 1095-9157. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaut.2011.05.012

VARADARAJAN, Navin, Douglas S. KWON, Kenneth M. LAW, Adebola O. OGUNNIYI, Melis N. ANAHTAR, James M. RICHTER, Bruce D. WALKER a J. Christopher LOVE, 2012. Rapid, efficient functional characterization and recovery of HIV-specific human CD8+ T cells using microengraving. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 109, č. 10, s. 3885–3890. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1111205109

WANG, Rong-Fu, 2006. Functional control of regulatory T cells and cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*. 4., roč. 16, č. 2, Regulating the Regulators or How to Elicit an Immune Response, s. 106–114. ISSN 1044-579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2005.11.004

WESTERNBERG, Luise, Claire CONCHE, Yina Hsing HUANG, Stephanie RIGAUD, Yisong DENG, Sabine SIEGEMUND, Sayak MUKHERJEE, Lyn'Al NOSAKA, Jayajit DAS a Karsten SAUER, 2016. Non-canonical antagonism of PI3K by the kinase Itpkb delays thymocyte β -selection and renders it Notch-dependent. *eLife*. roč. 5 [vid. 2016-05-17]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.10786

WIGINA, Ronald Nyarambe a Victor Tunje JEZA, 2015. MHC-Ig Dimers: The next Frontier in Transplantation Immunology. *International Journal of Biomedical Research*, roč. 6, č. 9, s. 601. ISSN 0976-9633, 2455-0566. Dostupné z: doi:10.7439/ijbr.v6i9.2327

WÖLFL, Matthias a Philip D GREENBERG, 2014. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. *Nature protocols*. 4., roč. 9, č. 4, s. 950–966. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2014.064

WOLFL, Matthias, Jürgen KUBALL, William Y. HO, Hieu NGUYEN, Thomas J. MANLEY, Marie BLEAKLEY a Philip D. GREENBERG, 2007. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood*, roč. 110, č. 1, s. 201–210. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2006-11-056168

ZHANG, Xuejun, Jin-Qing LIU, Yun SHI, Hugh H. REID, Richard L. BOYD, Mazin KHATTABI, Hani Y. EL-OMRANI, Pan ZHENG, Yang LIU a Xue-Feng BAI, 2012. CD24 on thymic antigen presenting cells regulates negative selection of myelin antigen specific T lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 4., roč. 42, č. 4, s. 924–935. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201142024

ZHU, He, Gulnaz STYBAYEVA, Jaime SILANGCRUZ, Jun YAN, Erlan RAMANCULOV, Dandekar SATYA, Michael GEORGE a Alexander REVZIN, 2009. Detecting Cytokine Release from Single Human T-cells. *Analytical chemistry*., roč. 81, č. 19, s. 8150–8156. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac901390j

Internetové zdroje:

[online]. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <https://www.proimmune.com>

[online]. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: https://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=pentamer_info

[online]. [cit. 2016-07-15]. Dostupné z: http://www.immudex.com/products-ordering/cd1d_dextramer.aspx

[online]. [cit. 2016-07-22]. Dostupné z: <http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/551263.pdf>

[online]. [cit. 2016-07-24]. Dostupné z: <http://www.beckman.com/getattachment/31e6cb91-c607-4cef-a0252565d48cc1ba/CyAn%20ADP%20Analyzer%20-%20Brochure>

[online]. [cit. 2016-07-24]. Dostupné z: <https://www.bd.com/press/2016/BD-Launches-BD-FACSymphony-High-Speed-Cell-Analyzer-to-Enable-Identification-and-Analysis-of-Rare-Cell-Types.aspx>

[online]. [cit. 2016-07-26]. Dostupné z: <http://www.spectroscopyonline.com/mass-cytometry-evolution-icp-ms-enabling-novel-insights-single-cell-biology>

[online]. [cit. 2016-07-26]. Dostupné z: <http://www.unifr.ch/pathology/en/facs>