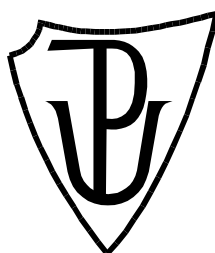


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Analýza vybraných imunogenetických markerů u transplantace krvetvorných kmenových buněk**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Kateřina Štaffová</b>
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. MUDr. František Mrázek, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2. 5. 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval(a) samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 2. 5. 2013

Děkuji především Doc. MUDr. Františku Mrázkovi, PhD. za vedení mé diplomové práce, za jeho pomoc při řešení problémů, cenné rady a připomínky a také za jeho trpělivost a ochotu. Dále bych ráda poděkovala Dr. Ing. Evě Kriegové za spolupráci při genotypizaci metodou MassArray a Ing. Anně Sťahelové za spolupráci a pomoc s metodou RT-PCR. Tato práce vznikla s částečnou podporou projektů IGA MZ ČR NT12454-5, CZ.1.05./2.1.00/01.0030 a IGA PU LF 2013\_009.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Štaffová
Název práce	Analýza vybraných imunogenetických markerů u transplantace krvetvorných kmenových buněk
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. MUDr. František Mrázek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Kromě shody ve znacích hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) mezi pacientem a dárce existují i další genetické faktory úspěšnosti alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (aTKKB). Na základě dostupné literatury byl vybrán panel 22 jednonukleotidových polymorfismů (SNP) ve 12 genech jako možní kandidáti ovlivňující vnímavost k reakci štěpu proti hostiteli (GVHD) po aTKKB. 143 pacientů po aTKKB, jejich dárce a 200 kontrolních jedinců z české populace bylo genotypizováno pomocí metody MassArray. Genotypizace tří vybraných SNP byla nezávisle ověřena jinými genotypizačními metodami. Bylo zjištěno, že varianta rs1049550*T genu <i>ANXA11</i> je méně častá u příjemců s akutní GVHD v porovnání s pacienty bez aGVHD (nominální <math>p=0,01</math>). Protektivní efekt <i>ANXA11</i>*T alely před aGVHD byl patrný zejména u TT homozygotů (odds ratio=0,26). Nosičství další alely, <i>CXCL12</i> rs1801157*A, naopak mírně zvyšovalo riziko aGVHD (nominální <math>p=0,03</math>). Popsané nálezy však nedosáhly úrovně významnosti po korekci na vícenásobné porovnávání. Závěrem lze shrnout, že některé z testovaných variant mohou ovlivňovat riziko GVHD. Uvedené výsledky jsou však předběžné a budou replikovány na větší skupině pacientů po aTKKB.</p>
Klíčová slova	transplantace, polymorfismus, GVHD
Počet stran	71
Počet příloh	0
Jazyk	Český

### **Bibliographical identification:**

Author's first name and surname	Bc. Kateřina Štaffová
Title	Analysis of selected immunogenetic markers in hematopoietic stem cell transplantation
Type of thesis	Master
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. MUDr. František Mrázek, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>Apart from matching in the major histocompatibility complex (HLA) between the recipient and donor, there are further genetic factors that influence the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT). Based on the current literature we assembled a panel of 22 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in twelve genes as plausible candidates for implication in graft versus host disease (GVHD) susceptibility. 143 patients after aHSCT, their donors and 200 Czech healthy controls were genotyped by the MassArray method. The genotyping of three selected SNPs was independently verified by other genotyping methods. The variant <i>ANXA11</i> rs1049550*T was less frequent among the recipients with acute GVHD compared to those without aGVHD (nominal <math>p=0.01</math>). Protective effect of the <i>ANXA11</i>*T allele from aGVHD was apparent particularly in TT homozygotes (odds ratio, OR=0.26). Furthermore, the carriage of the <i>CXCL12</i> rs1801157*A allele moderately increased the risk of aGVHD (nominal <math>p=0.03</math>). Described findings though did not reach the level of significance after the correction for multiple comparisons. In conclusion, several tested gene variants may affect a risk of GVHD. Nevertheless, these observations should be considered as preliminary and will be replicated on larger aHSCT cohort.</p>
Keywords	transplantation, polymorphism, GVHD
Number of pages	71
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

Cíle práce .....	8
1. Teoretická část .....	9
1.1. Úvod .....	10
1.2. Historie, definice a indikace TKKB.....	11
1.3. Typy TKKB.....	14
1.4. Zdroje krvetvorných kmenových buněk .....	16
1.5. Provedení TKKB .....	17
1.5.1. Předtransplantační režim.....	17
1.5.2. Transfuze kmenových buněk.....	18
1.5.3. Posttransplantační období.....	18
1.6. Komplikace TKKB se zaměřením na aloimunitně zprostředkované reakce (zejména GVHD).....	19
1.6.1. Časné komplikace .....	19
1.6.2. Pozdní komplikace .....	20
1.6.3. GVHD.....	20
1.6.3.1. Akutní GVHD .....	24
1.6.3.2. Chronická GVHD .....	25
1.7. Hlavní faktory úspěšnosti – včetně imunogenetických markerů.....	26
1.7.1. Klinické a demografické faktory .....	26
1.7.1.1. Diagnóza základního onemocnění, jeho „rizikovost“ a stádium .....	26
1.7.1.2. Věk a kombinace pohlaví pacienta a dárce .....	27
1.7.1.3. Zdroj krvetvorných kmenových buněk a přípravný režim.....	28
1.7.1.4. Infekční status dárce.....	28
1.7.2. Genetické faktory .....	29
1.7.2.1. Shoda v HLA znacích mezi dárce a příjemcem .....	29
1.7.2.2. nonHLA faktory .....	30

2. Experimentální část .....	34
2.1. Přehled genotypizovaných genů .....	35
2.2. Použité chemikálie a přístroje.....	39
2.2.1. Chemikálie .....	39
2.2.2. Přístrojové vybavení.....	39
2.3. Metody .....	40
2.3.1. Genotypizace pomocí „Sequenom MassArray“ techniky.....	40
2.3.2. Genotypizace pomocí PCR-SSP .....	44
2.3.3. Elektroforéza na agarosovém gelu .....	45
2.3.4. Genotypizace pomocí RT-PCR .....	46
2.3.5. Statistická analýza.....	47
2.4. Výsledky.....	48
2.4.1. Charakteristika genotypizovaného souboru .....	48
2.4.2. Genotypizace studovaného souboru pomocí techniky MassArray Sequenom .....	48
2.4.2.1. Vztah akutní GVHD a genotypů pacientů (příjemců) .....	49
2.4.2.2. Vztah akutní GVHD a genotypů dárců .....	49
2.4.2.3. Vztah chronické GVHD a genotypů pacientů .....	50
2.4.3. Verifikace výsledků genotypizace metodou MassArray .....	56
2.5. Diskuze .....	58
Závěr.....	61
Literatura.....	62
Seznam použitých zkratk .....	69

## Cíle práce

1. Zpracování literárního přehledu týkajícího se alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (aTKKB) a jejich komplikací
2. Genotypizace vybraných kandidátních polymorfismů na DNA vzorcích souboru pacientů po aTKKB, jejich dárců a zdravých kontrolních jedinců metodou MassArray (Sequenom)
3. Nezávislá verifikace genotypizace polymorfismů genu *ATXN2L* metodou PCR-SSP a genů *TLR4* a *ANXA11* metodou qRT-PCR
4. Statistické vyhodnocení získaných dat na základě genotypové, alelické a fenotypové frekvence u jednotlivých polymorfismů a jejich porovnání mezi podskupinami pacientů podle výskytu akutní a chronické reakce štěpu proti hostiteli
5. Vyhodnocení potenciálních imunogenetických markerů, které mohou souviset s výskytem reakce štěpu proti hostiteli



# **1. Teoretická část**

## 1.1. Úvod

Transplantace krvetvorných kmenových buněk (TKKB nebo HSCT z angl. hematopoietic stem cell transplantation) je terapeutický zákrok, při kterém jsou krvetvorné kmenové buňky příjemce (a buňky z nich pocházející) odstraněny a nahrazeny normálními zdravými kmenovými buňkami dárce (v případě tzv. alogenní transplantace) nebo pacienta samotného (v případě tzv. autologní transplantace). TKKB je v dnešní době standardizovaný lékařský zákrok využívaný k léčbě zhoubných, dědičných a některých autoimunitních onemocnění. Pro řadu nemocných se závažnými chorobami (leukémie, primární imunodeficiency) je jedinou nadějí na vyléčení. Dárce kmenových buněk je nejdříve vyhledáván mezi příbuznými pacienta a v druhé linii se přistupuje k hledání i mezi členy registru nepříbuzenských dárců kostní dřeně (nejlépe dárce zcela identický s pacientem v antigenech hlavního histokompatibilního komplexu, HLA).

I v případě nalezení optimálního dárce z hlediska shody v HLA znacích není úspěch transplantace zaručen. Existuje řada dalších biologických a klinických faktorů, které výsledky TKKB ovlivňují. Mezi tyto faktory patří zejména věk pacienta, základní onemocnění (pro které je TKKB indikována) a jeho pokročilost, přidružené choroby, věk a pohlaví dárce, typ přípravného režimu před TKKB, úroveň podpůrné léčby apod. Navíc je TKKB limitována komplikacemi, které mohou v závažných formách zapříčinit až úmrtí příjemce. Mezi tyto komplikace patří i imunitně zprostředkovaná akutní nebo chronická reakce štěpu proti hostiteli (GVHD z angl. graft versus host disease), které se podrobně věnuje i tato diplomová práce. I přes intenzivní prevenci založenou na podávání imunosupresiv, je incidence GVHD u pacientů, kteří podstoupili transplantaci od sourozenců se shodou v HLA znacích až 50%, u nepříbuzných dárců může být ještě vyšší (Krstevska S. et al., 2011).

Jak už bylo zmíněno, jedním ze základních předpokladů úspěchu TKKB je zajištění optimální shody mezi dárce a příjemcem ve znacích HLA systému, která je považována za nejvýznamnější (ne však jediný) genetický faktor. Již delší dobu je pozornost věnována výzkumu dalších genetických faktorů (genových variant), které úspěch TKKB spolupodmiňují, a které by mohly být využívány např. i pro předpověď některých komplikací po TKKB. V této práci jsme se proto zaměřili na vyšetření 22 kandidátních polymorfismů, ležících na dvanácti genech, které by mohly mít spojitost s průběhem TKKB a posttransplantačního období, zejména pak se vznikem a rozvojem GVHD, ať už v akutní nebo chronické formě.

Všech 22 polymorfismů bylo genotypizováno technikou „MassArray“ a následně byly vybrány tři polymorfismy pro ověření správnosti výsledků této metody. K ověření byly využity dvě různé modifikace techniky polymerázové řetězové reakce (PCR). Dva polymorfismy, ležící na genech *ANXA11* a *TLR4*, byly ověřovány metodou qRT PCR s próbami TaqMan. Třetí polymorfismus, ležící na genu *ATXN2L*, byl vyšetřován metodou PCR-SSP.

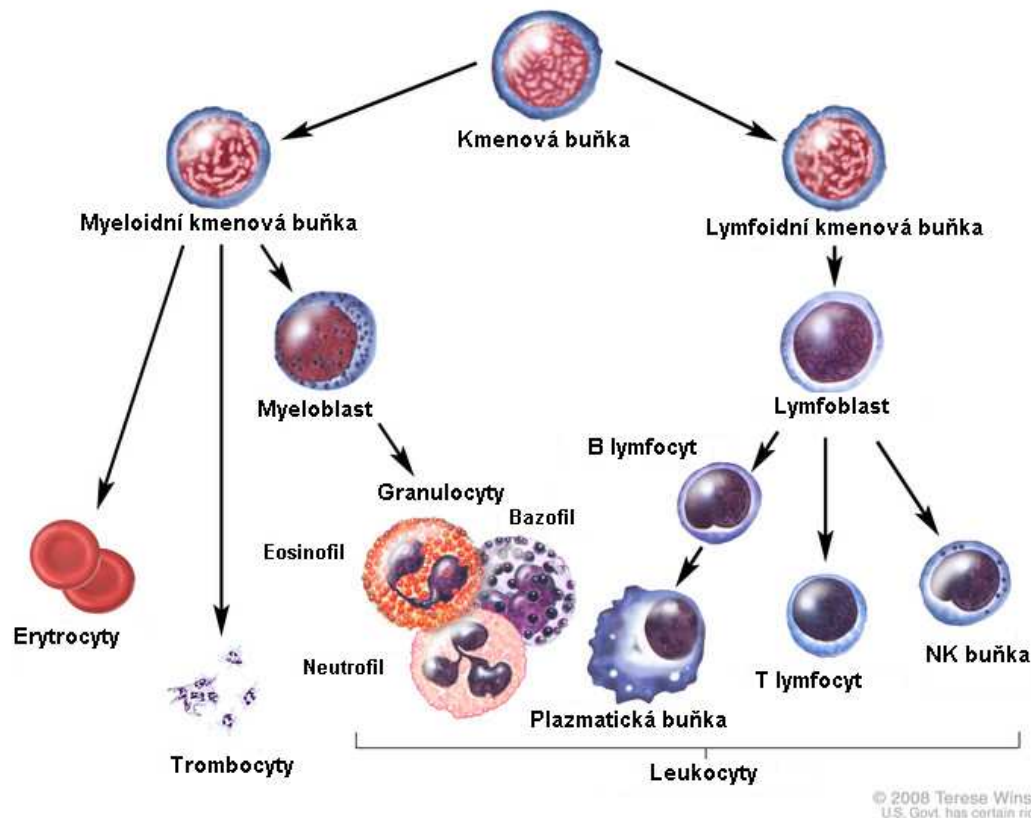
## 1.2. Historie, definice a indikace TKKB

TKKB lze definovat jako převod pluripotentních krvetvorných buněk dárce do organismu příjemce. Hlavním cílem je, aby transplantované kmenové buňky osídlily kostní dřeň příjemce, kde se z nich následně spustí efektivní krvetvorba.

Krvetvorné kmenové buňky vznikají v kostní dřeni, kterou můžeme rozdělit na červenou krvetvornou kostní dřeň a žlutou tukovou (množství narůstá s přibývajícím věkem). V pozdním věku se žlutá kostní dřeň mění v šedou. V případě nutnosti se žlutá tkáň může částečně aktivovat, šedá nikoliv. Kostní dřeň tvoří výplň dřeňové dutiny kostí, v dospělosti je zachována pouze v plochých kostech (žebra, hrudní kost, pánev, obratle) a v kloubních koncích dlouhých kostí. Zodpovídá za tvorbu většiny krevních buněk, za jejichž vznikem stojí pluripotentní hematopoetická kmenová buňka, ze které dělením vzniká nová kmenová buňka (aby zůstala zachována kapacita pro další krvetvorbu), a pak také multipotentní buňka, ze které se dále vyvíjejí erytrocyty, leukocyty a trombocyty (Obr. 1).

Historie TKKB sahá až do začátku druhé poloviny 20. století a s jejím počátkem a vývojem je spjata jméno Edwarda Donnala Thomase, kterému byla spolu s Josephem Edwardem Murraym za výzkum této problematiky udělena roku 1990 Nobelova cena v oblasti fyziologie a lékařství (<http://www.nobelprize.org>). Poté, co bylo zjištěno, že kostní dřeň je hlavním místem krvetvorby, chyběl už jen krok k myšlence, že její transplantace by mohla pomoci řešit různá onemocnění krve. K vývoji znalostí o možnostech TKKB také napomohly experimenty s jadernou energií a s tím spojené případy nemoci z ozáření, jejichž projevem je právě závažné poškození krvetvorby. Zpočátku byly prováděny pokusné TKKB na zvířatech, zejména u myší a psů (Congdon C. C. & Urso I. S., 1957). Jedny z prvních TKKB u člověka však byly provedeny už na konci padesátých let, kdy byla člověku po ozáření a chemoterapii podána infuze kostní dřeně (Thomas E. D. et al, 1957). Následně byla transplantace

provedena také dvěma dětským pacientkám, které trpěly akutní leukémií. Nejdříve podstoupily ozáření celého těla a poté jim byla transplantována kostní dřeň sourozence. V obou případech se jednalo o jednovaječná dvojčata (Thomas E. D. et al., 1959).



**Obr 1:** Zjednodušený popis vzniku krevních buněk. Převzato z <http://visualsonline.cancer.gov>.

Významným mezníkem v oblasti TKKB se stal objev MHC komplexu (z angl. Major Histocompatibility Complex, hlavní komplex tkáňové slučitelnosti), u člověka označovaného jako HLA (z angl. Human Leukocyte Antigens), ke kterému došlo na přelomu 50.-60. let a za nějž byla také roku 1980 udělena Nobelova cena. Jedná se o soubor tkáňových znaků na povrchu leukocytů (strukturně jsou to glykoproteiny), jejichž geny leží na krátkém raménku 6. chromozomu. Shoda v HLA znacích je důležitým kritériem při alogenních transplantacích včetně TKKB a významnou měrou ovlivňuje jejich úspěšnost.

Přestože vlastní převod krvetvorných buněk je technicky poměrně nenáročný, pro úspěch TKKB má zásadní význam diagnostika (včetně metod molekulární genetiky) a následná podpurná léčebná péče. Důležitými faktory při vývoji TKKB tak byly i objevy a

zavádění nových léků, např. imunosupresiv. Jedním z takových byl i cyklosporin A, který se podával jako imunosupresivum, aby se snížilo riziko rejekce štěpu a jiných komplikací po transplantaci. Vykazuje poměrně vysokou specifitu k buňkám imunitního systému, ale později bylo zjištěno, že je nefrotoxický (Morris S. M. jr. et al., 1992). Ke zvyšování úspěšnosti transplantací zásadně přispěla i dostupnost dalších léků, jako jsou antibiotika, růstové faktory krvetvorby a jiná nová imunosupresiva.

Existují různé typy onemocnění, které vyžadují transplantaci krvetvorných buněk a nejedná se jen o nejčastěji uváděná maligní onemocnění krevních buněk (zejména leukémie). K autologním transplantacím (vysvětlení termínů autologní/alogenní TKKB je v následujícím textu) se přistupuje v případě, že choroba nepoškodila pacientovy vlastní krvetvorné buňky. Tento postup lze tedy využít u pacientů s nádory mízních uzlin (lymfomy), u vybraných nádorů krevního původu (jako je například mnohočetný myelom), u určitých typů leukémií (bez poškození kmenových buněk); určitou dobu se používal také při léčbě solidních nádorů (nádory prsu, varlat nebo také u dětí).

Naproti tomu alogenní transplantace je nezbytná v případech, kdy má pacient poškozeny základní krvetvorné kmenové buňky. Tento typ transplantace je rizikovější, ale zároveň mohou dárcovské T-lymfocyty vyvolat protinádorový „imunoterapeutický“ efekt (GvL, z angl. Graft versus Leukemia - reakce štěpu proti leukémii nebo štěpu proti nádoru) a pomoci tak doléčit zbytky původní nemoci pacienta. Nejčastěji se využívají při leukémiích s nepříznivou prognózou a vážných poruchách krvetvorby (těžká aplastická anémie, myelodysplastický syndrom). Alogenní TKKB může pomoci také při léčbě vrozených metabolických poruch, imunodeficitů či velmi těžkých forem autoimunitních onemocnění. Indikací pro transplantaci tedy nemusí být jen nádorová onemocnění.

Při rozhodování, který typ transplantace je vhodnější, může být rozhodující i věk pacienta. Autologní a syngenní transplantace se většinou provádějí až do 75 let věku pacienta, u alogenních transplantací je akceptovatelná věková hranice snížena přibližně o 10 let.

### 1.3. Typy TKKB

Transplantaci krvetvorných kmenových buněk lze dělit podle typu dárce na:

#### a) Autologní

Dárce a příjemce jsou tentýž jedinec. Výhodou je, že zde není rozdíl v HLA znacích ani jiných genetických systémech mezi dárce a příjemcem, čímž se eliminují aloimunitně zprostředkované komplikace, jako je rejekce nebo reakce štěpu proti hostiteli. Krvetvorné buňky se pacientovi odebírají ve stádiu remise onemocnění, tedy v době, kdy nejsou patrné žádné příznaky, nebo v období minimální aktivity choroby. Odebrané buňky je nutné až do doby jejich použití zmrazit. Do těla pacienta jsou vpraveny až po přípravných fázích (zejména podání chemoterapie), které před transplantací probíhají. Pokud pomineme využití pro transplantaci krvetvorných kmenových buněk, je tento typ transplantací nejčastěji využíván při transplantacích kožních štěpů.

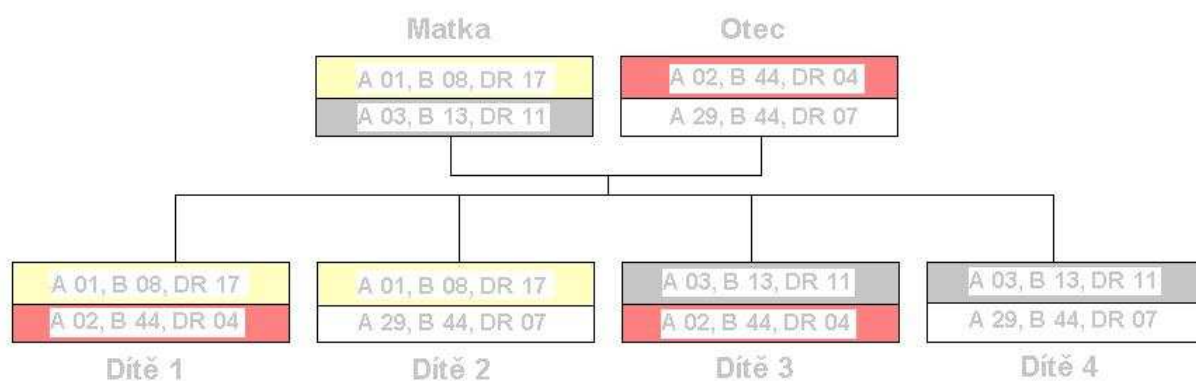
#### b) Alogenní

Je přenos transplantátu (štěpu) mezi dvěma jedinci v rámci jednoho živočišného druhu. Jedná se o nejčastější druh klinické transplantace. Podle míry shody v HLA znacích a dalších systémech tkáňové slučitelnosti mezi dárce a příjemcem je následně po transplantaci v různém rozsahu indukována aloimunitní reakce (rejekce, reakce štěpu proti hostiteli). Dárci pro TKKB jsou nejprve hledáni mezi příbuznými pacienta, kde je větší pravděpodobnost pro shodu v HLA znacích. Dárci se pak nejčastěji stávají sourozenci pacienta (Obr. 2). Pokud není nalezen vhodný dárce mezi příbuznými, přistupuje se k vyhledávání v registru dárců kostní dřeně (ke dni 31. 1. 2013 obsahoval Český národní registr dárců dřeně 40 280 osob, celosvětově je to pak téměř 21 miliónů osob, zdroj: [www.kostnidren.cz](http://www.kostnidren.cz)). I při tak vysokém počtu dostupných dárců se ne pro každého pacienta podaří najít dárce s úplnou shodou v HLA znacích, proto je v těchto případech transplantace realizována s jednou nebo i více neshodami. To je však obecně spojeno s nižší úspěšností transplantace.

#### c) Syngenní

Je to v podstatě specifický typ alogenní transplantace. V tomto případě jsou dárce a příjemcem jednovaječná dvojčata, která mají shodnou genetickou výbavu. Výhody této transplantace kmenových buněk jsou obdobné jako u transplantace autologní, nedochází tedy k aloimunitním reakcím a s nimi spojeným posttransplantačním komplikacím, jako je odhojení a GVHD.

Zvláštním typem je xenogenní transplantace, která se však nevyužívá pro TKKB u člověka. V tomto případě se jedná o mezidruhový přenos, v klinickém pojetí tedy transplantaci z jiného živočišného druhu (většinou prasete) na člověka. Tyto transplantace jsou poměrně ojedinělé, často mají experimentální charakter a prakticky se využívají např. při neurochirurgických zákrocích (použití zvířecích perikardů k překrytí různých defektů). Samotná xenotransplantace vyžaduje zpravidla složité zpracování materiálu vedoucí ke ztrátě většiny imunogenní reaktivity. To je nutné hlavně kvůli nekompatibilitě T-lymfocytů příjemce a povrchových antigenů xenotransplantátu, a také kvůli přirozeným protilátkám proti sacharidovým strukturám, což by způsobilo hyperakutní rejekci štěpu (Krejsek J. & Kopecký O., 2004).



**Obr. 2: Dědičnost HLA znaků:** Přenos genů HLA probíhá v konzervovaných klastrech na krátkém raménku 6. chromozomu, které se označují jako HLA haplotypy a řídí se klasickou Mendelovskou dědičností. Za normálních okolností má každý jedinec dva HLA haplotypy, které zdědil od svých rodičů (jeden od matky a druhý od otce). Z toho vyplývá, že u dětí jsou celkem čtyři základní možnosti kombinací HLA haplotypů. Šance kompletní shody v HLA haplotypech mezi sourozenci je tedy 25%. V některých výjimečných případech může docházet ke změně haplotypu v důsledku rekombinace v oblasti HLA komplexu během meiózy (crossing-over), což průměrnou pravděpodobnost shody mezi sourozenci celkově mírně snižuje.

## 1.4. Zdroje krvetvorných kmenových buněk

K získání krvetvorných kmenových buněk pro transplantaci lze využít různé zdroje, které se liší celkovým obsahem kmenových buněk, způsobem a obtížností jejich získání a také zpracováním získaného štěpu. Předmětem našeho zájmu jsou pluripotentní krvetvorné kmenové buňky, které na svém povrchu nesou diferenciační znak CD34 a podle něj jsou rozpoznávány. Tyto buňky mají schopnost se diferencovat ve všechny plně funkční krevní buňky.

### a) Kostní dřeň

Obsahuje cca 1 % pluripotentních kmenových buněk. Dárci se štěp odebírá přímo z dutiny pánevní kosti za pomoci punkčních jehel a tento zákrok probíhá v celkové anestézii. Po nezbytných úpravách „surového“ štěpu jsou následně pacientovi infúzí do těla vpraveny krvetvorné kmenové buňky v množství podle jeho hmotnosti.

Z důvodu vysoké pravděpodobnosti obsahu nádorových buněk ve štěpu kostní dřeně i v období remise onemocnění, je využití kostní dřeně pro autologní transplantace značně omezené. Ale své využití nabízí v případě, že člověk má kryokonzervovaný vzorek kostní dřeně, jak tomu bývá u osob pracujících na rizikových pracovištích (např. jaderné elektrárny).

Mnohem častější je využití kostní dřeně pro alogenní transplantace, kde je však třeba zajistit maximální histokompatibilitu mezi dárce a příjemcem. Neshody ve znacích tkáňové slučitelnosti (zejména HLA) na jedné straně mohou vyvolat žádoucí GvL reakci proti nádoru (z angl. graft-versus-leukemia), ale na druhou stranu se výrazně zvyšuje riziko závažné GVHD a neúspěchu TKKB.

### b) Periferní krev

Využití kmenových buněk z periferní krve má své výhody i nevýhody. Periferní krev obsahuje jen velmi malý podíl pluripotentních kmenových krvetvorných buněk, přibližně 0,01 až 0,001 %. Dárcům jsou proto před odebráním štěpu kmenových buněk aplikovány rekombinantní růstové faktory rGM-CSF (z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) nebo rG-CSF (z angl. granulocyte colony-stimulating factor), aby byla stimulována krvetvorba a kmenové buňky byly ve velkém počtu vyplaveny do periferní krve. Uvedené růstové faktory jsou běžně přítomny v těle a regulují množství krvinek v krevním oběhu. Pokud jsou dárci aplikovány ve vysokých dávkách, můžeme dosáhnout až šedesátinásobného zvýšení počtu kmenových buněk v periferní krvi.

Kmenové buňky z periferní krve nejčastěji využíváme pro autologní transplantace. V tomto případě nedochází v přípravném režimu k úplné cytodepleci kostní dřeně. Pacientovi jsou v období remise podávány růstové faktory ke stimulaci obnovy



krvetvorby. Následně jsou pluripotentní kmenové buňky z krve získávány opakovanou leukaferesou, dokud nezískáme dostatečný počet CD34<sup>+</sup> buněk. V tomto případě je za dostačující považován obsah cca 5 x 10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup> buněk/kg příjemce. Periferní krevtorné kmenové buňky jsou v současné době zcela běžně využívány také k alogenní transplantaci (po provedení leukaferesy u dárce).

Získaný štěp krevtorných buněk je možné před transplantací podle potřeby různě upravovat. Například použitím kolon se specifickými protilátkami proti znaku CD34 můžeme zvýšit podíl CD34<sup>+</sup> buněk ve štěpu nebo za použití monoklonálních protilátek odstranit kontaminující nádorové buňky. Pokud je štěp použit pro alogenní transplantaci, je možné pomocí monoklonální protilátky odstranit T-lymfocyty, a tím omezit GVHD. Tím se ale snižuje pravděpodobnost přihojení štěpu a také to vede k omezení příznivé reakce typu GvL.

### **c) Pupečnicková krev**

Obsah krevtorných kmenových buněk v pupečnickové krvi je poměrně vysoký a dosahuje přibližně hodnoty 1 %, tedy podobně jako u kostní dřeně. Nevýhodou však je, že v placentárních cévách je celkový objem krve jen okolo 150 ml, a tak ji lze často využít jen pro transplantace u malých dětí nebo osob s nízkou hmotností. Za srovnatelné úrovně shody v HLA znacích je transplantace pupečnickové krve spojena s nižším výskytem GVHD. Zároveň s tím je zde však vyšší riziko relapsu maligních krevních onemocnění, a to z důvodu oslabené reakce GvL, protože štěp obsahuje jen malý počet vyzrálých T-lymfocytů. Na rozdíl od dalších dvou typů transplantací (kostní dřeň, periferní kmenové buňky) je u pupečnickové krve delší období mezi podáním štěpu a obnovením krevtvorby. Mezi výhody pupečnickové krve patří velmi malé riziko přenosu infekce, dárce není zatěžován odběrem a již zmíněný omezený výskyt GVHD.

## **1.5. Provedení TKKB**

### **1.5.1. Předtransplantační režim (conditioning)**

Před samotnou transplantací pacient podstupuje přípravný režim (chemoterapie, celotělové ozáření), který má za úkol zničit postižené (nádorové) buňky a usnadnit přístup zdravým transplantovaným buňkám. Velmi důležitou složkou přípravného režimu je imunosuprese, která má zamezit rejekci štěpu. O rejekci štěpu mluvíme

v případě, pokud postupně dochází k útlumu dárcovské krvetvorby a opět se objevuje krvetvorba původní. Podle předtransplantačních postupů dělíme přípravný režim na dva základní typy:

#### **a) Myeloablativní**

Spočívá ve využití vysokých dávek radioterapie a/nebo chemoterapie. Je zde nižší riziko relapsu choroby nebo rejekce štěpu, je však velmi toxický i pro zdravé buňky. Co se týče chemoterapie, většinou je podávána kombinace různých cytostatik (např. cyklofosamid a busulfan). Pokud je použita radioterapie, většinou je to v kombinaci s chemoterapií, kdy se k celotělovému ozařování přidá i dávka cytostatik. Kromě důležité imunoprese ničí přípravný režim nádorové buňky.

#### **b) Nemyeloablativní**

Jedná se o přípravný režim s redukovanou intenzitou. Je u něj taktéž použita radioterapie a/nebo chemoterapie, avšak v nižších dávkách. Soustředí se především na imunopresi, která navodí dostatečnou imunotoleranci k dárcovským T-lymfocytům, které mají následně nádor zlikvidovat zásluhou GvL efektu.

Při léčbě některých nemaligních onemocnění (např. aplastická anémie) nebo závažných imunodeficitů je možné podat pacientovi transplantát, aniž by podstoupil některý z přípravných režimů. Nezbytná je pouze imunoprese.

### **1.5.2. Transfuze kmenových buněk**

Samotné podání krvetvorných kmenových buněk je relativně jednoduchý postup, kdy je pacientovi dárcovský štěp podán intravenózně. Kmenové buňky při cirkulaci krví jsou schopné se samy usadit v kostní dřeni (tzv. homing) a během několika týdnů (cca 2-3 týdny) zde dát vzniknout nové krvetvorbě.

### **1.5.3. Posttransplantační období**

Po transplantaci nastává kritické období, při kterém může dojít k rozvoji řady nebezpečných komplikací. Často dochází k rozvoji GVHD, pacienta ohrožují různé infekce a orgány jsou ohroženy v důsledku přípravného režimu, který je pro ně toxický. V tomto období se především pokračuje v imunopresivní léčbě, aby se zvýšila šance pro přijetí štěpu.

V posttransplantačním období také nastává tzv. buněčný chimérismus, který je spjat s alogenní transplantací. V podstatě se jedná o to, že vedle sebe existují dárcovská a pacientova buněčná populace. Má různé důsledky, jedním z nich může být změna krevní skupiny v případě neshody v ABO systému mezi dárcem a příjemcem, nebo pokud je dárcem muž a příjemce žena, pak lze u pacientky po transplantaci detekovat

v periferních kmenových buňkách mužský pohlavní chromozom Y. Podle chimérizmu můžeme usoudit, zda došlo k přihojení štěpu, proto je v posttransplantačním období pečlivě sledován. Chimérizmus obecně dělíme na kompletní a smíšený. Při kompletním chimérizmu není v těle příjemce detekována žádná původní krvetvorba. Při smíšeném chimérizmu je v periferní krvi nebo kostní dřeni pacienta patrná přítomnost jak buněk dárcovských, tak i buněk původních. Tento stav je běžný krátce po transplantaci, avšak v pozdější době je nepříznivý - značí rejekci štěpu nebo relaps choroby.

## **1.6. Komplikace TKKB se zaměřením na aloimunitně zprostředkované reakce (zejména GVHD)**

Po TKKB mohou nastat různé komplikace. Dle období jejich výskytu lze komplikace TKKB dělit na časně a pozdní. Výrazně záleží na tom, zda se jedná o transplantaci alogenní nebo autologní. U autologních transplantací je riziko komplikací obecně nižší (nevyskytuje se zde GvHD ani rejekce štěpu).

Jednou z hlavních komplikací alogenních TKKB je tedy GvHD (graft versus host disease = reakce štěpu proti hostiteli). Pokud se objeví brzy po TKKB, jedná se o akutní GvHD, pokud až v pozdější době (cca po 3 měsících od transplantace), označuje se jako chronická GvHD. Protože je tato práce z velké části zaměřena na GVHD, bude o ní podrobněji pojednáno níže.

### **1.6.1. Časné komplikace**

Časné komplikace se objevují v prvním čtvrtroce po transplantaci. V této době je pacient kromě již zmiňované akutní GvHD ohrožen také krvácením nebo různými infekcemi, které se objevují z důvodu oslabeného imunitního systému. Nepříznivý vliv má už vlastní toxicita přípravného režimu, ať už se jedná o celotělové ozáření nebo chemoterapii. Organismus pacienta je přípravným režimem, který mimo jiné snižuje počet leukocytů (zvláště neutrofilů), značně zatížen. Po transplantaci je také zvýšena náchylnost zejména k virovým, protozoálním a mykotickým infekcím a to z důvodu buněčné a humorální imunosuprese. Nejčastější časnou komplikací TKKB je mukozitida (zánětlivé postižení sliznice dutiny ústní), u které je možnost prevence podáním paliferminu (rHuKGF). U alogenní TKKB nemusí vždy dojít k přihojení štěpu (tzv. engraftment) - štěp může selhat nebo být odvržen (rejekce) imunitními

mechanismy. Jako přihojení štěpu je označován stav, kdy po obnově krvetvorby počet dárcovských buněk dosáhne určité hodnoty, v tomto případě je to více jak  $500 \times 10^6$  neutrofilů v jednom litru krve. V případě selhání štěpu však k přihojení vůbec nedojde v důsledku nedostatečného uchycení dárcovských buněk. Naopak rejekce se projevuje zpravidla až po engraftmentu, kdy postupně dochází k úbytku dárcovských buněk. Někdy je také nazývána jako sekundární selhání (Wolff S. N., 2002). Za odhojením štěpu stojí reakce imunologického systému příjemce, který rozpoznává v dárcovském štěpu neidentické složení v HLA a nonHLA antigenech.

### **1.6.2. Pozdní komplikace**

K pozdním komplikacím dochází v období přibližně od stého dne po transplantaci a mohou setrvávat i několik měsíců či let poté. Stejně jako u časných komplikací sem řadíme infekce (např. CMV, toxoplazmóza, EBV nebo pásový opar) i GVHD. V tomto případě však nikoliv akutní, ale chronickou formu GVHD. U poměrně vysokého počtu pacientů dojde k relapsu choroby, jehož riziko závisí na druhu maligního onemocnění a typu transplantace. Zvýšené riziko návratu onemocnění je pozorováno zejména u autologních transplantací, kdy je omezena reakce štěpu proti leukémii (GvL, imunoterapeutický efekt transplantace). Významnou komplikací je selhání zárodečných tkání, kdy v důsledku přípravných režimů dochází k poškození pohlavních orgánů, které jsou velmi citlivé na počáteční agresivní léčbu. Muži mají možnost, pokud to jejich stav dovoluje, nechat si před samotným zákrokem sperma zmrazit. Přípravný režim má také vliv i na jiné žlázy s vnitřní sekrecí, jako je např. štítná žláza (hypotyroidismus). U vysokého počtu pacientů po nefrakcionovaném celotělovém ozáření se po 3-4 letech objevuje šedý zákal. Přibližně čtvrtina pacientů trpí plicním postižením, kdy je tento stav spojen s deficitem imunoglobulinů a účastí dárcovských T-lymfocytů. Riziko plicního postižení zvyšuje celotělové ozáření a přítomnost cGVHD. Závažným plicním onemocněním s vysokou mortalitou je bronchiolitis obliterans (Chien J. W. et al., 2010). Dále také u pacientů dochází k slizničním postižením (porucha tvorby slin a slz), postižení kloubů a kostí a výjimkou není ani vznik sekundárních nádorů. U dětí pak může docházet k poruchám růstu.

### **1.6.3. GVHD**

GVHD patří mezi aloimunitně zprostředkované komplikace TKKB a projevuje se jako reakce transplantovaných T-lymfocytů dárce na neznámé struktury (antigeny) pacienta. Spouštěcím mechanismem GVHD jsou aloreaktivní dárcovské T-lymfocyty, které jsou aktivovány antigeny příjemce, jež jsou vystaveny na buňkách hlavního histokompatibilního komplexu I. nebo II. třídy, virovými antigeny nebo vedlejšími

histokompatibilními antigeny asociovanými s epiteliálními buňkami. Následně po aktivaci dárcovské T-lymfocyty proliferují.

K navození GVHD přispívá již uvolnění cytokinů (interleukin-1, TNF) produkovaných monocyty v reakci na přípravný režim. Pomocné CD4+ T-lymfocyty rozpoznávají prostřednictvím svého receptoru antigenní peptidy spojené s HLA molekulami II. třídy. Uvolněný interleukin-2 aktivuje také cytotoxické CD8+ T-lymfocyty, které rozpoznávají zejména antigenní peptidy vázané s HLA molekulami I. třídy. Také NK buňky (z angl. „natural killer“) a makrofágy se podílejí na rozvoji GVHD. Podskupina aktivovaných CD4+ T-buněk mimo jiné produkuje také interferon, který zesiluje expresi MHC molekul II. třídy na epiteliálních buňkách a makrofázích, což dále stimuluje buněčnou aktivaci T-lymfocytů a NK buněk (Ringdén O., 2005).

Z hlediska časového rozvoje a účasti různých imunitních mechanismů rozlišujeme s určitým zjednodušením 5 základních fází GVHD:

- a) Priming – příprava imunitní odpovědi
- b) Aktivace T-lymfocytů, kostimulace
- c) Proliferace a diferenciací aloreaktivních T-lymfocytů
- d) Migrace aktivovaných T-lymfocytů do cílových orgánů (střevo, játra, plíce, kůže)
- e) Poškození cílových tkání efektorovými T-lymfocyty

Klinické projevy GVHD závisí na stupni histokompatibility mezi dárcem a příjemcem a celkové úrovni aloreaktivity štěpu proti různým antigenním strukturám příjemce. Podle toho vzniká poškození cílových tkání příjemce; nejčastěji napadenými tkáněmi jsou epiteliální buňky kůže, slizniční membrány, žlučodvody a střevní trakt. GVHD těžkého stupně je tak bohužel i příčinou velké části úmrtí po transplantaci. Z toho důvodu je nezbytná její profylaxe s využitím imunosupresivních léčiv, jako jsou methotrexát, glukokortikoidy nebo mykofenolát mofetil.

Podle Billingham existují tři základní kritéria, která jsou nutná, aby došlo k rozvoji GvHD (Billingham, 1966), a sice:

- a)** Štěp musí obsahovat imunologicky kompetentní buňky, myšleno T-lymfocyty.
- b)** Buňky příjemce musí exprimovat důležité aloantigeny, které chybí dárcovskému štěpu, takže se mu jeví jako cizí.
- c)** Příjemce nesmí být schopen jakékoliv imunologické reakce, která by mohla zničit transplantované buňky. To je dáno imunosupresí příjemce před transplantací.

**Z hlediska buněčných a molekulárních mechanismů je GVHD členěna do tří základních fází (obr. 3):**

**a) Iniciační fáze** - priming – příprava imunitní odpovědi.

První fáze probíhá již před samotnou transplantací. Přípravný režim, který je vysoce cytotoxický, má za následek široké poškození buněk a tkání pacienta. V této fázi dochází k masivnímu uvolnění prozánětlivých cytokinů (tzv. cytokinové bouři), jako jsou např. INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  nebo TNF- $\alpha$ , a také chemokinů. Zároveň nastává aktivace a dozrávání antigen- prezentujících buněk (APC z angl. antigen presenting cells). Není výjimkou, že je zvýšena exprese molekul HLA I. i II. třídy na buňkách příjemce.

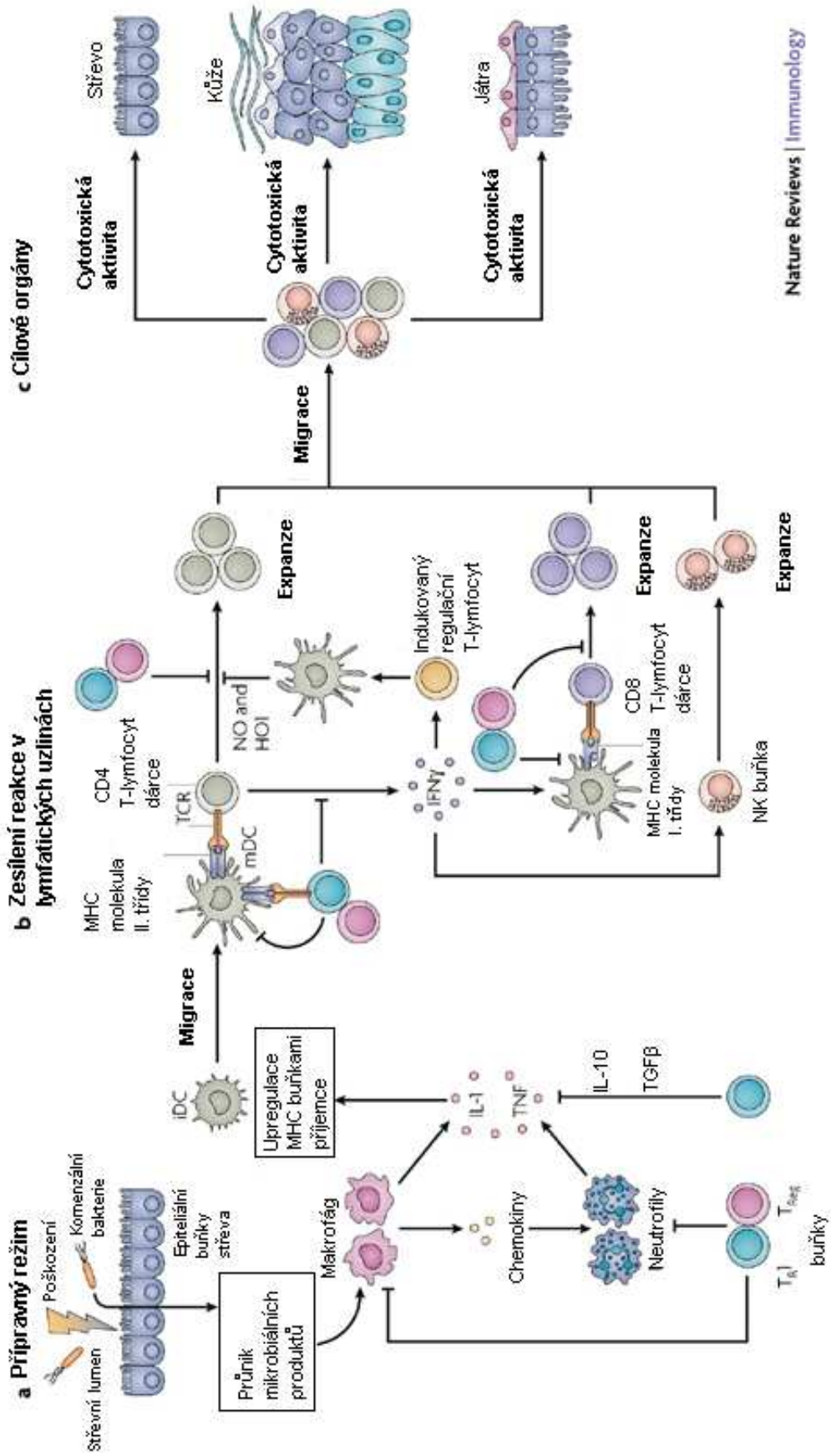
**b) Indukční fáze** – začíná po podání štěpu.

Dochází k rozsáhlé stimulaci a aktivaci dárcovských T-lymfocytů HLA molekulami příjemce. Ty jsou rozpoznávány pomocí TCR (T-cell receptor = receptor T-buněk). Zároveň probíhají kostimulační reakce, na kterých se podílejí molekuly příjemce CD80 a CD86 a reagují s molekulami CD28, které jsou umístěny na T-lymfocytech dárce. Aloreaktivní T-lymfocyty proliferují a diferencují. Další interakce probíhají také mezi adhezivními molekulami buněk (např. PECAM-1 = CD31).

Kromě interakcí, které podporují rozvoj GvHD, se zde vyskytují i jiné, které naopak GvHD tlumí (např. interakce mezi CD152 a CD28).

**c) Efektorová fáze** – je charakterizována migrací aktivovaných T-lymfocytů do cílových orgánů (střevo, játra, plíce, kůže). Poškození cílových tkání je zprostředkováno komplexní zánětovou reakcí, kde hlavní roli hrají cytotoxické T-lymfocyty. Ty jsou schopny rozpoznat buňky nesoucí HLA molekuly příjemce a následně je zničit. Buď přímo s pomocí perforinů a granzymů nebo tím, že u nich indukují apoptózu.

Jak už bylo uvedeno, podle doby nástupu, charakteristických patobiologických mechanismů a charakteru klinických projevů rozlišujeme GVHD na akutní a chronickou formu (Goker H. et al., 2001).



**Obr. 3: Tři fáze aGVHD:** **1.** Přípravný režim vede k poškození a aktivaci tkání příjemce. Tím je umožněna translokace mikrobiálních produktů (např. LPS) do oběhu, což stimuluje makrofágy k sekreci prozánětlivých cytokinů, a také chemokinů, které aktivují neutrofilů (podpora rozvoje zánětu). Zvyšuje se exprese MHC na buňkách příjemce (zejména na antigen prezentujících buňkách, APC). **2.** Aktivace T-lymfocytů dárce, jež jsou přítomny hlavně v lymfatických uzlinách, jimiž se GVHD šíří do cílových orgánů. T-lymfocyty produkují IFN $\gamma$ , který zvyšuje expresi MHC, chemokinů a CD95 na APC. Výsledkem je zvýšená prezentace antigenu a proliferace a diferenciací dárcovských cytotoxických CD8 $^{+}$  a CD4 $^{+}$  T-lymfocytů a NK buněk. **3.** Efektorové buňky migrují k cílovým orgánům. To má za následek jejich poškození, které může vést až k multiorgánovému selhání. Hlavní podíl nese interakce ligand CD95-CD95 a perforin-granzymové dráhy. Regulační T-lymfocyty mohou zasahovat do kontroly GVHD v různých fázích. Regulační buňky blokují aktivaci a expanzi efektorových T-lymfocytů a/nebo regulují funkci APC, monocytů, makrofágů a neutrofilů. V důsledku toho je aktivace a proliferace aloreaktivních dárcovských T-lymfocytů potlačena, což má za následek snížené napadání cílových orgánů. Mimo to, T $_{R1}$  buňky prostřednictvím produkce IL-10 a TGF $\beta$  redukuje zánět. Produkce IFN $\gamma$  v přítomnosti regulačních T-lymfocytů vede k expresi iNOS aIDO s následnou produkcí NO a HO1, které modulují funkci efektorových T-lymfocytů (Roncarolo M. G. & Battaglia M., 2007).  
iNOS (inducible nitric oxide synthase), IDO (indolamine 2,3-dioxygenasa), NO nitric oxide, HO1 (hem oxygenasa 1), TCR (T-cell receptor), DR (dendritic cell), iDR (immature DR), mDR (mature DR), T $_{REG}$  (regulační T-lymfocyt), T $_{R1}$  (regulační T-lymfocyt typu 1)

#### 1.6.3.1. Akutní GVHD

Akutní GVHD se projeví během počátečních 100 dnů od alogenní transplantace, běžně je to však již po 2-6 týdnech od transplantace. Výskyt akutní GVHD závisí zejména na stupni histokompatibility mezi dárce a příjemcem, věku příjemce, zdroji krvetvorných buněk a počtu dárcovských T-lymfocytů ve štěpu, strategii prevence a profylaxe GVHD a dalších méně významných faktorech. Je pro ni typická nekróza postižených tkání.

Za aGVHD zodpovídá subpopulace Th1 lymfocytů, která sekretuje cytokiny IL-2 a IFN $\gamma$ , jež následně aktivují makrofágy a NK buňky. Aktivované makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny IL-1, IL-6 a IL-12, které zpětně ovlivňují aktivaci NK buněk a T-lymfocytů. CD8 $^{+}$  a CD4 $^{+}$  T-lymfocyty a aktivované NK buňky pak napadají cílové buňky příjemce. Výsledkem je nekrotické poškození tkání příjemce (kůže,



gastrointestinální trakt, játra) spojené v závažných formách s poměrně vysokou úmrtností.

Existuje také náhlá bouřlivá forma akutní GVHD nazývaná hyperakutní, která je mnohdy smrtelná, ale naštěstí také poměrně vzácná. Objevuje se v prvním týdnu po transplantaci kostní dřeně a je charakteristická horečkou, celkovou erytrodermií, olupováním kůže, žloutenkou, generalizovaným zánětem a prosakováním cév.

Z klinického hlediska se akutní GVHD dělí podle závažnosti na 5 stádií (0-IV):

- a) 0 – GVHD se neprojevuje.
- b) I – mírná GVHD, místy se vyskytuje kožní vyrážka, která v některých případech mizí i bez další léčby.
- c) II – střední GVHD, objevuje se kožní vyrážka po celém těle nebo může být tato vyrážka spojena s poškozením jater a střev.
- d) III – závažná GVHD, napadená jsou játra, střeva i kůže.
- e) IV – přímé ohrožení života pacienta příznaky GVHD

#### **1.6.3.2. Chronická GVHD**

Chronická GVHD se u pacientů projevuje nejdříve až po 100 dnech od transplantace. Může se přímo vyvinout z akutní GVHD nebo mezi aGVHD a cGVHD může být klidové období. Jen výjimečně se vyskytuje samostatně bez aGVHD. Typická je pro ni fibróza tkání.

Za vznik cGVHD zodpovídá převážně subpopulace Th2 lymfocytů, u nichž nedošlo k navození tolerance, a tak jsou schopny rozpoznávat aloantigeny příjemce. Th2 lymfocyty produkují IL-4 (stimulace B-lymfocytů k tvorbě protilátek a žírných buněk, které jsou zodpovědné za dermální změny), IL-5 (zvýšená eozinofilie) a IL-10.

Klinicky lze rozlišit dvě formy:

- a) Limitovaná – zahrnuje lokalizované postižení kůže a/nebo jaterní dysfunkci.
- b) Extenzivní – je pro ni typické buď generalizované postižení kůže anebo lokalizované postižení kůže s dalšími poruchami (ústní sliznice, pigmentace, sicca syndrom atd.).

Chronická GVHD má projevy podobné jako chronická autoimunitní onemocnění (např. Sjögrenův syndrom nebo sklerodermie). Nejčastějším projevem jsou kožní léze, pro které je charakteristický lymfocytární a plazmocytární infiltrát. Dalším z projevů chronické GVHD je oční sicca syndrom, který je doprovázený sníženou produkcí slz a může při něm dojít k zánětům rohovky. U cGVHD se také vyskytují chronické infekční a plicní komplikace a poruchy jater (Nishimori H. et al., 2013).

Rozvoj a závažnost cGVHD ovlivňuje věk dárce a také pohlaví příjemce a dárce. Konkrétně je-li příjemcem muž a dárce je žena, stoupá riziko cGVHD s počtem předchozích těhotenství dárkyně.

Vzhledem k významnému podílu GVHD (jak akutní, tak chronické) na úmrtnosti po TKKB a jejímu nepříznivému efektu na kvalitu života pacientů po transplantaci, byla v minulosti testována a aplikována řada přístupů k omezení výskytu této komplikace. Jedním z nejčastěji používaných je odstranění (deplece) T-lymfocytů z dárcovského štěpu před jeho aplikací. Byly také vedeny studie, kdy byl pacientům v předtransplantační fázi, kteří podstoupili celotělové ozáření nebo léčbu založenou na busulfanu, podán také anti-thymocytární (thymocyt=T-lymfocyt) globulin s imunosupresivním účinkem. Bylo prokázáno, že se tak u příjemců, kterým byl podán štěp s neúplnou HLA shodou, snížil výskyt jak akutní, tak chronické GVHD a také úmrtnost spojená s transplantací (Ayuk F. et al., 2008).

## **1.7. Hlavní faktory úspěšnosti TKKB – včetně imunogenetických markerů**

Úspěšnost transplantace krvetvorných kmenových buněk závisí na celé řadě faktorů na straně příjemce i dárce. Čím jsou výchozí podmínky pro pacienta příznivější, tím je nižší riziko posttransplantačních komplikací a neúspěchu transplantace. Na základě komplexního zhodnocení těchto faktorů je možné určit prediktivní skóre TKKB, tedy míru rizika pro konkrétního pacienta, přesněji pár pacient/dárce. Prognóza ohledně výsledku se nejčastěji vyjadřuje jako pravděpodobnost přežívání pacienta v určitém období po transplantaci. Jak už zde bylo zmíněno, nejdůležitějším genetickým faktorem pro výsledek TKKB je shoda v HLA znacích. Přehled dalších nejvýznamnějších faktorů je shrnut níže.

### **1.7.1. Klinické a demografické faktory**

#### **1.7.1.1. Diagnóza základního onemocnění, jeho „rizikovost“ a stádium**

Většinu těchto významných faktorů lze shrnout do tzv. prediktivního skóre, které uvádí míru rizika. V tomto skóre je mj. zahrnuta doba, která uběhla mezi diagnózou a transplantací. Vhodné načasování TKKB vede totiž k příznivějším výsledkům. Obecně

platí, že čím dříve je transplantace provedena, tím je riziko nižší. Pacient s raným stádiem nemoci má proto větší šanci na úplné vyléčení, i když existují výjimky. Z hlediska doby od diagnózy po TKKB je do prediktivního skóre zahrnuta hodnota 0 pro dobu kratší jak 12 měsíců a pro dobu delší hodnota 1. Prediktivní skóre obsahuje také stádium onemocnění s ohodnocením 0, 1 a 2 (nelze použít u pacientů s aplastickou anémií):

- a) Časné stádium (0) - sem patří například akutní leukemie nebo non-Hodgkinský lymfom v prvním období remise či chronická myeloidní leukemie v první chronické fázi.
- b) Pokročilé stádium (1) - zahrnuje např. akutní leukemii v období druhé remise, non-Hodgkinský lymfom v období druhé nebo částečné remise nebo ve fázi trvalého onemocnění.
- c) Pozdní stádium (2) - zahrnuje např. akutní leukemii ve všech dalších stádiích nebo chronickou myeloidní leukemii v blastické fázi.

Dále do prediktivního skóre patří věk pacienta, typ dárce a kombinace pohlaví pacient-dárce (popsáno v dalších podkapitolách). Maximální počet bodů, kterého lze dosáhnout je 7 (Gratwohl A. et al., 2009).

#### **1.7.1.2. Věk a kombinace pohlaví pacienta a dárce**

Věk je významným faktorem u pacienta i dárce. U pacientů je to hlavně z důvodu toxicity přípravného režimu, kdy je vyšší věk většinou spojen s nižší fyzickou odolností. Starší pacienti častěji trpí přidruženými nemocemi (komorbidita), jsou náchylnější k infekcím a tělo má nižší schopnost regenerace. Pomalé hojení poškozených tkání má pak za následek zvýšenou citlivost k dalšímu poškození. S přibývajícím věkem se objevuje větší riziko GVHD v důsledku častější a větší přítomnosti bakterií a virů v organismu. Ovšem od doby, kdy byl vyvinut přípravný režim s omezenou intenzitou, nejsou výjimkou transplantace i u starších pacientů (65-70 let). Prodloužení věku k indikaci alogenní TKKB je příznivé, protože právě u starších osob je vyšší výskyt hematologických malignit, které lze pomocí TKKB léčit (Koreth J. et al., 2010). Kromě věku pacienta je potřeba přihlídnout i k věku dárce. Co se týče transplantace mezi nepříbuznými páry, je hranicí pro dárce věk 60 let, poté je automaticky vyřazen z registru dárců kostní dřeně (vzhledem ke zvýšenému riziku při odběru). U příbuzných dárců je tato věková hranice posunuta poněkud výše (závisí na celkovém stavu dárce). Je také prokázáno, že úspěšnost TKKB je nepřímo úměrná věku dárce - transplantace od mladších dárců mají lepší výsledky. Co se týče pohlaví dárců, poněkud lepší výsledky lze pozorovat u dárců mužského pohlaví. Za nejméně příznivou se pak považuje kombinace, kdy je pacientem muž a dárce žena. Důvodem může být

rozpoznání pohlavně specifických vedlejších histokompatibilních antigenů H-Y, což má za následek zvýšenou pravděpodobnost výskytu GVHD, na druhou stranu má tato kombinace pacient-dárce nejnižší riziko relapsu, zejména u pacientů s CML, AML a ALL (Randolph S. S. et al., 2004). Dalším faktorem je také již prodělané těhotenství, při němž ženy prochází aloimunizací. K aloimunizaci dárce může dojít např. také při transfuzi.

#### **1.7.1.3. Zdroj krvetvorných buněk a přípravný režim**

Jak už bylo uvedeno v předchozích kapitolách, významný podíl na vzniku a rozvoji komplikací po TKKB má přípravný režim. Chemoterapie i ozařování spouští v těle pacienta zánětovou reakci, a jelikož se nejedná o léčbu cílenou jen na nádorové či jinak pozměněné buňky, jsou poškozovány i pacientovy zdravé buňky. Proto je možno v případě vyššího rizika TKKB zvolit přípravný režim s redukovanou intenzitou, kde se více spoléhá na využití GvL efektu štěpu. Co se týče zdrojů krvetvorných kmenových buněk, v dnešní době již i u alogenních TKKB mírně převládají odběry z periferní krve, které jsou obecně spojovány s rychlejším nástupem krvetvorby u pacienta (což zkracuje nejrizikovější období po TKKB), avšak mírně vyšším výskytem chronické GVHD ve srovnání se štěpem z kostní dřeně. Štěpy pupečnickové krve mají vyšší toleranci k neshodám v HLA znacích mezi dárce a příjemcem, ale obnova krvetvorby bývá delší.

#### **1.7.1.4. Infekční status dárce**

Velkým problémem u alogenních transplantací krvetvorných kmenových buněk jsou herpetické viry, zejména CMV (cytomegalovirus). Pro pacienta představuje nebezpečí, pokud je CMV negativní a dárce je CMV pozitivní. Pak je zde riziko přenosu infekce, což může vést k následnému rozvoji onemocnění. Zvýšené riziko existuje však i při TKKB od negativního dárce pozitivnímu příjemci nebo jsou-li oba CMV pozitivní. I v těchto případech může dojít k ohrožení pacienta v důsledku možné reaktivity CMV infekce. Incidence infekce je vysoká a může dosahovat až 60%, proto je nezbytná profylaxe a sledování počtu kopií CMV pomocí technik kvantitativní PCR. Tyto nové možnosti diagnostiky umožňují časně zahájení léčby a výrazně tak snižují celkový dopad CMV infekce na mortalitu po TKKB. Příznaky CMV choroby jsou patrné na příslušných orgánech (postižení gastrointestinálního traktu a pneumonie). CMV pozitivita zvyšuje i riziko dalších komplikací po transplantaci, jako je akutní i chronická GVHD, a negativně ovlivňuje přihojení štěpu a přispívá tím k úmrtnosti po TKKB (Nichols W. G. et al., 2002).

## 1.7.2. Genetické faktory

### 1.7.2.1. Shoda v HLA znacích mezi dárce a příjemcem

HLA (z angl. human leukocyte antigens) je hlavní histokompatibilní komplex u člověka. Jedná se o soubor znaků tkáňové slučitelnosti, který je klíčovou imunobiologickou bariérou při TKKB. Geny pro HLA znaky leží na krátkém raménku chromozomu 6 a jejich variabilita genů je extrémně vysoká. Molekuly, kódované těmito geny, jsou glykosylované proteiny tvořící heterodimery, k jejichž expresi dochází hlavně na membránách buněk imunitního systému, ale i na jiných buněčných typech (výjimkou jsou zralé erytrocyty). Na základě funkce a charakteru molekul, které na povrchu buněk tvoří komplexy, rozlišujeme dvě základní třídy HLA molekul. Molekuly **I. třídy**, které se nacházejí na povrchu všech somatických jaderných buněk, komunikují zejména s receptory cytotoxických - CD8+ T-lymfocytů. Mezi antigeny HLA-I. třídy řadíme zejména molekuly HLA-A, B a C. Dále byly objeveny také typy E, F a G, které jsou méně polymorfní, a jejichž funkci z větší části neznáme (HLA-G je například molekula s významem pro navození imunologické tolerance matky vůči plodu v děloze). Molekuly **II. třídy** se vyskytují jen na povrchu některých specializovaných buněk, zvláště na buňkách prezentujících antigen (APC – dendritické buňky, makrofágy, B-lymfocyty). Jejich funkce je spojena s komunikací s receptory CD4+ T-lymfocytů. Mezi HLA-II. třídy řadíme zejména lokusy DP, DQ a DR. Hlavní funkcí molekul HLA je jejich účast v rozpoznávání bezpečných a nebezpečných struktur ve vzájemné kooperaci s dalšími složkami imunitního systému. Pokud jsou cizí antigenní peptidy předloženy prostřednictvím HLA molekul buňkám imunitního systému, dochází ke spuštění kaskády imunitních reakcí, jimiž se organismus brání před napadením různými patogeny a jinými cizorodými látkami (Fučíková T., 1997).

Existují i tzv. HLA geny III. třídy, které se nacházejí na krátkém raménku 6. chromozomu mezi geny HLA-I. a II. třídy a zahrnují geny pro složky komplementu (součást nespecifické humorální imunity, tvoří jej cca 30 sérových a membránových proteinů), cytokiny (např. TNF) a proteiny teplotního šoku (HSP) a další.

Kromě zásadní role HLA antigenů pro transplantace byla prokázána také jejich spojitost s určitými typy onemocnění, zejména autoimunitními. Například již v 70. letech prokázali výzkumníci spojitost mezi antigenem HLA-B27 a ankylozující spondylitidou (Bechtěrevova choroba), která postihuje především páteř v místě křížokýčelního skloubení a někdy i periferní klouby. Je to zánětlivé onemocnění, které může skončit úplným ztuhnutím páteře (Dixon A., 1978).

Dárci pro TKKB jsou na základě shody v HLA znacích nejprve vyhledáváni v rodině, především mezi sourozenci. Každý člověk má dva haplotypy HLA znaků, po jednom od každého z rodičů. Je tedy šance 25%, že budou mít dva sourozenci stejnou HLA výbavu. V ojedinělých případech navíc může dojít k rekombinaci (crossing-over) v HLA oblasti, a tím ke změně haplotypu. Pokud není dárců nalezen mezi příbuznými, přistupuje se k vyhledávání vhodného dárce v registru dárců kostní dřeně.

U nepříbuzenských dárců se míra shody posuzuje podle pěti lokusů na HLA komplexu (A, B, C, DRB1 a DQB1) na úrovni vysokého rozlišení. Hovoříme pak o shodě 10/10 (5 lokusů po dvou znacích). Pro ověření správnosti výsledků se před transplantací provádí verifikační test (ověření HLA typizace z nového vzorku). Pokud není nalezen dárců s úplnou shodou, je možné vybrat i takového, který se neshoduje v jednom či více HLA znacích (tzv. mismatch). Tím se ale zvyšuje riziko posttransplantačních komplikací (zvláště GVHD a rejekce štěpu). Avšak i při úplné shodě se vyskytují aloimunitní komplikace, které jsou podmíněny vedlejšími (minor) histokompatibilními systémy, vliv na výskyt komplikací mají také další tzv. nonHLA polymorfismy (např. polymorfismy v genech cytokinů, receptorů pro buňky imunitní odpovědi aj.).

Význam aloprotilátek (např. antiHLA protilátek) je obecně u TKKB menší, než u orgánových transplantací a je stále předmětem intenzivního studia. Aloprotilátky se v těle pacienta mohou tvořit již před transplantací (příčinou je např. krevní transfuze nebo opakovaná těhotenství). Některá pracoviště proto před samotnou transplantací provádějí laboratorní testy na přítomnost preformovaných protilátek ve formě screeningových testů nebo tzv. křížových zkoušek (cross-match). Při tomto testu je inkubováno sérum příjemce s lymfocyty dárce. Jestliže dojde k lýze dárcovských lymfocytů, znamená to, že test je pozitivní a v séru příjemce jsou přítomny aloprotilátky. Pozitivní test může mít negativní dopad na TKKB, neboť zvyšuje riziko rejekce štěpu krvetvorných buněk (Hořejší V. & Bartůňková J., 1998).

### **1.7.2.2. nonHLA faktory**

#### **a) Vedlejší histokompatibilní antigeny (mHag)**

Vedlejší histokompatibilní antigeny označované také jako mHag nebo MiHA (z angl. minor histocompatibility antigens) jsou většinou jednoduché polymorfismy strukturních genů. Většina z nich je prezentována ve vazbě na hlavní histokompatibilní antigeny (například HA-1 a HA-2 ve vazbě na HLA-A2). Tyto alelické aloantigeny mohou být zodpovědné za rejekci štěpu v případě shody v hlavním histokompatibilním komplexu.

V jiných případech však naopak mohou mít pozitivní vliv jako v případě GvL efektu či snížení výskytu relapsů leukemie v případě, že příjemce je HA-1 pozitivní a dárce HA-1 negativní (Murata M. et al., 2000). Příkladem jiného mHag může být mužský specifický antigen H-Y. Tento antigen má efekt u TKKB v případech, kdy dárce je žena a příjemcem muž. Důsledkem mohou být až závažné formy akutní i chronické GVHD, což vede k celkově horšímu přežívání pacientů po transplantaci v uvedené kombinaci pohlaví (Perreault C. et al., 2013).

### **b) Geny pro cytokiny**

Cytokiny jsou bílkovinné mediátory, které se podílejí na komunikaci mezi buňkami imunitního systému i mezi imunitním systémem a jinými tělními soustavami. V těle se nacházejí buď vázané na membránu nebo rozpuštěné v plazmě nebo tkáňové tekutině. Jeden cytokin může podávat více podnětů (pleiotropní účinek), a také naopak více cytokinů může mít stejný či podobný účinek. Cytokiny hrají roli v mnoha fyziologických procesech, kdy spolu mohou interagovat synergisticky nebo antagonisticky. Velkou měrou se podílejí na regulaci zánětu v těle. Účastní se jak fáze indukční tak efektorové a mají podíl i na reparaci tkání v terminální fázi zánětu. Dále ovlivňují proliferaci a diferenciaci buněk imunitního systému a jejich migraci. Cytokiny lze na základě funkce rozlišit na šest základních skupin – cytokiny regulující krvetvorbu (GM-CSF, erythropoetin, SCF), interferony (IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), cytokiny regulující T a B lymfocytární systém (IL-2, IL-12), pluripotentní prozánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6), tumor nekrotizující faktory (TNF $\alpha$  a  $\beta$ ), cytokiny regulující převážně cílený pohyb buněk (chemokiny – MCP-1, IL-1) a růstové faktory (TGF $\beta$ , KGF).

Velkou roli hrají při TKKB, kde jsou kritickými mediátory většiny komplikací (GVHD, rejekce). Už při přípravném režimu dochází k obrovskému uvolnění cytokinů (tzv. cytokinová bouře), a tím je urychlena aloreaktivita po podání štěpu. V minulosti již byla popsána řada asociací mezi alelickými variantami cytokinových genů a komplikacemi po TKKB. Například spojení polymorfismu IL-10 se vznikem cytomegalovirové infekce nebo chemokinu MCP-1 s reaktivací CMV u pacientů po TKKB (Loeffler J. et al., 2006). Polymorfismy genu pro IL-10 a také v kombinaci s genem pro jeho receptor IL-10R $\beta$  navíc ovlivňují závažnost akutní i chronické GVHD (Sivula J. et al., 2009). Také u cytokinu TNF, který je zapojen do komplikací po aloTKKB, byla popsána asociace jeho genových variant s výskytem akutní GVHD a s ní spojené úmrtnosti po TKKB (Cavet J. et al., 1999).

### **c) Geny receptorů NK buněk (KIR)**

Aloreaktivita NK buněk je významná pro efektivní odstranění nádorových buněk po TKKB. Aby došlo k biologické aktivaci NK buněk, musí být přítomny receptory pro MHC glykoproteiny I. třídy, které jsou u člověka kódovány tzv. KIR (z angl. killer immunoglobuline-like receptor) geny. Interakce s ligandem HLA I. třídy představuje pro NK buňku prominentní negativní signál. To znamená, že negativní signál (prostřednictvím inhibičních KIR) dominuje i v případě, že současně dojde ke spuštění aktivačního signálu (aktivační KIR nebo jiné receptory). Z hlediska jejich organizace a variability existuje určitá podobnost mezi KIR geny a HLA geny. Jsou uspořádány do velkých genových klastrů - HLA na krátkém raménku chromozomu 6, KIR geny jsou součástí LCR (z angl. leukocyte receptor complex) na dlouhém raménku chromozomu 19. K dědičnosti jednotlivých haplotypů dochází nezávisle na sobě.

HLA a KIR geny spolu funkčně interagují na několika úrovních. Pro transplantace je klíčová interakce na úrovni vývoje imunitního systému. HLA geny I. třídy určují, které KIR-geny budou exprimovány NK buňkami. Každý klon NK buněk exprimuje určitou sestavu KIR-genů, které při interakci s HLA glykoproteiny I. třídy vytvářejí negativní signál, a tím je navozena tolerance na úrovni NK buněk. Pokud je mezi dárcem a příjemcem alelický rozdíl v HLA I. třídy, může se stát, že nebude docházet k inhibici NK buněk dárce, nýbrž k jejich aktivaci, která je zaměřená především proti krevním buňkám příjemce. Důsledkem je žádoucí GvL efekt, snižuje se riziko odhojení štěpu (zaměření proti zbylým T-lymfocytům příjemce) a v neposlední řadě omezuje GVHD (zaměření proti APC příjemce) (Farag S. S. et al., 2002). V poslední době se určení přítomnosti některých KIR genů využívá pro výběr optimálního dárce pro TKKB (Cooley S. et al., 2010). Byla také vedena studie, která prokázala zlepšené přežívání po nemyeloablativním přípravném režimu u pacientů s KIR haplotypem AA, kterým byl podán štěp HLA haploidentického dárce, nesoucí KIR haplotyp B (Symons H. J. et al., 2010).

### **d) Geny vrozené imunity**

Vrozená imunita je nepostradatelná pro obranu proti infekcím, které se často vyskytují po alogenní TKKB a její mechanismy se uplatňují také u GVHD. S vrozenou imunitou souvisí variabilita v cytokinech (viz předešlý bod) a také v receptorech typu „PRRs“ (z angl. pathogen/pattern recognition receptors). Mezi PRRs řadíme především membránové toll-like receptory (TLRs), jejichž aktivací se nejčastěji spouští exprese prozánětlivých cytokinů (IL-1, TNF). Proto byla pro TLRs v minulosti popsána silná asociace se zánětlivými onemocněními. Podobně je tomu u cytoplazmatických PRRs označovaných jako NOD-like receptory (NLRs), kde přes aktivaci NF-κB dochází



k uvolnění prozánětlivých cytokinů. Do této skupiny genů patří dále cytoplazmatické RIG-like receptory (RLRs) a membránový C-tyt lektinových receptorů (CLRs). Nedávný výzkum prokázal, že interakce mezi mikrobiálně asociovanými molekulami PAMPs (z angl. pathogen-associated molecular patterns) a PRRs (např. NLRs a TLRs) ovlivňuje adaptivní imunitní odpověď u řady zánětlivých onemocnění včetně GVHD. Například polymorfismy na genech kódujících NOD2 a TLR4 byly asociovány se zvýšenou incidencí GVHD u pacientů po HSCT, přičemž NOD2 ovlivňuje GVHD na základě svého efektu na funkci APC (Elmaagacli A. H. et al., 2006). Mimo souvislosti s transplantacemi jsou některé alely receptoru NOD2 asociovány také s Crohnovou chorobou (např. Cavanaugh J. A. et al., 2003) a jinými zánětlivými střevními nemocemi.

#### **e) Geny pro adhezivní molekuly**

Adhezivní molekuly jsou důležité mj. pro interakci mezi leukocyty a endoteliálními buňkami. Nacházejí se jak na membráně leukocytů, tak na endotelu cév. Tato interakce je základním podnětem např. pro diapedézu granulocytů do tkání v případě zánětu. Existuje několik skupin adhezivních molekul, které jsou zapojeny do procesů imunitní odpovědi (kadheriny, integriny, selektiny, molekuly imunoglobulinové rodiny aj.).

Kadheriny jsou Ca-dependentní a zprostředkovávají především homofilní interakce buňka-buňka (jsou ligandem i receptorem). Patří sem například E-kadherin (uvomorulin) a desmokolin, nacházející se na epitelech a další. Integriny spojují intracelulární cytoskeleton (buňku) a extracelulární matrix. Jsou účastníky některých signalizačních kaskád. Selektiny (E, P a L) se liší od ostatních adhezivních molekul neváží na proteinové struktury, nýbrž na polysacharidy, které se nacházejí především na endotelu cév. Při navázání ligandu na selektin dochází ke kontaktu mezi leukocyty v krevním řečišti a endotelovými buňkami cév, což vede ke zpomalení toku leukocytů.

Adhezivní molekuly imunoglobulinové rodiny obsahují alespoň jednu Ig-doménu. Existuje jich veliký počet a patří sem například molekuly PECAM-1 nebo VCAM-1. Tyto molekuly se buď mohou vázat mezi sebou nebo s integriny či jinými receptory. Jednou z molekul ovlivňujících komplikace po TKKB je lymfocytární adresin MADCAM1, jehož polymorfismus zvyšuje riziko GVHD a snižuje tak celkové přežívání po transplantaci (Ambrůzová Z. et al., 2009).

## **2. Experimentální část**

## 2.1. Přehled genotypizovaných genů

**ANXA11** (annexin A11) je gen ležící na dlouhém raménku chromozomu 10, kódující protein, který patří do annexinové rodiny, což je skupina kalcium dependentních proteinů vázajících fosfolipidy. Obsahují unikátní N-terminální domény a konzervovanou C-terminální doménu, v níž se nachází kalcium-dependentní místo pro vazbu fosfolipidů. Jsou zapojeny do buněčného dělení a apoptózy a často jsou spojovány s autoimunitními a dalšími chronickými onemocněními. ANXA11 je důležitý v terminální fázi buněčné cytokineze (Levin A. M. et al., 2013).

**ATG16L1** (autophagy-related 16-like 1) se nachází na dlouhém raménku chromozomu 2. Kóduje protein, který je součástí proteinového komplexu zodpovědného v buňce za procesy autofágie. Komplex tvoří ještě proteiny kódované geny *ATG5* a *ATG12*. Uvedený proteinový komplex hraje roli při tvorbě (konkrétně při elongaci) autofagosomu, což je buněčná organela s dvojitou membránou, která pohlcuje buněčný materiál, avšak postrádá lysozomální enzymy. Proto následně dochází k fúzi autofagosomu s lysozymem, který tyto rozkladné enzymy obsahuje (Deretic V., 2006). Autofágie má velký význam pro imunitní systém, kdy dochází k degradaci a recyklaci částic (poškozené organely a proteiny, intracelulární patogeny). Pokud tedy dojde k defektu některého z genů důležitých pro autofágii, může dojít k ovlivnění homeostázy imunitního systému i celého organismu (Heath R.J. & Xavier R.J., 2009).

**ATXN2L** (ataxin 2-like) leží na krátkém raménku chromozomu 16. Funkce proteinu, který tento gen kóduje, je známá jen okrajově. Řadíme jej do rodiny proteinů, která je asociována se skupinou neurodegenerativních poruch (hlavně spinocerebelární ataxie). Dochází u něj k funkčnímu překryvu mezi ATXN2L a ATXN2. Funguje také jako regulátor tvorby stresových granulí a p-tělísek. Díky alternativnímu sestřihu transkriptu jsou vytvářeny různé isoformy (Kaehler Ch. et al., 2012).

**BTNL2** (butyrophilin-like 2) leží na krátkém raménku chromozomu 6. Je asociován s molekulami MHC II. třídy. Patří mezi butyrophilin-like molekuly, které mají homologní strukturu se skupinou kostimulačních molekul CD80/CD86. Ty jsou exprimovány na antigen prezentujících buňkách (APC) a jsou zásadní pro imunitní odpověď. Bylo prokázáno, že BTNL2 inhibuje proliferaci T-buněk a produkci IL-2 a také snižuje tvorbu prozánětlivých cytokinů v T-buněčných kulturách (Morais A. et al., 2012).

**CXCL12** (chemokine motif C-X-C, ligand 12) leží na dlouhém raménku chromozomu 10. Gen kóduje alfa chemokin odvozený od stromálních buněk (často se vyskytuje i pod označením SDF-1 z angl. stromal cell-derived factor 1). Po interakci se svým receptorem CXCR4 dochází k aktivaci lymfocytů. Alternativně může docházet i k interakci s receptorem CXCR7. Tvorba tohoto chemokinu je obvykle vyvolána působením prozánětlivých cytokinů (TNF a IL-1).

Mutace v genu jsou spojovány s rezistencí vůči infekci HIV typu 1. Také je zapojen do vzniku metastáz u některých rakovinných onemocnění, jako je například rakovina prsu. Kromě toho hraje významnou roli v chemotaxi, hematopoéze a angiogenezi. Je klíčový pro tvorbu B-lymfocytů, mobilizaci krvetvorných kmenových buněk a migraci leukocytů a je regulátorem neovaskularizace a apoptózy (Burns J. M. et al., 2006).

**HERC2** (HECT a RLD (= RCC1 like domain) doména obsahující E3 ubiquitin ligasu 2) leží na dlouhém raménku chromozomu 15. Patří do rodiny HERC genů. Tuto skupinu lze rozdělit na 2 podskupiny. První obsahuje velké proteiny s více strukturálními doménami HERC1 a HERC2 s velikostí okolo 500kDa. Druhá zahrnuje malé proteiny s velikostí cca 120kDa. Sem patří HERC3-6. Všechny tyto proteiny mají nejméně 1 kopii N-terminálního regionu homologního s RCC1 (regulátor buněčného cyklu) a C-terminální HECT doménu (homologní s E6-AP (E6-asociovaný protein) C-koncem), která je součástí některých E3 ubiquitin ligas. Variabilita v tomto genu je zodpovědná za rozmanitost v pigmentaci kůže, vlasů a oka (Hochrainer K. et al., 2005). O expresi lidského HERC2 toho není moc známo. Je vzdáleně příbuzný p532 (HERC1), což je tzv. GEF (guanine-nucleotide exchange factor) zapojený do vezikulárního transportu. Ze studie na myších, která ukázala, že HERC2 je zapojený do genetické poruchy způsobující neuromuskulární defekty, můžeme usuzovat, že ovlivňuje vývoj nervové tkáně (Ji Y. et al., 1999).

**IL12B** (interleukin 12B) leží na dlouhém raménku chromozomu 5. Tento gen kóduje podjednotku interleukinu-12, heterodimeru spojeného disulfidovými můstky. *IL12B* kóduje 40kDa velkou podjednotku (p40), druhá podjednotka o velikosti 35kDa (p35) je kódována *IL12A*. Jedná se o cytokin, který cílí na T-lymfocyty a NK buňky a iniciuje různé pochody v buňce, jejichž výsledkem je buněčná imunitní odpověď. Primární funkcí je vyvolat produkci IFN- $\gamma$  aktivovanými NK a T-buňkami a zvýšení cytotoxicity těchto buněk. Cytokin je produkován aktivovanými makrofágy, které se uplatňují jako základní induktory vývoje Th1 buněk. Bylo zjištěno, že IL-12 je důležitý pro udržení dostatečného počtu paměťových nebo efektorových Th1 lymfocytů, aby byla

zprostředkována dlouhotrvající ochrana proti intracelulárním patogenům. Polymorfismy a/nebo zvýšená exprese tohoto proteinu je spojena s některými onemocněními. Produkce IL-12 souvisí s aktivací cestou PRRs (pattern recognition receptors), kam patří například TLRs. Zároveň také ovlivňuje produkci imunoglobulinů, ať už kladně nebo záporně (Korhonen R. et al., 2012).

**IL17F** (interleukin 17F) je gen ležící na krátkém raménku chromozomu 6, který kóduje zralý protein skládající se ze 153 aminokyselin. Kódovaný protein patří mezi cytokiny a obsahuje podobné sekvence jako jiné proteiny z rodiny IL-17. Skupina IL-17 je charakteristická přítomností pěti různých cysteinových reziduí. Je produkován aktivovanými T-lymfocyty jako odpověď na infekční nebo antigenní podnět a následně stimuluje sekreci některých dalších cytokinů, zahrnujících IL-6, IL-8 a CSF2/GM-CSF (faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů). Je to také inhibitor angiogeneze endoteliálních buněk a zároveň u těchto buněk indukuje produkci IL-2, TGF $\beta$  (transformující růstový faktor  $\beta$ ) a monocytový chemotaktický protein 1 (MCP-1 = CCL2, chemokin) (Hizawa N. et al., 2006).

**IL23R** (interleukin 23 receptor) je gen, který leží na krátkém raménku chromozomu 1. Kóduje transmembránový protein, jenž obsahuje 629 aminokyselin a je podjednotkou receptoru pro molekulu **IL23A/IL23**, jejíž genový polymorfismus byl v této práci rovněž testován. Páruje se s molekulou receptoru IL12RB1/IL12R $\beta$ 1 a společně hrají roli v signalizaci IL23A. Je nezbytný pro rozvoj zánětu vyvolaného T-lymfocyty a reguluje diferenciaci naivních CD4 T-buněk na T-pomocné buňky. Také má zásadní postavení ve vývoji patogenních buněk Th17, které produkují IL17, jenž stimuluje produkci zánětlivých cytokinů, jako jsou IL-6 a TNF $\alpha$ . Je zde také asociace s aktivací Janusových kináz (JAK2). JAK kinázy fosforylují IL23R a odkryjí tak dokovací místo pro signální transduktory a aktivátory transkripce (STATs). Ty jsou následně fosforylovány a translokovány do jádra, kde ovlivňují transkripci prozánětlivých cytokinů (IL17) (Zhai Y. et al., 2012).

**RAB32** patří do rodiny Ras onkogenů. Leží na dlouhém raménku chromozomu 6. Rab proteiny jsou malé proteiny vázající GTP a hrají roli ve vezikulárním transportu. Jsou lokalizovány v různých membránově vázaných kompartmentech, kde regulují některé kroky membránového transportu. Uplatňují se například při vzniku vezikul, cyklu mezi neaktivní formou vázající GDP a aktivní vázající GTP nebo také při utváření autofagických vakuol. Rab32 je exprimován ve většině lidských tkání. Může fungovat

jako PKA (proteinkinasa A) kotvíci protein. Taktéž byla zjištěna jeho role při regulaci počátku apoptózy (Bui M. et al., 2010).

**TLR4** (toll-like receptor 4) leží na dlouhém raménku chromozomu 9. Je členem rodiny toll-like receptorů, které jsou zodpovědné za rozpoznání patogenu a aktivaci vrozené imunity. Nalezneme je u řady imunitních (makrofágy, dendritické buňky, B-buňky, specifické typy T-buněk) i neimunitních buněk (fibroblasty, epiteliální buňky). Řadíme je mezi membránové glykoproteiny typu I, které mají extracelulární doménu bohatou na leucin (19-25 tandemových repeticí o délce 24-29 aminokyselin), transmembránovou doménu a intracelulární doménu homologní s receptorem pro IL-1. Svůj název získaly na základě strukturní i funkční podobnosti s toll genem prvně identifikovaným u *Drosophily*. Rozpoznávají molekulární znaky asociované s patogeny exprimované na infekčních agens, a následně zprostředkují sekreci cytokinů, která vyvolá imunitní odpověď. K expresi TLR4 dochází na povrchu buňky, kde je zapojen do signální transdukce vyvolané lipopolysacharidy, které se nacházejí na vnější membráně gramnegativních bakterií. Je schopný rozpoznat i jiné variabilní struktury, jako např. rostlinný diterpen paclitaxel, glykoprotein fibronektin nebo heat-shock proteiny. Mutace genu jsou spojené s rozdíly ve vnímavosti k lipopolysacharidům (Akira S et al., 2006).

## 2.2. Použité chemikálie a přístroje

### 2.2.1. Chemikálie

Agarosa (Serva), dNTPs (Promega), EDTA (Sigma), ethidium bromid (Top-Bio Praha), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Sigma), deionizovaná voda pro PCR (Fresenius), primery (Generi Biotech Hradec Králové), Taq DNA polymeráza (Top-Bio Praha), Tris-HCl (Sigma), 10x koncentrovaný PCR pufr (Top-Bio Praha), eseje „TaqMan” (Life technologies), TaqMan PCR genotyping master mix (Life Technologies), PCR Accesory Set [10x koncentrovaný PCR pufr (Sequenom), 25mM MgCl<sub>2</sub> (Sequenom), 25mM dNTP Mix (Sequenom), PCR Enzyme, 5U/μl (Roche)] (SEQUENOM), PCR voda (5 PRIME), iPLEX Gold reagent kit [SAP pufr (Sequenom), SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase Enzyme) (Sequenom), iPLEX pufr Plus (10x) (Sequenom), iPLEX terminační mix (Sequenom), iPLEX Enzyme (Sequenom), 3-Pt. Calibrant (Sequenom)] (SEQUENOM), SpectroCHIP II G96 & Resin Kit [SpectroCHIP II G96 (Sequenom), Clean Resin (Sequenom)] (SEQUENOM).

### 2.2.2. Přístrojové vybavení

- Centrifuga MLW T 62.1
- Spektrofotometr Nanodrop ND-1000
- Termocykler Bio-Rad DNA ENGINE TETRAD 2
- Minicentrifuga MINI-LABNET
- Termoblok Grant QBT1
- Dokumentační systém Gel Logic 112 KODAK (nebo Fotoaparát Polaroid DS34)
- Mikrovlnka
- UV-transiluminátor MEB 20 (Ultralum)
- Laminární box Bio-II-A (TELSTAR)
- Zdroj napětí Bio-Rad PowerPac 300
- Termocykler RotorGene
- Hmotnostní spektrometr Mass Array Analyzer Compact (Sequenom)
- Rotátor Labroller Labnet
- Nanodispensor Sequenom
- Termocykler Mastercykler pro (Eppendorf)
- Centrifuga Z300 s rotorem pro mikrotitrační destičky Hermle
- Vortex (Labnet)

## 2.3. Metody

### 2.3.1. Genotypizace pomocí „Sequenom MassArray“ techniky

#### Princip:

Metoda „MassArray“ je novější vysokokapacitní („high throughput“) genotypizační technologie, která se vyznačuje přesností, vysokým rozlišením i nepříliš vysokými náklady na jednotlivé analýzy. Je založena na kombinaci techniky PCR s detekcí na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. Principem metody je v prvním kroku zmnožení (amplifikace) daného počtu úseků DNA s pomocí PCR metody (je možno takto amplifikovat najednou až 36 úseků DNA s požadovanými jednonukleotidovými polymorfismy - SNP). Na základě paralelní amplifikace více fragmentů nazýváme proto úvodní krok techniky jako „multiplex“ PCR. Následně je nutno odstranit dNTPs, které nebyly spotřebovány při PCR, a to za pomoci enzymu alkalické fosfatasy (SAP), která přebytečné nukleotidy defosforyluje. Po tomto kroku je na řadě druhá PCR reakce, jenž využívá terminačních nukleotidů (ddNTPs) a tzv. extenčních primerů. Jedná se o komplementární oligonukleotidy, které jsou ukončeny přesně v místě, které leží před vyšetřovaným polymorfismem. Na místo polymorfismu pak polymerasa naváže koncový nukleotid, jenž je komplementární k templátu. Tomuto kroku říkáme „prodloužení primeru“ (z angl. primer extension). Tento výsledný produkt PCR reakce může být následně, díky specifické molekulové hmotnosti, analyzován na hmotnostním spektrometru, přičemž jsou odlišeny jednotlivé alely (obr. 4). Analýza s použitím přístroje Sequenom byla provedena ve spolupráci s Dr. Ing. Evou Kriegovou na pracovišti Laboratoře imunogenomiky a imunoproteomiky Lékařské fakulty UP Olomouc.

Chemikálie: PCR Accesory Set [10x koncentrovaný PCR pufr (Sequenom), 25mM MgCl<sub>2</sub>, (Sequenom), 25mM dNTP Mix (Sequenom), PCR Enzyme, 5U/μl (Roche)] (SEQUENOM), PCR voda (5 PRIME), iPLEX Gold reagent kit [SAP pufr (Sequenom), SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase Enzyme)(Sequenom), iPLEX pufr Plus (10x) (Sequenom), iPLEX terminační Mix (Sequenom), iPLEX Enzyme (Sequenom), 3-Pt. Calibrant (Sequenom)] (SEQUENOM), SpectroCHIP II G96 & Resin Kit [SpectroCHIP II G96 (Sequenom), Clean Resin (Sequenom)] (SEQUENOM).

**Pozn.:** Primery jsou dodávány v lyofilizované formě. Jsou rozpuštěny ve vodě na požadovanou koncentraci 100 pmol/μl (pro multiplex PCR) resp. 400 pmol/μl (extenční PCR). Následně jsou z těchto roztoků připraveny směsi (primerové mixy) o koncentraci



1 pmol/μl (pro multiplex PCR) resp. 7; 9,3; 11,6 a 14 pmol/μl (extenční primery). Výsledná koncentrace extenčních primerů závisí na jejich molekulové hmotnosti.

### **Pracovní postup:**

Na mikrotitrační destičku byly do každé jamky napipetovány 4 μl reakční směsi pro PCR, která pro jednu reakci obsahovala 1,85 μl PCR vody, 0,625 μl 10x koncentrovaného PCR pufru, 0,325 μl MgCl<sub>2</sub>, 0,1 μl dNTP mixu, 1 μl primerového mixu a 0,1 μl Hotstar Taq. Ke směsi byl přidán 1 μl izolované DNA (získaná vysolovací technikou nebo pomocí automatu k extrakci nukleových kyselin Arrow, NorDiag, Norsko). Koncentrace DNA byla předem změřena, ideální koncentrace se pohybovala v rozmezí 2-20 ng/μl. Destička byla zvortexována a stočena na centrifuze (1000 rpm). Byla provedena první PCR reakce, tzv. multiplex PCR, při které došlo k amplifikaci požadovaných úseků studovaných genů (viz přehled studovaných genů), které obsahovaly vyšetřované polymorfismy. Teplotní profil je následující:

94°C – 2 min

(94°C - 30 s, 56°C - 30 s, 72°C - 1 min) 45 cyklů

72°C - 5 min

4°C – do ukončení

Do jednotlivých jamek se vzorky byly následně napipetovány 2 μl SAP mixu, jenž pro jednu reakci obsahoval 1,33 μl PCR vody, 0,17 μl 10x koncentrovaného SAP pufru, 0,5 μl SAP enzymu) (SAP, z angl. shrimp alkaline phosphatase), který má za úkol odstranit přebytečné dNTPs z PCR reakce, aby dále neinteragovaly s amplifikovanou DNA. Vzorky byly zvortexovány, stočeny na centrifuze (1000 rpm) a poté inkubovány 40 min při 37°C a následně 5 min při 85°C, nakonec byly ochlazeny na 4°C. Poté byly do každé jamky napipetovány 2 μl iPLEX mixu (1 reakce = 0,755 μl PCR vody, 0,2 μl 10x koncentrovaného iPLEX pufru plus, 0,2 μl iPLEX terminačního mixu, 0,804 μl primerového mixu, 0,041 μl iPLEX enzymu) a byla provedena druhá PCR amplifikace, tzv. iPLEX PCR, kdy byly použity extenční primery. Teplotní profil PCR reakce byl následující:

95°C - 30 s

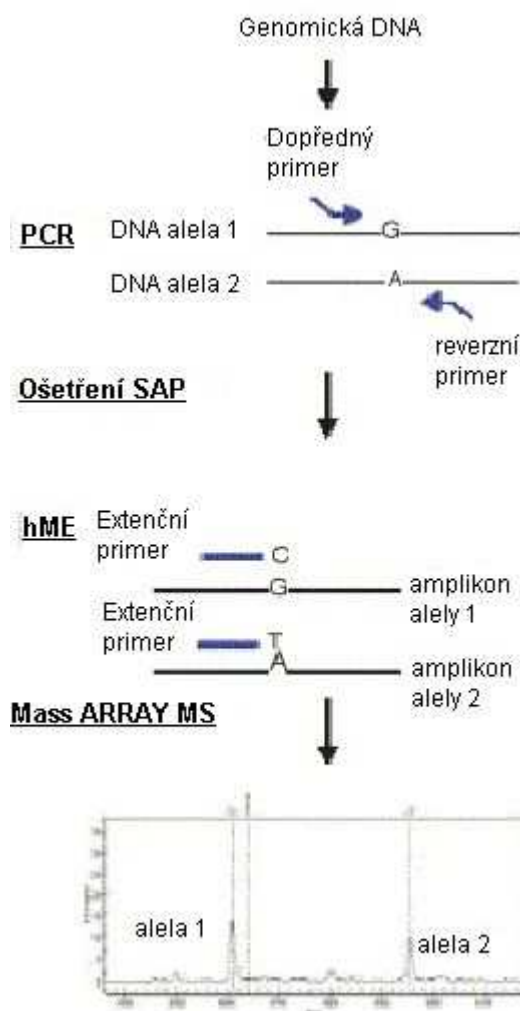
[95°C – 5 s (52°C - 5 s, 80°C - 5 s) 5 cyklů] 40 cyklů

72°C - 3 min

4°C – do ukončení

Sekvence použitých extenčních primerů a očekávané molekulové hmotnosti výsledných extenčních produktů jsou uvedeny v tabulce 1. Primery pro úvodní PCR a extenční primery byly navrženy s využitím aplikace Assay Design Suite (ADS) v1.0 ([www.mysequenom.com](http://www.mysequenom.com)).

Následoval krok, kdy bylo potřeba ze vzorků odstranit soli (ionty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , a  $\text{Mg}^{2+}$ ), které by jinak při analýze na hmotnostním spektrometru způsobily vysoký šum na pozadí. K odstranění byl použit resin. K produktům v PCR-destičce bylo přidáno 41  $\mu\text{l}$  vody a 15 mg resinu (pro dávkování resinu byla použita speciální 96 jamková destička). Destička byla umístěna na rotační míchačku, aby docházelo k rovnoměrnému promíchávání směsí. Zde byla ponechána 30 minut. Následně byly vzorky stočeny na centrifuze 5 min při 4000 rpm a přemístěny do přístroje SEQUENOM MassArray nanodispenser, kde došlo k nanesení vzorků (v množství 4-10  $\mu\text{l}$ ) na čip, který obsahuje matrici pro MALDI-TOF analýzu. Čip se vzorky byl poté vložen do hmotnostního spektrometru SEQUENOM a byla zahájena analýza jednotlivých polymorfismů.



**Obr. 4: Schématické znázornění jednotlivých kroků metody MassArray** (převzato z článku „A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY”, Jurinke Ch. et al., 2005)

**Tab. 1:** Sekvence extenčních primerů pro jednotlivé vyšetřované polymorfismy a jejich výsledné molekulové hmotnosti po navázání terminátoru (ddNTP) specifického pro jednotlivé alely (A1, A2).

<b>Gen</b>	<b>Kód SNP</b>	<b>Extenční primer - sekvence</b>	<b>A1</b>	<b>MW</b>	<b>A2</b>	<b>MW</b>
<i>ATG16L1</i>	rs2241880	ACCAGAACCAGGATGAG	C	5484,6	T	5564,5
<i>IL23R</i>	rs11209026	GCAAAAACCTACCCAGTT	G	5683,8	A	5763,7
<i>BTNL2</i>	rs2076530	TTGGATCTGAAGGTGGTA	A	5880,9	G	5896,9
<i>CXCL12</i>	rs1801157	CCCCATCCACATGGGAGCC	A	5989,9	G	6005,9
<i>IL12B</i>	rs1363670	GCTCATGTTTTAGCTAGAG	C	6081	G	6121
<i>IL17F</i>	rs763780	GATGCACCTCTTACTGCACA	C	6284,1	T	6364
<i>TLR4</i>	rs4986791	ACAAAGTGATTTTGGGACAA	C	6436,2	T	6516,2
<i>IL12B</i>	rs1433048	TGATACTAAAATGGGAGTTG	G	6467,3	A	6547,2
<i>IL23R</i>	rs1495965	GCTTTGGAAAATGTTCTCTTC	G	6649,4	A	6729,3
<i>IL23R</i>	rs7517847	CCCCTACATACAGGTGTAGCTG	G	6942,5	T	6966,6
<i>ANXA11</i>	rs1049550	CGTCATTGACTGCCTGGGGAGT	C	7029,6	T	7109,5
<i>ATXN2L</i>	rs8049439	TCCAGTTCTATTTTTGCCTTCAC	C	7153,7	T	7177,7
<i>IL12B</i>	rs2195940	GTCTAAAGACTTGCTAAGAGTTT	T	7348,8	C	7364,8
<i>IL12B</i>	rs2853694	CATAGCACCAAAGAAAGGGATAAA	C	7668,1	A	7692,1
<i>IL23R</i>	rs11805303	GAATAAAAGGCAAGTGGATCGTTT	T	7736,1	C	7752,1
<i>IL23R</i>	rs11465804	GGGGATGGGTAAAATGGGCAATT	G	7784,1	T	7808,1
<i>HERC2</i>	rs916977	AAAGTGGGGATGCAGTTTGAGTAGA	G	8097,3	A	8177,2
<i>IL23R</i>	rs2201841	TGGCCTATGATTATGCTTTTTCTTGA	T	8219,4	C	8235,4
<i>IL23A</i>	rs11171806	AGTTTTTATGAGAAGCTGCTAGGATC	A	8311,4	G	8327,4
<i>RAB32</i>	rs1040461	CCCCTACATCTCCACCATTGAGGGTAC	C	8387,5	T	8467,4
<i>IL23R</i>	rs10489629	CAGCTTGTTTGATTATGATGTCAGCCA	G	8527,6	A	8607,5
<i>IL23R</i>	rs10889677	GGACCTTAATTCTCTAATTTAAGAAAT	C	8847,8	A	8887,7

### 2.3.2. Genotypizace pomocí PCR-SSP (z angl. polymerase chain reaction with sequence specific primers)

Chemikálie: primerový mix (specifické primery pro alely *ATXN2L* rs8049439 T/C, dopředný primer, kontrolní primery, Tris HCl pufr), roztok „master mix“ (komponenty: 10\* koncentrovaný PCR pufr pro Taq polymerázu, dNTPs, termostabilní Taq DNA polymeráza, deionizovaná voda pro PCR).

**Tab. 2:** Sekvence použitých primerů pro PCR-SSP genotypizaci polymorfismu *ATXN2L* rs8049439.

Specifický zpětný pro alelu T	5'CCATGGGTCAGTTTCAAGAAA <b>A</b>
Specifický zpětný pro alelu C	5'CCATGGGTCAGTTTCAAGAAA <b>G</b>
Konstantní dopředný	5'TCTGTAGGCCTGTGCTGAAT
Kontrolní primer 33	5'TGCCAAGTGGAGCACCCAA
Kontrolní primer 34	5'GCATCTTGCTCTGTGCAGAT

PCR-SSP byla spolu s RT-PCR (PCR v reálném čase) využita jako verifikační metoda. Touto metodou byla ověřena genotypizace polymorfismu rs8049439 ležícího na genu *ATXN2L*. Návrh, zavedení a optimalizace genotypizačního protokolu pro uvedený polymorfismus byly provedeny jako součást bakalářské práce (Smitalová D., Bakalářská práce, Olomouc 2013), sekvence použitých primerů je uvedena v tabulce 2. Verifikační genotypizace na vzorcích souboru kontrolních jedinců (paralelně typizovaných technikou MassArray Sequenom) je součástí této diplomové práce.

#### **Pracovní postup (rozpis pro genotypizaci dvanácti vzorků DNA)**

Příprava vzorků k PCR-SSP genotypizaci probíhala v laminárním boxu. Nejprve byl připraven primerový mix pro každou alelu zvlášť. Na přípravu 100 µl primerového mixu bylo do mikrozkuhavky o objemu 2 ml napipetováno pro alelu T 85,8 µl a pro alelu C 88,8 µl Tris pufru. Dále bylo napipetováno 5 µl specifického primeru pro alelu T a 2 µl specifického primeru pro alelu C. Poté už bylo pipetováno shodně do obou mikrozkuhovek 5 µl konstantního primeru a 2,1 µl primerů pro vnitřní kontrolu P33 a P34 (koncentrace všech primerů byla 100 µM). Primerový mix byl nakonec stočen na minicentrifuze.

Do 24 PCR mikrozkuhovek (objemu 200 µl) bylo pomocí automatické pipety rozpipetováno 5 µl primerového mixu (do prvních dvanácti PCR mikrozkuhovek primerový mix pro alelu T a do dalších dvanácti PCR mikrozkuhovek primerový mix pro alelu C). Následně bylo vybráno a stočeno na minicentrifuze 12 vzorků DNA

(střední koncentrace 300 ng/μl) a z každé byl napipetován objem 0,3 μl k oběma primerovým mixům. Na závěr bylo ještě přidáno 8 μl master mixu. K přípravě master mixu pro 24 PCR bylo potřeba do mikrozkušavky napipetovat 36,5 μl 10x koncentrovaného reakčního pufru, 2,81 μl dNTPs, 2,25 μl Taq polymerasy a to vše doplnit vodou pro PCR o objemu 183,08 μl. Mikrozkušavka s namíchaným master mixem byla stočena na minicentrifuze a následně byl vzniklý roztok rozpipetován do PCR mikrozkušavek. Stojan s PCR mikrozkušavkami byl stočen na centrifuze, dokud nebylo dosaženo 400 ot/min. Poté byly mikrozkušavky vyjmuty a vloženy do termocykleru, na němž byl nastaven program IL10 s následujícím teplotním profilem:

96°C - 60s

(96°C - 20s, 72°C - 65s) - 5 cyklů

(96°C - 25s, 67°C - 50s, 72°C - 30s) - 21 cyklů

(96°C - 30s, 57°C - 60s, 72°C - 90s) - 4 cykly

4°C – do ukončení

Jakmile byl program ukončen, vzorky byly vyjmuty a analyzovány elektroforézou na agarosovém gelu.

### **2.3.3. Elektroforéza na agarosovém gelu**

Chemikálie: agarosa, TBE pufr – koncentrát (500 mM TrisCl, 660 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA), ethidium bromid (roztok 10 mg/ml), nanášecí pufr.

Nejprve byl připraven 2% agarosový gel. Pro přípravu šestiřadého gelu (každá řada 24 jamek) bylo potřeba smíchat 2 g agarosy a 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Tuto směs bylo potřeba následně zahřát k varu v mikrovlnné troubě při maximálním výkonu, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarosy (přibližně 3-4 min). Po vyjmutí baňky s agarosou byl do gelu vložen teploměr. Jakmile došlo k ochlazení na cca 70°C, byly do agarosy napipetovány 4 μl ethidium bromidu, který byl v gelu důkladně rozmíchán. Takto připravený gel byl nalit do předem připravené formy, kde se nechal asi 30 min ochladit do ztuhnutí. Z hotového gelu byly vyjmuty hřebínky pro jamky a gel byl vložen do elektroforetické vany naplněné 0,5x koncentrovaným TBE pufrem.

S použitím multikanálové pipety bylo do PCR mikrozkušavek s amplifikovanými produkty PCR reakce po vyjmutí z termocykleru napipetováno 5 μl nanášecího pufru. Do jednotlivých jamek gelu bylo poté nanášeno 10 μl každé PCR směsi (amplikonu). Následně byla elektroforetická vana uzavřena a připojena ke zdroji. Elektroforéza probíhala 20 min při konstantním napětí 130 V. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z vany a vložen do UV-transiluminátoru, který slouží k vizualizaci ethidium

bromidu. Výsledný obraz gelu na UV-transiluminátoru byl poté vyfotografován a uložen. Výsledky PCR-SSP byly poté porovnány s genotypizačními výstupy z přístroje MassArray.

#### **2.3.4. Genotypizace pomocí RT-PCR (z angl. real time - polymerase chain reaction)**

Chemikálie: esej TaqMan (*ANXA11* rs1049550: Assay ID C\_7881261\_1, *TLR4* rs4986791: Assay ID C\_11722237\_20), deionizovaná voda pro PCR, 10mM Tris pufr, TaqMan PCR genotyping master mix.

Metoda PCR v reálném čase byla využita k verifikaci genotypizace polymorfismů rs1049550 na genu *ANXA11* a rs4986791 na genu *TLR4*. Touto metodou bylo genotypizováno 100 vzorků DNA kontrolních jedinců pro gen *TLR4* a 96 vzorků DNA kontrolních jedinců pro gen *ANXA11*. V obou případech byly pro genotypizaci použity komerčně dostupné genotypizační eseje "TaqMan" (Life technologies, *ANXA11* rs1049550: Assay ID C\_7881261\_1, *TLR4* rs4986791: Assay ID C\_11722237\_20) podle pokynů výrobce.

Vzorky pro RT-PCR byly připravovány v laminárním boxu na ledu. Do připravené krabičky se šupinovým ledem byla umístěna mikrozkušavka s genotypizační sondou. Kvůli citlivosti na světlo bylo nutno sondu chránit hliníkovou fólií. Do stojanu bylo vloženo 12 mikrozkušavek a do každé bylo napipetováno 15 µl PCR vody. Poté bylo vybráno 11 vzorků DNA a do mikrozkušavek s PCR vodou z nich bylo napipetováno 0,4 µl, poslední mikrozkušavka byla ponechána jako negativní kontrola. Mikrozkušavky byly zavíčkovány a protřepány na vortexu. Následně byla naředěna genotypizační sonda (jak pro polymorfismus genu *ANXA11*, tak i pro polymorfismus genu *TLR4*), abychom dosáhli požadované koncentrace. Sonda byla ředěna 10mM Tris pufrém v poměru 1:1. Takto naředěná sonda byla stočena na minicentrifuze a použita k přípravě reakčního mixu, který sestával z naředěné sondy a TaqMan PCR genotyping master mixu (Life Technologies). Na každou reakci bylo potřeba 5 µl TaqMan PCR genotyping master mixu a 0,5 µl naředěné sondy a z důvodu pipetovacích ztrát bylo nutné objem navýšit. Konkrétně pro 12 vzorků byl reakční mix připraven napipetováním 65 µl TaqMan PCR master mixu a 6,5 µl ředěné sondy. Poté byl reakční mix stočen na minicentrifuze a před dalším použitím uložen do temna na led. Mezitím byla z lednice vytažena předchlazená kovová destička, do které bylo umístěno 12 PCR zkušavek Corbett Research o objemu 0,1 ml. Do těchto zkušavek bylo rozpipetováno 5,5 µl reakčního mixu a 4,5 µl naředěné DNA, popř. PCR vody

(negativní kontrola). Poté byly zkumavky zavíčkované, označeny a přikryty hliníkovou fólií. Vzorky byly připraveny k vložení do cykleru RotorGene3000 system (Corbett Research), jehož rotor s kroužkem bylo nutné nechat před použitím nejméně 15 min ve flow boxu pod UV zářením (protikontaminační opatření). Se zkumavkami bylo nutné manipulovat pouze za víčka, abychom neznečistili dna zkumavek a tím neznemožnili detekci. Poté byly zkumavky zajištěny kroužkem a vloženy do cykleru. Na ovládacím počítači cykleru byl otevřen program RotorGene a po zvolení vhodných parametrů (teploty, doba, cykly – dle doporučení výrobce eseje) byla spuštěna analýza. Po ukončení programu byly vyhodnoceny genotypy jednotlivých vzorků pro oba testované geny (polymorfismy) a porovnány s výstupy z MassArray Sequenom.

### **2.3.5. Statistická analýza**

Na základě pozorovaného počtu jednotlivých genotypů byly pro každý polymorfismus ve vyšetřovaných skupinách stanoveny:

- 1) Genotypové frekvence, jako podíl jednotlivých genotypů (homozygoti pro alelu 1, heterozygoti, homozygoti pro alelu 2) na celkovém počtu jedinců ve skupině (N).
- 2) Alelické frekvence, jako podíl počtu konkrétních variant (alel) na celkovém počtu alel daného lokusu (2N) ve studované skupině.
- 3) Fenotypové frekvence (nosičství), jako podíl nosičů dané alely (jedné nebo dvou kopií) na celkovém počtu jedinců ve skupině.

Soulad distribuce genotypů ve skupině kontrolních jedinců s předpokládaným rozdělením podle Hardy-Weinbergovy rovnováhy byl ověřován pomocí „ $\chi^2$ -kvadrátového testu dobré shody“ s jedním stupněm volnosti.

Porovnání genotypových, alelických a fenotypových frekvencí bylo mezi studovanými skupinami (zejména podle závažnosti GVHD) provedeno pomocí  $\chi^2$ -kvadrátového testu s příslušným počtem stupňů volnosti nebo pomocí Fischerova exaktního testu. Hodnota  $p < 0,05$  pro uvedené testy byla hodnocena jako nominálně signifikantní rozdíl. Všechny pozorované nominálně signifikantní rozdíly (hodnoty p) byly korigovány na počet testovaných polymorfismů (korekce dle Bonferroniho).

## 2.4. Výsledky

### 2.4.1. Charakteristika studovaného souboru

Experimentální část této diplomové práce se zaměřila na sledování vztahu mezi 22 vybranými kandidátními polymorfismy imunitních a dalších genů (přehled polymorfismů v tabulce 1) a výskytem akutní nebo chronické GVHD po TKKB. K tomuto účelu jsme provedli genotypizaci u skupiny zahrnující 143 párů (pacienti a jejich dárci) po alogenní TKKB a 200 kontrolních jedinců. Všechny vzorky pacientů pocházely z Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc. Pacienti poskytli informovaný souhlas s anonymním využitím jejich vzorků DNA k lékařskému výzkumu. U 123 pacientů byla úplná shoda v HLA znacích s jejich dárci krvetvorných buněk, zbývajících 20 párů nebylo zcela identických (1 nebo 2 HLA neshody). HLA identita byla testována dle standardů EFI (buď jednoznačné potvrzení HLA identity na základě rodinné studie, nebo vyšetření na úrovni vysokého rozlišení pro HLA-A, -B, -C, -DRB1 a -DQB1 lokusy v ostatních případech). Podrobná charakteristika studovaného souboru pacientů a jejich dárců je uvedena v tabulce 3. Jako kontrolní vzorky zdravých jedinců byly vybrány DNA nepříbuzných členů registru dárců kostní dřeně české národnosti, opět s informovaným souhlasem.

### 2.4.2. Genotypizace studovaného souboru pomocí techniky MassArray Sequenom

Reprezentativní interpretace genotypizace technikou MassArray (výstupy z interpretačního programu) je uvedena na obrázku 5 a 6. Výsledky genotypizací byly analyzovány z několika pohledů. Ve skupině zdravých kontrolních jedinců jsme sledovali soulad distribuce genotypů s rozložením očekávaným podle Hardy-Weinbergova pravidla. Skupina pacientů po TKKB byla rozdělena na podskupiny podle výskytu GVHD (akutní nebo chronické). Mezi jednotlivými podskupinami byly porovnávány genotypové, alelické a fenotypové frekvence vyšetřovaných polymorfismů (zvláště pro pacienty i jejich dárci). Pro identifikaci případných signifikantních rozdílů mezi srovnávanými skupinami byla určena nominální hodnota  $p < 0,05$ . Zjištěné nominálně signifikantní rozdíly byly dále korigovány na počet testovaných polymorfismů (viz odstavec ke statistické analýze).

Distribuce genotypů ve skupině zdravých kontrolních jedinců byla u všech testovaných polymorfismů s výjimkou jednoho (*IL23R*, rs10489629) v souladu s předpokládaným rozdělením v populaci podle Hardy-Weinbergovy rovnováhy („ $\chi^2$ -kvadrátový test dobré shody“ s jedním stupněm volnosti,  $p > 0,05$ ). Polymorfismus



*IL23R* rs10489629 byl vzhledem k odchylce od H-W rovnováhy vyřazen z dalších analýz u pacientů po TKKB. Počty jednotlivých genotypů, alel a fenotypů zjištěné ve výše charakterizovaných podskupinách byly porovnány s využitím „ $\chi$ -kvadrátového testu“ s příslušným počtem stupňů volnosti.

#### **2.4.2.1. Vztah akutní GVHD a genotypů pacientů (příjemců)**

První porovnání výsledků bylo provedeno mezi skupinami pacientů s klinicky významnou akutní GVHD (stádia II-IV) a bez této komplikace (nebo jen s mírnou formou stádia I). Výsledky jsou prezentovány v tab. 4. V případě tohoto srovnání byly 3 polymorfismy vyhodnoceny jako nominálně signifikantní ( $p < 0,05$ ).

Zjistili jsme, že frekvence méně časté alely T polymorfismu rs1049550 genu *ANXA11* je nižší ve skupině pacientů s klinicky významnou GVHD oproti pacientům bez závažné aGVHD ( $p = 0,014$ ). Podobně byli také nosiči genotypu TT podstatně méně častí ve skupině pacientů s aGVHD ( $p = 0,028$ , odds ratio (OR) = 0,26). Tyto výsledky naznačují, že by alela T mohla mít protektivní efekt na vývoj závažné aGVHD. Pro lepší orientaci byl navíc vytvořen graf 1, který srovnává zastoupení homozygotů TT mezi pacienty s aGVHD a bez této komplikace.

U dalšího polymorfismu rs1801157 na genu *CXCL12* bylo zjištěno, že jak alelická frekvence varianty A ( $p = 0,025$ ), tak i její nosičtví (tedy A „fenotyp“;  $p = 0,027$ ) byly vyšší ve skupině pacientů s klinicky významnou aGVHD oproti ostatním pacientům. Hodnota rizika pro nosiče alely A vyjádřena pomocí odds ratio byla OR = 2,29. To znamená, že alela A polymorfismu rs1801157 může být spojena s vyšším rizikem výskytu aGVHD (graf 2).

Podobnou souvislost s hraniční hodnotou nominální signifikace ( $p = 0,05$ ) jsme zjistili ještě u polymorfismu rs763780 na genu *IL17F*, kde byla frekvence vzácné alely C opět vyšší u pacientů s aGVHD.

#### **2.4.2.2. Vztah akutní GVHD a genotypů dárců**

Při dalším srovnávání jsme ve stejných podskupinách jako v předchozím odstavci (podskupiny podle aGVHD) sledovali genotypové, alelické a fenotypové frekvence **dárců** a vyhodnocovali jejich vliv na závažnost aGVHD u pacientů. Výsledky jsou prezentovány v tab. 5. V tomto případě byl nalezen jeden nominálně signifikantní výsledek, který se týkal opět polymorfismu rs1801157 na genu *CXCL12*. Zde jsme pozorovali velmi podobnou asociaci jako u genotypů pacientů. Dárci pacientů s klinicky významnou aGVHD měli vyšší frekvenci alely A ( $p = 0,012$ ) a nosičtví této varianty bylo spojeno s vyšším rizikem aGVHD ( $p = 0,029$ , OR = 2,38). Získané hodnoty jsou podobné jako při porovnání podskupiny pacientů podle jejich genotypů, takže lze shrnout, že

nosičství alely A jak u pacientů, tak i u dárců může být spojeno se zvýšeným rizikem výskytu aGVHD.

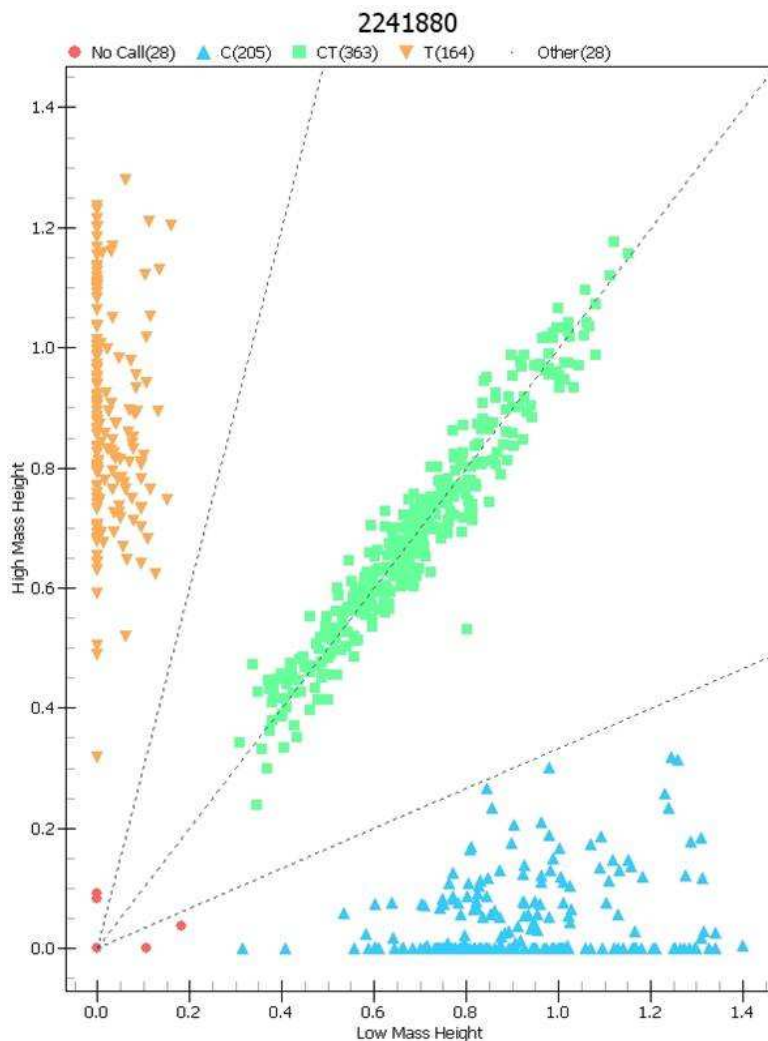
#### 2.4.2.3. Vztah chronické GVHD a genotypů pacientů

Poslední srovnání u pacientů proběhlo na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti chronické GVHD. Výsledky jsou prezentovány v tab. 6. V tomto případě nebyly u žádného polymorfismu nalezeny významné rozdíly na úrovni genotypové, alelické ani fenotypové frekvence mezi pacienty s chronickou GVHD a těmi, u kterých se tato komplikace nevyskytla.

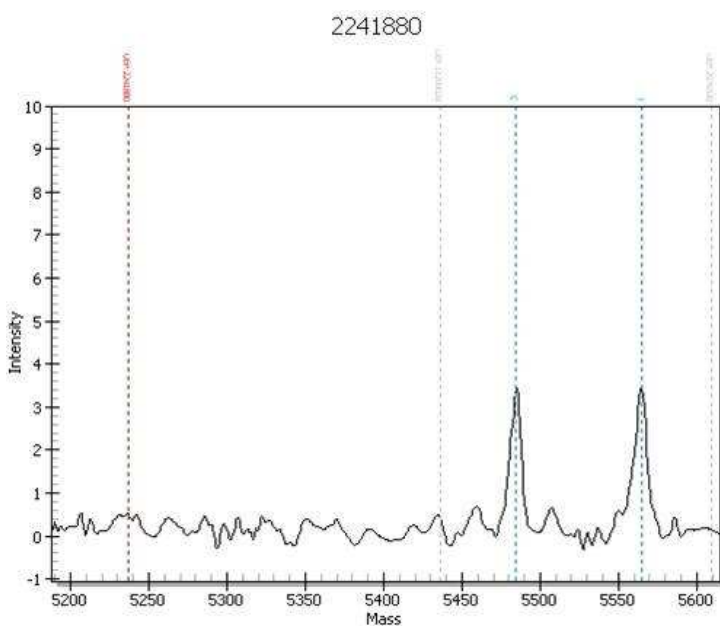
Při aplikaci striktní korekce na počet testovaných polymorfismů (viz odstavec ke statistické analýze v metodické části) nedosáhly korigované hodnoty p statistické signifikace u žádného z výše popsaných rozdílů s nominální statistickou signifikací.

**Tab. 3:** Základní charakteristika vyšetřovaného souboru pacientů po TKKB

<b>Příjemci</b>	Muži	82
	Ženy	61
<b>Zdroj kmenových buněk</b>	Kostní dřeň	12
	Periferní krev	131
<b>Stupeň HLA shody</b>	Identické	123
	Neshoda	20
<b>Pokrevní vztah dárce</b>	Nepříbuzní	57
	Sourozenci	83
	Ostatní příbuzní	3
<b>Věk</b>	Rozpětí	18-61
	Medián	43
<b>aGVHD</b>	0-I	95
	II-IV	48
<b>cGVHD</b>	0	64
	Extenzivní/limitovaná	44
	nehodnoceno	35
<b>Diagnóza</b>	AML	57
	ALL	17
	CML	13
	CLL	10
	NHL	16
	Ostatní	29
<b>Úmrtí</b>	Ne	73
	Ano	70



**Obr. 5:** Interpretace výsledků metody MassArray pro polymorfismus rs2241880 na genu *ATG16L1*. Modře jsou vyznačeni homozygoti pro alelu C, oranžově pro alelu T, zelení jsou heterozygoti. Vzorok označené červenými tečkami nelze vyhodnotit kvůli slabému signálu.



**Obr. 6:** Výchozí spektrum MassArray vzorku DNA pro polymorfismus rs2241880 na genu *ATG16L1*. Dva viditelné píky molekulových hmotností očekávaných pro příslušné alely znamenají, že se jedná o heterozygota.

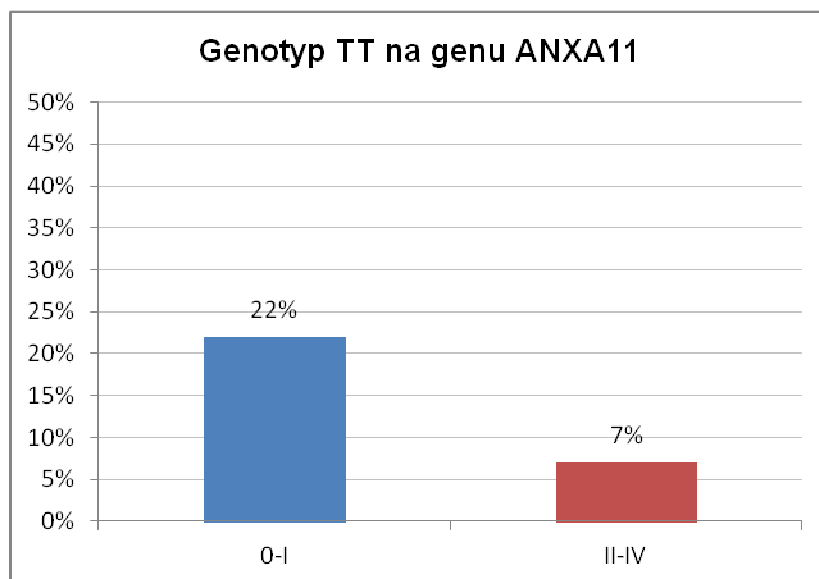
**Tab. 4:** Porovnání relativních genotypových, alelických a fenotypových frekvencí u pacientů s akutní GVHD (stádia II-IV) a bez této komplikace (stádia 0-I).

(G – genotyp, A – alela, N – nosičství).

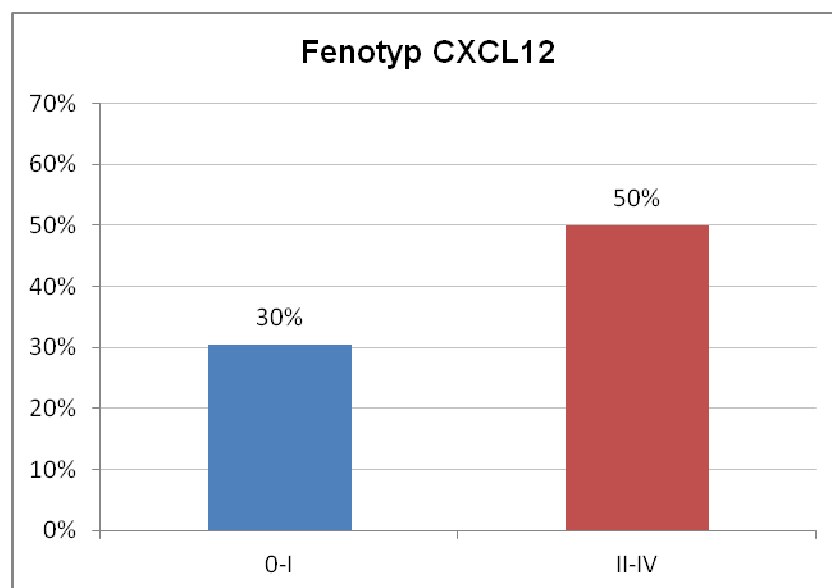
<sup>1</sup>**ANXA11**: frekvence alely rs1049550\*T (alela 2): p=0,014; podíl homozygotů rs1049550 TT: p=0,028; odds ratio (OR)=0,26; 95%CI: 0,07-0,93; <sup>2</sup>**CXCL12**: frekvence alely rs1801157\*A (alela 2): p=0,025; podíl nosičů alely rs1801157\*A (alela 2): p=0,027; odds ratio (OR)=2,29; 95%CI: 1,09-4,79; <sup>3</sup>**IL17F**: frekvence alely rs763780\*C: p=0,05

Gen (SNP)	SNP (rs kód)	aGVHD	G 1	G 2	G 3	A 1	A 2	N 1	N 2
<i>ANXA11</i> <sup>1)</sup>	rs1049550	0-I	0,35	0,43	0,22	0,57	0,43	0,78	0,65
		II-IV	0,51	0,42	0,07	0,72	0,28	0,93	0,49
<i>ATG16L1</i>	rs2241880	0-I	0,30	0,42	0,29	0,51	0,49	0,71	0,70
		II-IV	0,27	0,52	0,20	0,53	0,47	0,80	0,73
<i>ATXN2L</i>	rs8049439	0-I	0,32	0,43	0,25	0,54	0,46	0,75	0,68
		II-IV	0,35	0,48	0,18	0,59	0,41	0,83	0,65
<i>BTNL2</i>	rs2076530	0-I	0,43	0,39	0,18	0,63	0,37	0,82	0,57
		II-IV	0,37	0,46	0,17	0,60	0,40	0,83	0,63
<i>CXCL12</i> <sup>2)</sup>	rs1801157	0-I	0,70	0,29	0,01	0,84	0,16	0,99	0,30
		II-IV	0,50	0,45	0,05	0,73	0,27	0,95	0,50
<i>HERC2</i>	rs916977	0-I	0,68	0,27	0,05	0,82	0,18	0,95	0,32
		II-IV	0,72	0,22	0,07	0,83	0,17	0,93	0,28
<i>IL12B</i>	rs1363670	0-I	0,67	0,25	0,08	0,80	0,20	0,92	0,33
		II-IV	0,68	0,30	0,02	0,83	0,17	0,98	0,32
<i>IL12B</i>	rs1433048	0-I	0,69	0,29	0,02	0,83	0,17	0,98	0,31
		II-IV	0,68	0,27	0,05	0,82	0,18	0,95	0,32
<i>IL12B</i>	rs2195940	0-I	0,77	0,21	0,02	0,88	0,13	0,98	0,23
		II-IV	0,82	0,18	0,00	0,91	0,09	1,00	0,18
<i>IL12B</i>	rs2853694	0-I	0,23	0,55	0,22	0,51	0,49	0,78	0,77
		II-IV	0,29	0,56	0,16	0,57	0,43	0,84	0,71
<i>IL17F</i> <sup>3)</sup>	rs763780	0-I	0,94	0,06	0,00	0,97	0,03	1,00	0,06
		II-IV	0,85	0,13	0,02	0,91	0,09	0,98	0,15
<i>IL23A</i>	rs11171806	0-I	0,84	0,13	0,02	0,91	0,09	0,98	0,16
		II-IV	0,89	0,11	0,00	0,94	0,06	1,00	0,11
<i>IL23R</i>	rs1495965	0-I	0,29	0,51	0,20	0,54	0,46	0,80	0,71
		II-IV	0,35	0,47	0,19	0,58	0,42	0,81	0,65
<i>IL23R</i>	rs2201841	0-I	0,51	0,36	0,13	0,69	0,31	0,88	0,49
		II-IV	0,55	0,39	0,07	0,74	0,26	0,93	0,45
<i>IL23R</i>	rs7517847	0-I	0,35	0,50	0,15	0,60	0,40	0,85	0,65
		II-IV	0,31	0,51	0,18	0,57	0,43	0,82	0,69
<i>IL23R</i>	rs10889677	0-I	0,49	0,39	0,12	0,68	0,32	0,88	0,51
		II-IV	0,51	0,42	0,07	0,72	0,28	0,93	0,49
<i>IL23R</i>	rs11465804	0-I	0,92	0,08	0,00	0,96	0,04	1,00	0,08
		II-IV	0,82	0,18	0,00	0,91	0,09	1,00	0,18
<i>IL23R</i>	rs11805303	0-I	0,52	0,35	0,13	0,69	0,31	0,87	0,48
		II-IV	0,54	0,39	0,07	0,74	0,26	0,93	0,46

Gen (SNP)	SNP (rs kód)	aGVHD	G 1	G 2	G 3	A 1	A 2	N 1	N 2
<i>IL23R</i>	rs11209026	0-I	0,92	0,08	0,00	0,96	0,04	1,00	0,08
		II-IV	0,80	0,20	0,00	0,90	0,10	1,00	0,20
<i>RAB32</i>	rs1040461	0-I	0,78	0,20	0,01	0,89	0,11	0,99	0,22
		II-IV	0,73	0,25	0,02	0,85	0,15	0,98	0,27
<i>TLR4</i>	rs4986791	0-I	0,88	0,12	0,00	0,94	0,06	1,00	0,12
		II-IV	0,89	0,11	0,00	0,95	0,05	1,00	0,11



**Graf 1:** Srovnání genotypové frekvence pro homozygota TT polymorfismu rs1049550 na genu *ANXA11* u pacientů na základě přítomnosti aGVHD (0-I bez aGVHD, II-IV s aGVHD).



**Graf 2:** Srovnání nosičství alely A polymorfismu rs1801157 na genu *CXCL12* u pacientů s aGVHD (II-IV) a bez aGVHD (0-I).

**Tab. 5:** Porovnání genotypových, alelických a fenotypových frekvencí u dárců podle akutní GVHD u pacientů (G – genotyp, A – alela, N – nosičství).

<sup>1</sup> CXCL12: frekvence alely rs1801157\*A (alela 2): p=0,012; podíl nosičů alely rs1801157\*A (alela 2): p=0,029; odds ratio (OR)=2,38; 95%CI: 1,08-5,24

Gen (SNP)	SNP (rs kód)	aGVHD	G 1	G 2	G 3	A 1	A 2	N 1	N 2
ANXA11	rs1049550	0-I	0,37	0,49	0,14	0,61	0,39	0,86	0,63
		II-IV	0,44	0,39	0,17	0,63	0,37	0,83	0,56
ATG16L1	rs2241880	0-I	0,26	0,46	0,28	0,49	0,51	0,72	0,74
		II-IV	0,28	0,48	0,25	0,51	0,49	0,75	0,73
ATXN2L	rs8049439	0-I	0,32	0,47	0,21	0,55	0,45	0,79	0,68
		II-IV	0,33	0,47	0,20	0,57	0,43	0,80	0,67
BTNL2	rs2076530	0-I	0,39	0,46	0,15	0,62	0,38	0,85	0,61
		II-IV	0,35	0,43	0,23	0,56	0,44	0,78	0,65
CXCL12 <sup>1)</sup>	rs1801157	0-I	0,74	0,24	0,01	0,87	0,13	0,99	0,26
		II-IV	0,55	0,38	0,08	0,74	0,26	0,93	0,45
HERC2	rs916977	0-I	0,72	0,23	0,05	0,84	0,16	0,95	0,28
		II-IV	0,63	0,34	0,02	0,80	0,20	0,98	0,37
IL12B	rs1363670	0-I	0,74	0,22	0,03	0,85	0,15	0,97	0,26
		II-IV	0,76	0,22	0,02	0,87	0,13	0,98	0,24
IL12B	rs1433048	0-I	0,65	0,32	0,03	0,81	0,19	0,97	0,35
		II-IV	0,68	0,30	0,03	0,83	0,18	0,98	0,33
IL12B	rs2195940	0-I	0,80	0,18	0,01	0,90	0,10	0,99	0,20
		II-IV	0,74	0,26	0,00	0,87	0,13	1,00	0,26
IL12B	rs2853694	0-I	0,27	0,53	0,20	0,53	0,47	0,80	0,73
		II-IV	0,26	0,50	0,24	0,51	0,49	0,76	0,74
IL17F	rs763780	0-I	0,91	0,08	0,01	0,95	0,05	0,99	0,09
		II-IV	0,86	0,07	0,07	0,89	0,11	0,93	0,14
IL23A	rs11171806	0-I	0,92	0,08	0,00	0,96	0,04	1,00	0,08
		II-IV	0,93	0,07	0,00	0,96	0,04	1,00	0,07
IL23R	rs1495965	0-I	0,29	0,49	0,21	0,54	0,46	0,79	0,71
		II-IV	0,36	0,48	0,17	0,60	0,40	0,83	0,64
IL23R	rs2201841	0-I	0,54	0,37	0,09	0,72	0,28	0,91	0,46
		II-IV	0,57	0,40	0,02	0,77	0,23	0,98	0,43
IL23R	rs7517847	0-I	0,37	0,49	0,14	0,61	0,39	0,86	0,63
		II-IV	0,29	0,54	0,17	0,56	0,44	0,83	0,71
IL23R	rs10889677	0-I	0,54	0,38	0,08	0,73	0,27	0,92	0,46
		II-IV	0,55	0,43	0,02	0,76	0,24	0,98	0,45
IL23R	rs11465804	0-I	0,90	0,09	0,01	0,95	0,05	0,99	0,10
		II-IV	0,88	0,12	0,00	0,94	0,06	1,00	0,12
IL23R	rs11805303	0-I	0,54	0,38	0,08	0,73	0,27	0,92	0,46
		II-IV	0,57	0,40	0,02	0,77	0,23	0,98	0,43
IL23R	rs11209026	0-I	0,90	0,10	0,00	0,95	0,05	1,00	0,10
		II-IV	0,85	0,15	0,00	0,93	0,07	1,00	0,15
RAB32	rs1040461	0-I	0,86	0,11	0,02	0,92	0,08	0,98	0,14
		II-IV	0,73	0,27	0,00	0,87	0,13	1,00	0,27
TLR4	rs4986791	0-I	0,88	0,12	0,00	0,94	0,06	1,00	0,12
		II-IV	0,80	0,18	0,02	0,89	0,11	0,98	0,20

**Tab. 6:** Porovnání genotypových, alelických a fenotypových frekvencí u pacientů podle přítomnosti (1) nebo nepřítomnosti (0) chronické GVHD

(G – genotyp, A – alela, N – nosičství). Nebyly zjištěny rozdíly v genotypových, alelických ani fenotypových frekvencích vyšetřovaných polymorfismů.

Gen (SNP)	SNP (rs kód)	cGVHD	G 1	G 2	G 3	A 1	A 2	N 1	N 2
<i>ANXA11</i>	rs1049550	0	0,36	0,49	0,15	0,60	0,40	0,85	0,64
		1	0,45	0,36	0,19	0,63	0,37	0,81	0,55
<i>ATG16L1</i>	rs2241880	0	0,39	0,33	0,28	0,56	0,44	0,72	0,61
		1	0,24	0,60	0,17	0,54	0,46	0,83	0,76
<i>ATXN2L</i>	rs8049439	0	0,36	0,41	0,22	0,57	0,43	0,78	0,64
		1	0,27	0,51	0,22	0,53	0,47	0,78	0,73
<i>BTNL2</i>	rs2076530	0	0,42	0,45	0,13	0,65	0,35	0,87	0,58
		1	0,43	0,36	0,21	0,61	0,39	0,79	0,57
<i>CXCL12</i>	rs1801157	0	0,70	0,28	0,02	0,84	0,16	0,98	0,30
		1	0,60	0,37	0,02	0,79	0,21	0,98	0,40
<i>HERC2</i>	rs916977	0	0,69	0,27	0,03	0,83	0,17	0,97	0,31
		1	0,68	0,23	0,10	0,79	0,21	0,90	0,33
<i>IL12B</i>	rs1363670	0	0,69	0,25	0,05	0,82	0,18	0,95	0,31
		1	0,66	0,27	0,07	0,79	0,21	0,93	0,34
<i>IL12B</i>	rs1433048	0	0,70	0,28	0,02	0,84	0,16	0,98	0,30
		1	0,70	0,28	0,02	0,84	0,16	0,98	0,30
<i>IL12B</i>	rs2195940	0	0,77	0,21	0,02	0,88	0,12	0,98	0,23
		1	0,84	0,14	0,02	0,91	0,09	0,98	0,16
<i>IL12B</i>	rs2853694	0	0,31	0,52	0,18	0,56	0,44	0,82	0,69
		1	0,28	0,49	0,23	0,52	0,48	0,77	0,72
<i>IL17F</i>	rs763780	0	0,95	0,03	0,02	0,97	0,03	0,98	0,05
		1	0,91	0,09	0,00	0,95	0,05	1,00	0,09
<i>IL23A</i>	rs11171806	0	0,82	0,15	0,03	0,89	0,11	0,97	0,18
		1	0,86	0,14	0,00	0,93	0,07	1,00	0,14
<i>IL23R</i>	rs1495965	0	0,31	0,51	0,18	0,57	0,43	0,82	0,69
		1	0,37	0,37	0,27	0,55	0,45	0,73	0,63
<i>IL23R</i>	rs2201841	0	0,56	0,35	0,08	0,74	0,26	0,92	0,44
		1	0,53	0,43	0,05	0,74	0,26	0,95	0,48
<i>IL23R</i>	rs7517847	0	0,26	0,52	0,21	0,52	0,48	0,79	0,74
		1	0,36	0,50	0,14	0,61	0,39	0,86	0,64
<i>IL23R</i>	rs10889677	0	0,55	0,37	0,08	0,73	0,27	0,92	0,45
		1	0,50	0,45	0,05	0,73	0,27	0,95	0,50
<i>IL23R</i>	rs11465804	0	0,90	0,10	0,00	0,95	0,05	1,00	0,10
		1	0,95	0,05	0,00	0,98	0,02	1,00	0,05
<i>IL23R</i>	rs11805303	0	0,56	0,35	0,08	0,74	0,26	0,92	0,44
		1	0,57	0,39	0,05	0,76	0,24	0,95	0,43
<i>IL23R</i>	rs11209026	0	0,89	0,11	0,00	0,94	0,06	1,00	0,11
		1	0,93	0,07	0,00	0,97	0,03	1,00	0,07
<i>RAB32</i>	rs1040461	0	0,80	0,20	0,00	0,90	0,10	1,00	0,20
		1	0,70	0,28	0,02	0,84	0,16	0,98	0,30
<i>TLR4</i>	rs4986791	0	0,87	0,13	0,00	0,94	0,06	1,00	0,13
		1	0,86	0,14	0,00	0,93	0,07	1,00	0,14

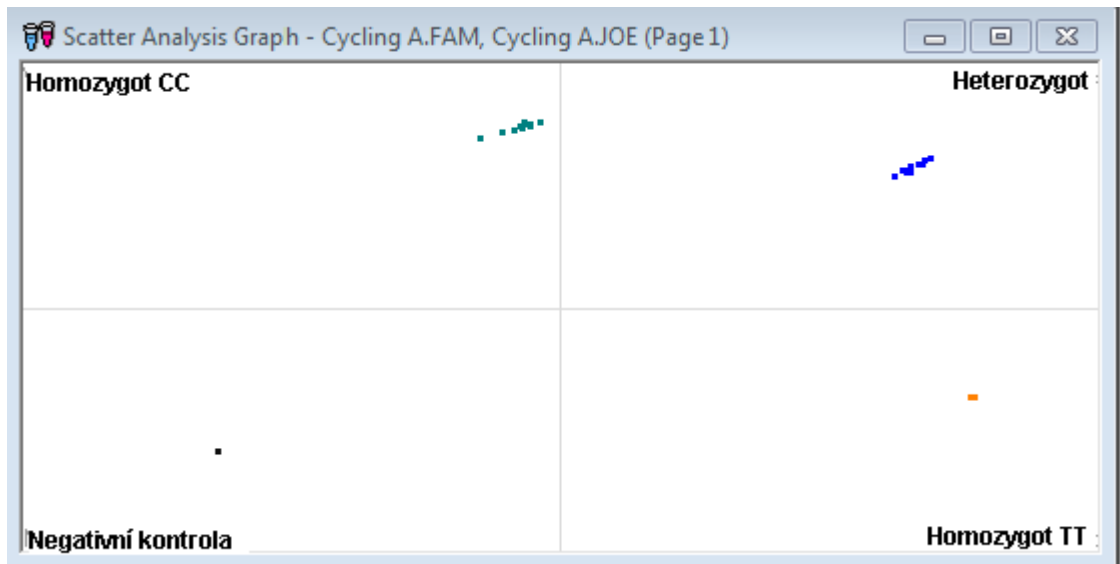
### 2.4.3. Verifikace výsledků genotypizace metodou MassArray

Ze sady 22 SNP variant vyšetřovaných technikou MassArray byly vybrány 3 polymorfismy pro ověření získaných výsledků. K této verifikaci byly využity dvě konvenční genotypizační metody, a sice metoda PCR-SSP pro polymorfismus rs8049439 na genu *ATXN2L* (obr. 7) a kvantitativní PCR v reálném čase (TaqMan) pro polymorfismy rs1049550 na genu *ANXA11* (obr. 8) a rs4986791 na genu *TLR4*. Pro polymorfismus genu *ATXN2L* bylo testováno 186 kontrolních jedinců a shody s výsledky genotypizace technikou MassArray bylo dosaženo u 97 % vzorků DNA. V případě nesouladu (konkrétně 6 vzorků) se vždy jednalo o neshodu heterozygota a homozygota, nikdy se nejednalo o neshodu dvou homozygotů. U polymorfismu genu *ANXA11*, kde bylo genotypizováno 96 kontrolních jedinců, byl 100% soulad mezi MassArray technikou a RT-PCR (TaqMan). Úplné shody mezi výsledky obou metod bylo dosaženo i u polymorfismu genu *TLR4*, kde bylo otestováno 100 vzorků DNA kontrolních jedinců.



**Obr. 7:** Znárodnění reprezentativních výsledků genotypizace polymorfismu na genu *ATXN2L* metodou PCR-SSP s detekcí elektroforézou na agarosovém gelu. Obrázek je inverzním zobrazením. Specifický produkt (zakroužkovaný) vzniká jen v případě, pokud je ve vzorku obsažena varianta, na kterou jsou cíleny specifické primery. U prvních 4 vzorků se jedná o homozygoty TT (pozitivní pouze reakce pro alelu T), pak následují 4 heterozygoti (pozitivní obě reakce) a poslední 4 jsou CC homozygoti (pozitivita pouze pro alelu C). Proužky blíže startu elektroforézy odpovídají těžším ampliconům vnitřní kontroly PCR.





**Obr. 8:** Interpretace výsledků genotypizace polymorfismu *ANXA11* rs1049550 technikou RT-PCT (TaqMan) pomocí software RotorGene na základě hodnocení amplifikačního signálu ze specifických sond pro jednotlivé alely. Genotypy jsou rozloženy do vymezených kvadrantů: Nejčastější genotyp CC v levém horním kvadrantu, heterozygoti CT v pravém horním kvadrantu, nejméně častí TT homozygoti vpravo dole. Vlevo dole je negativní kontrola (žádný signál).

## 2.5. Diskuze

V této diplomové práci jsou stručně shrnuty dosavadní poznatky o transplantaci krvetvorných kmenových buněk, jejích komplikacích (zejména reakci štěpu proti hostiteli) a faktorech, které ji ovlivňují. Vzhledem k zaměření práce byly zdůrazněny zejména genetické faktory podmiňující úspěšnost transplantace. Pro experimentální část této práce byly vybrány polymorfismy genů, které lze na základě jejich biologických funkcí a místa působení jimi exprimovaných molekul považovat za relevantní kandidátní geny pro výsledky transplantace krvetvorných kmenových buněk. Řada z těchto genů se přímo podílí na fungování imunitního systému a mechanismech imunitní odpovědi (s prokázanou nebo předpokládanou souvislostí s posttransplantačními komplikacemi), jiné ovlivňují buněčný cyklus a apoptózu nebo byla prokázána jejich spojitost s autoimunitním či jiným onemocněním.

Po provedení subanalýzy u skupiny pacientů s akutní formou GVHD byly nalezeny tři polymorfismy s nominálně signifikantním rozdílem v zastoupení variant mezi pacienty s akutní GVHD a bez této komplikace. Prvním z nich je nesynonymní polymorfismus *ANXA11* rs1049550, který způsobuje záměnu aminokyseliny argininu za cystein v molekule annexinu A11. Tento protein se účastní buněčného dělení a apoptózy. Zajímavé je, že dříve provedená celogenomová asociační studie prokázala spojitost tohoto polymorfismu s vnímavostí k sarkoidóze, granulomatóznímu zánětlivému onemocnění, jehož etiologie je neznámá. U tohoto onemocnění je alela T v menší míře zastoupena u pacientů v porovnání s kontrolními jedinci, jeví se tedy jako marker ochrany před sarkoidózou (Hofmann S. et al., 2008). Tento fakt byl potvrzen i Laboratoří imunogenomiky a imunoproteomiky LF UP Olomouc u české skupiny pacientů (Mrazek et al., 2011). Kromě sarkoidózy byla také vedena studie, která předpokládá využití tohoto polymorfismu jako prediktivního markeru pro cílenou léčbu metastázujícího kolorektálního karcinomu (Kim J. C. et al., 2013). V této diplomové práci byla podobně jako u sarkoidózy zjištěna spojitost alely T a genotypu TT u polymorfismu *ANXA11* rs1049550 s nižším výskytem akutní GVHD (reakce štěpu proti hostiteli) u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk. Pro homozygota TT je hodnota odds ratio (OR)=0,26. Proto byla tato alela vyhodnocena jako možný marker protekce vůči akutní GVHD.

Druhou variantou se signifikantním výsledkem ve vztahu k výskytu akutní GVHD je alela A polymorfismu rs1801157, ležícího v promotorové oblasti na genu *CXCL12* neboli *SDF1* (z angl. stromal-derived factor-1) u pacientů i dárců. Gen kóduje protein z rodiny chemokinů a podílí se mj. na aktivaci lymfocytů. Je nezbytný pro mobilizaci

krvetvorných kmenových buněk a migraci leukocytů. Právě díky regulačnímu účinku na krvetvorbu a migraci imunitních buněk má tento chemokin vliv na závažnost akutní GVHD. Některé studie ukazují na to, že stejná alelická varianta A může zpomalit progresi nemoci AIDS a mít ochranný vliv před infekcemi (Modi W. S. et al., 2005). Stejná alelická varianta A u dárců je také spojená s nižším rizikem akutní rejekce u pacientů po transplantaci ledviny, ale zároveň zvyšuje riziko chronické nefropatie alogenního štěpu (Lee J. P. et al, 2011).

V naší studii se alela A jevila jako rizikový faktor pro vznik a rozvoj akutní GVHD. Nosiči této alely byli ve větší míře přítomni mezi pacienty s klinicky významnou formou akutní GVHD. Přítomnost alely A byla vyšší i u dárců, jejichž příjemci taktéž trpěli akutní GVHD ve stádiu II-IV. Zdá se tedy, že by nosičství této alely jak u pacientů, tak i dárců mohlo zvyšovat riziko akutní GVHD. Třetím polymorfismem, který byl vyhodnocen jako možný marker pro výskyt akutní GVHD, je jednonukleotidový polymorfismus rs763780 ležící na genu *IL17F*. Protein kódovaný tímto genem patří do rodiny interleukinů a je produkován aktivovanými T-lymfocyty, konkrétně typem Th17. Tyto buňky bývají spojovány se záněty a autoimunitními onemocněními, např. s autoimunitním onemocněním štítné žlázy u čínské populace (Yan N. et al., 2012). IL-17 sám stimuluje sekreci dalších prozánětlivých cytokinů. Je tedy zapojen významně do imunitní odpovědi, což může vysvětlovat možný vliv jeho genové variability na aGVHD u pacientů po TKKB. U tohoto polymorfismu jsme zaznamenali vyšší riziko výskytu aGVHD u nosičů poměrně vzácné alely C ( $p=0,05$ ).

Ve vztahu k jiným onemocněním byl v několika studiích popsán vliv *IL17F* polymorfismu na infekční i imunitní choroby. Například nosičství alely C je spojeno s výskytem jak plicní, tak mimoplicní tuberkulózy u čínské populace (Peng R. et al., 2013). Dále byl tento polymorfismus asociován s různými stádii chronické imunitní trombocytopenie. Zde však alela T výrazně zvyšovala riziko vzniku imunitní trombocytopenie, zvláště pak genotyp TT. Naopak homozygotie CC je asociována se sníženou incidencí onemocnění (Saitoh T. et al., 2011).

Při analýze ostatních studovaných polymorfismů nebyla v našem souboru zjištěna žádná signifikantní asociace s akutní nebo chronickou GVHD. U některých z námi testovaných polymorfismů však byly již určité nálezy ve vztahu k výsledkům TKKB publikovány. Například u polymorfismu rs11209026 na genu *IL23R* byl u skupiny dětských pacientů po TKKB prokázán vliv na akutní GVHD. Nejednalo se však o polymorfismus u skupiny pacientů, nýbrž u skupiny dárců. Pokud byla u dárce přítomna alela A, pak bylo u pacientů výrazně sníženo riziko akutní GVHD. Konkrétně z dvaceti pacientů, jejichž dárce byli nosiči alely A, pouze jeden (5%) dosáhl vyššího stádia aGVHD než I. Naproti tomu u dárce bez uvedené alely byli příjemci spojeni s vyšší

incidencí klinicky významné aGVHD (33%). Tento objev by mohl být užitečný pro děti s vrozenými metabolickými nebo imunologickými chorobami, u kterých není zapotřebí GvL (Gruhn B. et al., 2009). Dále pro změnu článek finských vědců odkazuje na toll-like receptory (TLR - studovány jiné polymorfismy), které jsou zapojené do celkového genetického rizika GVHD po alogenní TKKB a zdůrazňuje tak zapojení složky vrozené imunity do patobiologické dráhy GVHD (Sivula J. et al., 2012).

Výsledky této práce jsou přirozeně limitovány velikostí testovaných souborů pacientů s jejich dárci. I to je pravděpodobně jeden z důvodů, proč při striktní korekci na počet testovaných polymorfismů žádný z pozorovaných rozdílů na úrovni nominální statistické signifikance nedosáhl statistické významnosti při komplexním hodnocení. Naše výsledky je proto třeba brát jako nominaci možných markerů výskytu GVHD a nezbytná je u nich replikace (ověření) na dalších souborech. Taková replikace je v současné době plánována na rozsáhlém souboru pacientů po TKKB na pracovišti, kde tato diplomová práce vznikla.

## Závěr

V teoretické části této diplomové práce byl zpracován přehled o současných znalostech z oblasti transplantace krvetvorných kmenových buněk. Byly zde uvedeny základní informace o průběhu a různých typech transplantace a o zdrojích krvetvorných kmenových buněk. Dále byla tato práce zaměřena především na komplikace vyskytující se v posttransplantačním období, zejména na GVHD. V závěru teoretické části jsou pak zmíněny možné genetické, klinické a demografické faktory, které významnou měrou ovlivňují průběh a výsledek transplantace a mají také vliv (ať pozitivní, nebo negativní) na výskyt komplikací u transplantační léčby.

V úvodu experimentální části bylo charakterizováno 12 genů, na kterých leží 22 kandidátních polymorfismů, které byly dále vyšetřovány ve skupinách pacientů po HSCT, jejich dárců a vzorku zdravých kontrolních jedinců. Byly zde popsány použité genotypizační metody, zejména metoda MassArray. Dále byla provedena verifikace metody MassArray s použitím metod PCR-SSP a kvantitativní RT-PCR. K verifikaci byly využity tři polymorfismy na genech *TLR4*, *ANXA11* a *ATXN2L*. Byla provedena charakteristika studovaných souborů 143 párů pacient-dárce a 200 kontrolních jedinců a získané výsledky jednotlivých skupin byly shrnuty. Zjištěné frekvence studovaných polymorfismů testovaných metodou MassArray pak byly porovnány mezi podskupinami pacientů podle výskytu a závažnosti GVHD. Bylo zjištěno, že alela rs1049550\*T genu *ANXA11*, může u pacientů po transplantaci chránit proti výskytu akutní GVHD. Naopak přítomnost alely *CXCL12* rs1801157\*A, u pacientů i jejich dárců může zvyšovat riziko akutní GVHD. Poslední variantou s možným vlivem na zvýšení výskytu akutní GVHD je rs763780\*C na genu *IL17F*. U analýzy dalších podskupin a ostatních vyšetřovaných polymorfismů nebyly zjištěny výsledky, které by poukazovaly na jejich podstatnější vliv na průběh transplantace nebo výskyt GVHD.

## Literatura

- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Ambruzova Z., Mrazek F., Raida L., Stahelova A., Faber E., Indrak K., Petrek M. (2009) Possible impact of MADCAM1 gene single nucleotide polymorphisms to the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hum. Immunol.* **70**, 457-460.
- Ayuk F., Diyachenko G., Zabelina T., Panse J., Wolschke Ch., Eiermann T., Binder T., Fehse B., Erttmann R., Kabisch H., Bacher U., Kröger N., Zander A. R. (2008) Anti-thymocyte globulin overcomes the negative impact of HLA mismatching in transplantation from unrelated donors. *Exp. Hematol.* **36**, 1047-1054.
- Billingham R. E. (1966) The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* **62**, 21-78.
- Bui M., Gilady S. Y., Fitzsimmons R. E., Benson M. D., Lynes E. M., Gesson K., Alto N. M., Strack S., Scott J. D., Simmen T. (2010) Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties. *J. Biol. Chem.* **285**, 31590-31602.
- Cavanaugh J. A., Adams K. E., Quak E. J., Bryce m. E., O'Callaghan N. J., Rodgers H. J., Magarry G. R., Butler W. J., Eaden J. A., Roberts-Thomson I. C., Pavli P., Wilson S. R., Callen D. F. (2003) CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann. Hum. Genet.* **67**, 35-41.
- Cavet J., Middleton P. G., Segall M., Noreen H., Davies S. M., Dickinson A. M. (1999) Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood*, **94**, 3941-3946.
- Chien J. W., Duncan S., Williams K. M., Pavletic S. Z. (2010) Bronchiolitis obliterans syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation-an increasingly recognized manifestation of chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, S106-114.

- Congdon C. C., Urso I. S. (1957) Homologous bone marrow in the treatment of radiation injury in mice. *Am. J. Pathol.* **33**, 749-767.
- Cooley S., Weinsdorf D. J., Guethlein L. A., Klein J. P., Wang T., Le C. T., Marsh S. G., Geraghty D., Spellman S., Haagenson M. D., Ladner M., Trachtenberg E., Parham P., Miller J. S. (2010) Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* **116**, 2411-2419.
- Deretic V. (2006) Autophagy as an immune defence mechanism *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 375-382.
- Dupont B., Hsu K. C. (2004) Inhibitory killer Ig-like receptor genes and human leukocyte antigen class I ligands in haematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 634-643.
- Elmaagacli A. H., Koldehoff M., Hindahl H., Steckel N. K., Trenchel R., Peceny R., Ottinger H., Rath P. M., Ross R. S., Roggendorf M., Grosse-Wilde H., Beelen D. W. (2006) Mutations in innate immune system Nod2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation*, **81**, 247-254.
- Farag S. S., Fehninger T. A., Ruggeri L., Velardi A., Caligiuri M. A. (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* **100**, 1935-1947.
- Fučíková T. (1997) HLA systém. In *Klinická imunologie v praxi*, pp. 26-30, Galén, Praha, ČR.
- Goker H., Hazneradoglu I. C., Chao N. J. (2001) Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. *Exp. Hematol.* **27**, 259-277.
- Gratwohl A., Stern M., Brand R., Apperley J., Baldomero H., de Witte T., Dini G., Rocha V., Passweg J, Sureda A., Tichelli A., Niederwieser D. (2009) Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Cancer*, **115**, 4715-4726.

- Gruhn B., Intek J., Pfaffendorf N., Zell R., Corbacioglu S., Zintl F., Beck J. F., Debatin K. M., Steinbach D. (2009) Polymorphism of interleukin-23 receptor gene but not of NOD2/CARD15 is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**, 1571-1577.
- Heath R. J., Xavier R. J. (2009) Autophagy, immunity and human disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **25**, 512-520.
- Hizawa N., Kawaguchi M., Huang S. K., Nishimura M. (2006) Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 1109-1114.
- Hochrainer K., Mayer H., Baranyi U., Binder B., Lipp J., Kroismayr R. (2005) The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects. *Genomics* **85**, 153-164.
- Hofmann S., Franke A., Fischer A., Jacobs G., Nothnagel M., Gaede K. I., Schürmann M., Müller-Quernheim J., Krawczak M., Rosenstiel P., Schreiber S. (2008) Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat. Genet.* **40**, 1103-1106.
- Hořejší V. & Bartůňková J. (1998) *Základy imunologie*, pp. 157, TRITON, Praha, ČR.
- Ji Y., Walkowicz M. J., Buiting K., Johnson D. K., Tarvin R. E., Rinchik E. M., Horsthemke B., Stubbs L., Nicholls R. D., (1999) The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities, *Hum. Mol. Genet.* **8**, 533–542.
- Jurinke C., Denissenko M. F., Oeth P., Ehrich M., van den Boom D., Cantor C. R. (2005) A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutat. Res.* **573**, 83-95.
- Kaehler Ch., Isensee J., Nonhoff U., Terrey M., Hucho T., Lehrach H., Krobitsch S. (2012) Ataxin-2-Like Is a Regulator of Stress Granules and Processing Bodies. *Plos One* **7**, e50134.



- Koreth J., Aldridge J., Kim H. T., Alyea E. P., Cutler C., Armand P., Ritz J., Antin J. H., Ho V. T. (2010) Reduced-intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation in patients over 60 years: hematologic malignancy outcomes are not impaired in advanced age. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, 792-800.
- Korhonen R., Huotari N., Hömmö T., Leppänen T., Moilanen E. (2012) The expression of interleukin-12 is increased by MAP kinase phosphatase-1 through a mechanism related to interferon regulatory factor 1. *Mol. Immunol.* **51**, 219-226.
- Kim J. C., Ha Y. J., Roh S. A., Choi E. Y., Yoon Y. S., Kim K. P., Hong Y. S., Kim T. W., Cho D. H., Kim S. Y., Kim Y. S. (2013) Feasibility of proposed single-nucleotide polymorphisms as predictive markers for targeted regimen in metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, doi: 10.1038 /bjc.2013.163.
- Krejsek J., Kopecký O. (2004) Transplantace a imunitní systém. In *Klinická imunologie*, pp. 703-712, Nucleu HK, ČR.
- Krstevska S., Genadieva-Stavric S., Pivkova A., Stojanovski Z., Georgievski B., Balkanov T. (2011) Acute graft versus host disease in hematopoietic stem cell allotransplant recipients. *Med. Arh.* **65**, 260-264.
- Lee J. P., Bae J. B., Yang S. H., Cha R. H., Seong E. Y., Park Y. J., Ha J., Park M. H., Paik J. H., Kim Y. S. (2011) Genetic predisposition of donors affects the allograft outcome in kidney transplantation; polymorphisms of stromal-derived factor-1 and CXCR4 receptor 4. *PLoS One* 6, e16710.
- Levin A. M., Iannuzzi M. C., Montgomery C. G., Trudeau S., Datta I., McKeigue P., Fischer A., Nebel A., Rybicki B. A. (2013) Association of ANXA11 genetic variation with sarcoidosis in African Americans and European Americans. *Genes Immun.* **14**, 13-18.
- Loeffler J., Steffens M., Arlt E. M., Toliat M. R., Mezger M., Suk A., Wlenker T. F., Hebart H., Nürnberg P., Boeckh M., Ljungman P., Trenscher R., Einsele H. (2006) Polymorphisms in the genes encoding chemokine receptor 5, interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein 1 contribute to cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1847-1850.

- Loos T., Mortier A., Gouwy M., Ronsse I., Willy Put W., Lenaerts J. P., Van Damme J., Proost P. (2008) Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation *Blood* **112**, 2648-2656.
- Mattsson J., Ringdén O., Storb R. (2008) Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**, 165-170.
- Modi W. S., Scott K., Goedert J. J., Vlahov D., Buchbinder S., Detels R., Donfield S., O'Brien S. J., Winkler C. (2005) Haplotype analysis of the SDF-1 (CXCL12) gene in a longitudinal HIV-1/AIDS cohort study. *Genes. Immun.* **6**, 691-698.
- Morais A., Lima B., Peixoto M.J., Alves H., Marques A., Delgado L. (2012) BTNL2 gene polymorphism associations with susceptibility and phenotype expression in sarcoidosis. *Respir. Med.* **106**, 1771-1777.
- Morris S. M. jr., Kepka-Lenhart D., McGill R. L., Curthoys N. P., Adler S. (1992) Specific disruption of renal function and gene transcription by cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **267**, 13768-13771.
- Mrazek F., Stahelova A., Kriegova E., Fillerova R., Zurkova M., Kolek V., Petrek M. (2011) Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. *Genes. Immun.* **12**, 490-494.
- Murata M., Emi N., Hirabayashi N., Hamaguchi M., Goto S., Wakita A., Tanimoto M., Saito H., Kodera Y., Morishita Y. (2000) No significant association between HA-1 incompatibility and incidence of acute graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation in Japanese patients. *Int. J. Hematol.* **72**, 371-375.
- Nichols W. G., Corey L., Gooley T., Davis C., Boeckh M. (2002) High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipient of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J. Infect. Dis.* **185**, 273-282.
- Nishimori H., Maeda Y., Tanimoto M. (2013) Chronic graft-versus-host disease: disease biology and novel therapeutic strategies. *Acta Med. Okayama*, **67**, 1-8.

- Peng R., Yue J., Han M., Zhao Y., Liu L., Liang L. (2013) The IL-17F sequence variant is associated with susceptibility to tuberculosis. *Gene* **515**, 229-232.
- Perreault C., Décary F., Brochu S., Gyger M., Bélanger R., Roy D. (2013) Minor histocompatibility antigens. *Blood*, **76**, 1269-1280.
- Randolph S. S., Gooley T. A., Warren E. H., Appelbaum F. R., Riddell S. R. (2004) Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipient of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* **103**, 347-352.
- Ringdén O. (2005) Introduction to graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11**, 17-20.
- Rohoň P. a kolektiv (2009) Molekulární nástroje posttransplantačního sledování. In Molekulární biologie v hematologii – od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi, pp 91-100, Univerzita Palackého v Olomouci, ČR.
- Roncarolo M. G., Battaglia M. (2007) Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 585-598.
- Saitoh T., Tsukamoto N., Koiso H., Mitsui T., Yokohama A., Handa H., Karasawa M., Ogawara H., Nojima Y., Murakami H. (2011) Interleukin-17F gene polymorphism in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Eur. J. Haematol.* **87**, 253-258.
- Sivula J., Cordova Z. M., Tuimala J., Jaatinen T., Partanen J., Volin L., Turpeinen H. (2012) Toll-like receptor gene polymorphisms confer susceptibility to graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Scand. J. Immunol.* **76**, 336-341.
- Sivula J., Turpeinen H., Partanen J. (2009) Association of IL-10 and IL-10R $\beta$  gene polymorphisms with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor. *BMC Immunol.*, **10**, 1-7.
- Symons H. J., Leffel M. S., Rossiter N. D., Zahurak M., Jones R. J., Fuchs E. J. (2010) Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene

mismatche and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, 533-542.

Thomas E. D., Lochte H. L. jr., Lu W. C., Ferrebee J. W., (1957) Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **257**, 491-496.

Thomas E. D., Lochte H. L. jr., Cannon J. H., Sahler O. D., Ferrebee J. W. (1959) Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest.* **38**, 1901-1916.

Wolff S. N. (2002) Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **29**, 545-552.

Yan N., Yu Y. L., Yang J., Qin Q., Zhu Y. F., Wang X., Song R. H., Zhang J. A. (2012) Association of interleukin-17A and -17F gene single-nucleotide polymorphisms with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* **45**, 533-539.

Zhai Y., Xu K., Huang F., Peng H., Feng Ch., Zhu K., Leng R., Pan H., Ye D. (2012) Association of interleukin 23 receptor gene polymorphisms (rs10489629, rs7517847) with rheumatoid arthritis in European population: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 8987-8994.

#### **Internetové odkazy:**

<http://www.nobelprize.org>

<http://www.kostnidren.cz>

<http://www.mysequenom.com>

<http://visualsonline.cancer.gov>

## Seznam použitých zkratk

aGVHD	akutní GVHD
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ANXA11	annexin A11
APC	antigen presenting cell (buňka prezentující antigen)
ATG16L1	autophagy-related 16-like 1
ATXN2L	ataxin 2-like
BTNL2	butyrophilin like-2
CLL	chronická lymfoblastická leukemie
CLRs	C-type lectin receptors
CML	chronická myeloidní leukemie
CMV	cytomegalovirus
CXCL12	chemokin 12 (motif C-X-C)
CXCR3	chemokinový receptor 3
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ddNTPs	dideoxynukleotidtrifosfáty
dNTPs	deoxynukleotidtrifosfáty
cGVHD	chronická GVHD
EBV	virus Epstein-Barrové
EFI	European Federation for Immunogenetics (evropská federace pro imunogenetiku)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPCR	G protein-coupled receptor
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
GVHD	graft versus host disease
GVL	graft versus leukemia
HECT	homologous to E6-AP C terminus
HERC2	HECT a RLD domain containing
HLA	human leukocyte antigen
hME	homogenous mass extend
HO1	hem oxygenasa 1
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation
H-W rovnováha	Hardy-Weinbergova rovnováha

IDO	indolamin 2,3-dioxygenasa
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin (konkrétní typ udává číslo, např. IL-1)
INF $\gamma$	interferon $\gamma$
iNOS	inducible nitric-oxide synthase
JAK2	Janus kinase 2
KIR	killer immunoglobulin-like receptor
KGF	keratinocyte growth factor
LCR	leukocyte receptor complex
LPS	lipopolysacharid
MADCAM1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
mHaq	minor histocompatibility antigens
MHC	major histocompatibility komplex
MiHA	minor histocompatibility antigens
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NK	natural killer (přirození zabijedči)
NLRs	NOD-like receptors
NOD	nukleotide-binding oligomerization domain
NTPs	nukleotid trifosfát
OR	odds ratio
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PCR	polymerase chain reaction
PCR-SSP	polymerase chain reaction with sequence specific primers
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molekule
PKA	proteinkinasa A
PRRs	pattern recognition receptors
qRT PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RCC1	regulator of cell cycle 1
rG-CSF	recombinant granulocyte colony-stimulating factor
rGM-CSF	recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
rHuKGF	recombinant human keratinocyte growth factor
RAB32	Ras onkogen
RIG	retinoic acid-inducible gene

RLD	RCC1 like domain
RLR	RIG-like receptors
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SCF	stem cell factor
SDF1	stromal-derived factor-1
SNP	single nukleotide polymorphism
STAT	signal transducer and activator of transcription
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-cell receptor
TBE	Tris/borát/EDTA
TGF	transforming growth factor
Th lymfocyty	T helper lymfocyty (Th1 a 2)
TKKB	transplantace krvetvorných kmenových buněk
TLR4	toll-like receptor 4
T <sub>R1</sub>	regulační T-lymfocyt typu 1
T <sub>REG</sub>	regulační T-lymfocyt
TNF	tumor necrosis factor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1