

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Dagmar Smitalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Souvislost vybraných genů imunitní odpovědi
a úspěšnosti transplantace krevetvorných
kmenových buněk**

Bakalářská práce

Dagmar Smitalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Doc. MUDr. František Mrázek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce Doc. MUDr. Františka Mrázka, PhD. a uvedla jsem všechny použité zdroje informací.

Souhrn

Transplantace krvetvorných kmenových buněk je nepostradatelná pro léčbu některých maligních onemocnění krve, řady imunodeficiencí a metabolických chorob. Její výsledky jsou podstatně ovlivňovány geny hlavního histokompatibilního komplexu určujícími tkáňovou kompatibilitu a také dalšími geny zapojenými v imunitní odpovědi organismu a zánětu.

Jednou z nejdůležitějších potransplantačních komplikací zůstává přes veškerý pokrok v hematologii, imunologii i imunogenomice stále nemoc štěpu proti hostiteli (GVHD, z angl. graft versus host disease). Jedná se o komplexní onemocnění, které je vyvoláno rozpoznáním pacientových antigenů dárcovskými T lymfocyty. Výskyt i závažnost nemoci štěpu proti hostiteli mohou být ovlivňovány geny spojenými s imunitní odpovědí a geny, které podmiňují zánětlivá onemocnění cílových tkání GVHD.

V rámci experimentální části této bakalářské práce byl navržen a zaveden protokol pro typizaci vybraného polymorfismu genu *ataxin-2-like*, jehož mutace je spojena se zánětlivým onemocněním střev. Tento polymorfismus je tak relevantním kandidátem pro možnou asociaci s výskytem GVHD. Dále byla provedena analýza možného vztahu mezi variantami jiného kandidátního genu (*integrin α_4 , ITGA4*) a GVHD na souboru 58 pacientů po transplantaci krvetvorných kmenových buněk. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v nosičství alel *ITGA4* mezi podskupinami pacientů s výskytem akutní nebo chronické GVHD a pacientů bez těchto komplikací. Získaná data naznačují, že studovaný polymorfismus genu *ITGA4* významně neovlivňuje riziko GVHD.

Summary

Hematopoietic stem cell transplantation is essential for treatment of many hematologic malignancies, series of immunodeficiency disorders and metabolic disorders. HSCT outcome is strongly influenced by the genes of major histocompatibility complex that determine the tissue compatibility, and is also affected by further genes involved in immune response and inflammation.

Despite all the progress in hematooncology, immunology and immunogenomics, graft-versus-host disease (GVHD) remains an important and frequent serious post-transplant complication. GVHD is a complex disease and is caused by donor T-lymphocytes recognizing patient's antigens. The occurrence and severity of graft-versus-host disease can be affected by genes involved in immune response and also genes, which are implicated in the pathogenesis of diseases affecting target tissues of GVHD.

In the experimental part of this bachelor thesis a protocol for typing of the selected polymorphism of the *ataxin-2-like* gene, which is associated with inflammatory bowel diseases, was designed and introduced. This polymorphism is considered as a plausible candidate for association with GVHD. Furthermore, an analysis of possible association between another candidate gene (*integrin α_4 , ITGA4*) and GVHD was performed on the group of 58 patients after HSCT. No significant difference in the carriage of *ITGA4* alleles was found when the patients with acute/chronic GVHD were compared with those without GVHD. These data suggest that investigated *ITGA4* polymorphism does not substantially affect the risk of GVHD.

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce Doc. MUDr. Fratišku Mrázkovi, PhD. za čas a cenné rady, které mi poskytl během tvorby této bakalářské práce. Děkuji také zaměstnancům Ústavu imunologie LF UP a FN Olomouc a externím spolupracovníkům z transplantačního centra v Lublani. Tato práce vznikla s částečnou podporou projektů IGA MZ ČR NT12454-5 a CZ.1.05./2.1.00/01.0030.

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíle práce:.....	10
3. Současný stav řešené problematiky	11
3.1 Transplantace krvetvorných kmenových buněk	11
3.1.1 Typy transplantace.....	11
3.1.2 Indikace k alogenní transplantaci	11
3.1.3 Zdroje krvetvorných kmenových buněk	13
3.2 Faktory ovlivňující výsledky transplantace krvetvorných kmenových buněk	14
3.2.1 Klinické a biologické faktory	14
3.2.2 Genetické faktory.....	16
3.2.2.1 HLA	16
3.2.2.2 Non-HLA.....	17
3.2.3 Potransplantační komplikace	19
3.2.3.1 Relaps	19
3.2.3.2 Infekce	19
3.2.3.3 GVHD.....	20
3.3 Identifikace a typizace polymorfismů imunitních genů	21
3.3.1 PCR-SSP.....	21
3.3.2 SSOP.....	21
3.3.3 Microarray	22
3.3.4 Sekvencování.....	22
4. Materiál a metodika	23
4.1 Materiál.....	23
4.2 Metody	23
4.2.1 Izolace DNA a měření koncentrace	23
4.2.1.1 Izolace pomocí přístroje Arrow (NorDiag, Norsko) a soupravy Arrow Blood DNA 500.....	23
4.2.1.2 Mikroizolace pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit.....	24
4.2.1.3 Měření koncentrace DNA.....	25
4.2.2 Amplifikace sekvence DNA pomocí PCR-SSP	25
4.2.3 Příprava 2% agarózového gelu a elektroforéza PCR směsí, focení gelu.....	27

4.2.4 Statistická analýza souboru pacientů genotypizovaných pro polymorfismus v genu <i>ITGA4</i>	28
5. Výsledky.....	29
6. Diskuze.....	35
7. Závěr.....	37
8. Seznam použitých zkratek.....	38
9. Literatura	39

1. Úvod

Transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT, z angl. hematopoietic stem cell transplantation) je široce uznávanou léčebnou metodou pro řadu vrozených nebo získaných vážných onemocnění krevního systému, metabolických chorob a autoimunitních onemocnění. V České republice existuje v současné době 6 transplantačních center, která se HSCT zabývají. Vhodný dárcce pro HSCT je pro konkrétního pacienta primárně vyhledáván v rodině. V případech, kdy není příbuzenský dárcce k dispozici nebo nemá dostatečnou genetickou shodu v genech pro proteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. Major Histocompatibility Complex, u člověka HLA), se v posledních desetiletích otevřela možnost využívat dárcce z registrů nepříbuzenských dárců. V České republice bylo ke konci roku 2012 k dispozici asi 60 tisíc dobrovolných dárců, z toho v Českém národním registru dárců dřeně se sídlem v Plzni jich bylo zapsáno asi 40 tisíc. V celosvětové databázi „Bone Marrow Donors Worldwide“ (BMDW) je zaregistrováno přes 21 milionů lidí.

Během čtyřiceti pěti let, které uplynuly od první transplantace, došlo ke značnému rozvoji postupů spojených s HSCT, zejména v oblasti klinické diagnostiky a podpůrné léčby, což vedlo také k podstatnému zlepšení výsledků tohoto typu transplantace. Velmi významnou roli sehrává intenzivní výzkum imunologických mechanismů u HSCT, a to jak na úrovni buněčné, tak molekulární. Jedním z hlavních oblastí zájmů se staly genetické faktory, které mohou výsledky HSCT ovlivňovat. Do této oblasti se dlouhodobě řadí shoda v HLA systému mezi dárcem a příjemcem, ale také celá řada jiných genových variant, souhrnně označovaných jako tzv. non-HLA polymorfismy.

2. Cíle práce:

Teoretická část:

- 1) Zpracovat literární přehled o transplantacích kostní dřeně (krvetvorných kmenových buněk); při tom se zaměřit na indikace této léčebné techniky, zdroje krvetvorných buněk a nejvýznamnější komplikace.
- 2) Na základě dostupné literatury zhodnotit nejvýznamnější faktory podmiňující úspěšnost transplantace se zaměřením na variabilitu imunitních genů (HLA a nonHLA).

Praktická část:

- 1) Zpracovat biologický materiál (izolovat DNA) v prospektivním souboru pacientů po transplantaci krvetvorných buněk a jejich dárců
- 2) Navrhnout a aplikovat protokol pro genotypizaci vybraného polymorfismu imunitního genu *ATXN2L* rs8049439, který je kandidátním polymorfismem pro uplatnění u GVHD reakce
- 3) Analyzovat genotypizační data získaná na retrospektivním souboru pacientů po HSCT v závislosti na výskytu GVHD

3. Současný stav řešené problematiky

3.1 Transplantace krvetvorných kmenových buněk

3.1.1 Typy transplantace

Podle vztahu mezi dárcem a příjemcem se transplantace krvetvorných buněk (a transplantace obecně) dělí na autologní a alogenní. Při autologních transplantacích jsou pacientovi odebrány jeho vlastní krvetvorné kmenové buňky, které jsou dlouhodobě uskladněny pro další léčbu. Po přípravném režimu (chemoterapie, ozáření), který zásadně poškodí krvetvorbu, se pacientovi jeho buňky vrátí zpět tak, aby byla krvetvorba obnovena. Autologní transplantace není doprovázena komplikacemi z aloimunity, jako jsou reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, z angl. graft versus host disease) nebo rejekce transplantátu. Mezi hlavní indikace autologní transplantace patří např. mnohočetný myelom nebo některé typy lymfomů, v recentní době se využívá i pro léčbu autoimunitních onemocnění.

Alogenní transplantace probíhá mezi dvěma různými jedinci téhož druhu. Při alogenní transplantaci je dárci, který má co největší HLA shodu s příjemcem, odebrána kostní dřeň nebo kmenové buňky z periferní krve a takto získaný transplantát je převeden příjemci. Hlavním předmětem zájmu této bakalářské práce je alogenní transplantace krvetvorných buněk, proto se jí bude podrobněji věnovat další text.

3.1.2 Indikace k alogenní transplantaci

Transplantace krvetvorných kmenových buněk jsou nejčastěji prováděny u maligních onemocnění krvetvorby, z nichž jde nejčastěji o akutní myeloidní leukémii (AML), akutní lymfoblastickou leukémii (ALL) nebo chronickou myeloidní leukémii (CML), u které však význam HSCT poklesl s používáním nových typů léčby. Leukémie, které provází nekontrolované množení nádorových buněk, jsou obecně spjaty s chromozomálními aberacemi, jako jsou translokace, delece, inverze a duplikace v prekurzorových hematopoetických buňkách nebo zralých buňkách imunitního systému.

Akutní leukémie, ať už myeloidní nebo lymfoblastická, nevykazují žádnou chromozómovou aberaci, která by byla pro tato onemocnění vysloveně specifická. Často bývá pozorována aneuploidie, polyploidie a pseudodiploidie, v karyotypu lze nalézt také

translokace a inverze, u některých pacientů byl potvrzen i nález filadelfského chromozómu, který je jinak jedním z markerů chronické myeloidní leukémie. V řadě případů akutních leukémií zůstává v současné době alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk jedinou možností k vyléčení choroby.

Chronická myeloidní leukémie je typická výskytem tzv. filadelfského chromozómu (Philadelphia chromosome, Ph1) v nádorové buňce vzniklé z erytroidní, granulocytové nebo megakaryocytové prekurzorové buňky (Whang a kol., 1963). Filadelfský chromozóm vzniká translokací $t(9;22)(q34,q11)$, kdy dochází k fúzi *abl* protoonkogenu s 5' koncem *bcr* genu. Jejich společným produktem je pak chimerický protein BCR-ABL, který má zvýšenou tyrozin-kinázovou aktivitu. Léčby transplantací se využívá v případě, kdy selhává léčba tyrozin-kinázovými inhibitory nebo se nemoc dostává do pokročilé fáze.

Transplantace krvetvorných buněk je využívána i pro léčbu nemaligních onemocnění krvetvorby, jako jsou vrozené primární imunodeficience nebo metabolická onemocnění. Obě uvedené skupiny onemocnění jsou obecně způsobeny mutacemi v kódujících oblastech pro proteiny, které jsou důležité pro správnou funkci imunitního systému nebo metabolických drah. Cílem transplantace je nahradit defektní buňky krevního systému zdravými, které obnoví pacientův imunitní systém nebo syntézu kritických enzymů. Nejčastějšími typy primárních imunodeficiencí léčených transplantací krvetvorných buněk jsou těžká kombinovaná imunodeficience (SCID, z angl. Severe Combined Immune Deficiency), Wiskott-Aldrichův syndrom (WAS), hyper IgM syndrom, Chédiak-Higashi syndrom a dědičná lymfohistiocytóza (HLH, z angl. Hereditary Lymphohistiocytosis). Metabolická onemocnění, u kterých se provádí transplantace krvetvorných buněk, jsou osteopetróza, Gaucherova choroba, Hurlerův syndrom, několik druhů mukopolysacharidóz (MPS), jako je Morquio syndrom (MPS IV) a Maroteaux-Lamy syndrom (MPS VI), adrenoleukodystrofie (ALD) a metachromatická dystrofie (Sullivan a kol., 2000).

Dalším nemaligním onemocněním krvetvorby, pro které se využívá léčba pomocí alogenní transplantace, je aplastická anémie. Jedná se o poměrně vzácné onemocnění krvetvorby, které se projevuje značnou redukcí v počtu buněk krevního oběhu – bílých krvinek, červených krvinek i krevních destiček, a nízkým počtem buněk v kostní dřeni. Nejčastější příčinou tohoto onemocnění je autoimunitní reakce lymfocytů proti krvetvorným buňkám, což vede k poruše hematopoézy. Aplastická anémie je většinou získané onemocnění, v ojedinělých případech je dědičná (Brodsky a Jones, 2005).

3.1.3 Zdroje krvetvorných kmenových buněk

Historicky starším zdrojem krvetvorných kmenových buněk je klasický odběr kostní dřeně, který se dnes provádí v celkové anestézii opakovanou punkcí lopaty kosti kyčelní. V poslední době se stále častěji využívá odběru krvetvorných kmenových buněk z periferní krve, které jsou získávány přímo z dárcovy krve v separačním přístroji (zpravidla bez celkové anestézie). Aby byl sběr krvetvorných buněk efektivní a dostatečný, je třeba jejich počet v periferní krvi dostatečně zvýšit, což lze provést opakovaným podáním růstových faktorů krvetvorby (např. G-CSF, z angl. granulocyte colony - stimulating factor).

Ve srovnání s klasickým odběrem kostní dřeně je obnova krvetvorby, zejména neutrofilních buněk a krevních destiček, u transplantátu kmenových buněk z periferní krve rychlejší a u pacientů s pokročilejšími fázemi nemoci značně snižuje riziko úmrtí spojeného s léčbou (TRM, z angl. treatment related mortality) oproti transplantaci buněk z kostní dřeně. Riziko akutní nemoci štěpu proti hostiteli (GVHD) je u obou srovnatelné, ovšem riziko výskytu chronické GVHD je u transplantace kmenových buněk z periferní krve zvýšené (Champlin a kol., 2000).

Třetím možným zdrojem krvetvorných kmenových buněk je pupečnicková krev. Využívá se jako alternativní zdroj kmenových buněk u pacientů, kterým chybí odpovídající dospělý dárců shodný v HLA znacích. Pro transplantaci pupečnickové krve v řadě případů stačí pouze vyšetření HLA antigenů I. a II. třídy na úrovni nízkého rozlišení, protože vyšší rozlišení dosažené typizací alel dále nezlepšuje výsledky transplantace. Mezi příjemcem a dárcem mohou být až 3 HLA neshody, i přesto je výskyt akutní a chronické GVHD snížený, nejspíše z důvodu nezralosti dárcovských T lymfocytů, nízkého počtu T lymfocytů v transplantátu a celkově snížené aloreaktivity (Kögler a kol., 2005). Nevýhodou transplantace z pupečnickové krve je pomalejší obnovení krvetvorby a také vyšší riziko TRM, která je v přímé úměře s počtem krvetvorných buněk, který často není dostatečný pro transplantaci u dospělých jedinců (Wang a kol., 2010).

3.2 Faktory ovlivňující výsledky transplantace krvetvorných kmenových buněk

Výsledek transplantace krvetvorných kmenových buněk je ovlivněn celou škálou faktorů, které se týkají genetických polymorfismů pacienta i dárce, a také faktorů klinických a biologických, jako je věk dárce a pacienta, druh nemoci, kterou pacient má a zda má i jiné komplikace.

3.2.1 Klinické a biologické faktory

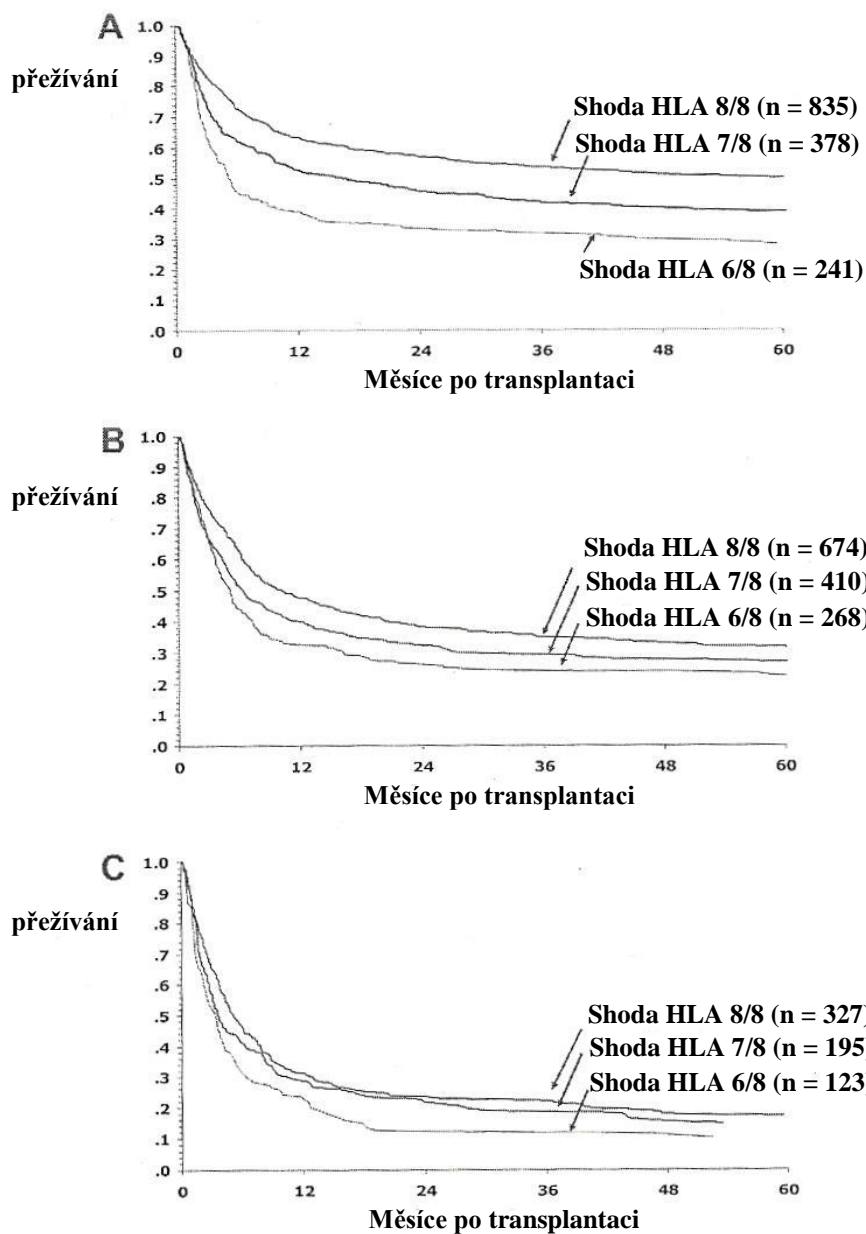
Klasická myeloablativní příprava pacienta před transplantací je založena na co nejvyšších dávkách systémové chemoterapie nebo ozáření pro zničení defektních buněk krevního systému, následně jsou pacientovi transplantovány zdravé krvetvorné kmenové buňky, aby se zabránilo aplasii kostní dřeně vyvolané léčbou. Tato metoda s sebou nese toxická rizika a je úspěšně používána pouze u mladších pacientů bez jiných chorob. Kvůli vysoké úmrtnosti se tato léčba neaplikuje u pacientů starších 45 let, u pacientů s dalšími vážnými onemocněními a u silně přeléčených pacientů. Pro takovýto soubor pacientů se využívá příprava s redukovanou intenzitou (RIC, z angl. reduced intensity conditioning) nebo úplně nemyeloablativní příprava následovaná alogenní transplantací. Hlavním léčebným faktorem je efekt štěpu proti tumoru (GVT, z angl. graft versus tumor), kdy dárčovské T lymfocyty napadají pacientovy nádorové a defektní buňky. S touto funkcí bývají někdy spojovány i B lymfocyty a NK buňky (Servais a kol., 2011).

Dalším klinickým faktorem je druh a stádium nemoci. U agresivních maligních onemocnění je relaps častým důvodem úmrtí pacientů a selhání štěpu také výrazně snižuje přežívání, na rozdíl od nemaligních onemocnění, kde selhání štěpu nemá na přežívání téměř žádný vliv (Olsson a kol., 2013). U nemocí v pokročilých stádiích léčených transplantací krvetvorných buněk je přežívání značně sníženo a je v zásadě stejné u pacientů s úplnou shodou v alelách pro HLA jako u pacientů s jednou či dvěma neshodnými alelami, na rozdíl od nemocí v počátečních stádiích, kdy míra shody alel pro HLA významně ovlivňuje výsledné přežívání pacientů, jak je patrné na obrázku č. 1 (Lee a kol.).

Výsledek transplantace je také ovlivňován pohlavím dárce a pacienta. Platí, že kombinace ženského dárce s mužským pacientem vede k zvýšenému riziku TRM a snižuje přežívání u všech typů onemocnění (Gratwohl a kol., 2009). T lymfocyty ženského dárce

mohou být specifické pro mHA na chromozómu Y a můžou tak přispívat ke vzniku GVHD, ale i GVT (Nannya a kol., 2011).

Obrázek č. 1: grafy přežívání pacientů s časným (graf A), středně pokročilým (graf B) a silně pokročilým stádiem nemoci v závislosti na shodě v HLA alelách (upraveno podle Lee a kol., 2007)



3.2.2 Genetické faktory

Genetické faktory mají zásadní vliv na výsledek transplantace krvetvorných kmenových buněk. Ať už se jedná o hlavní histokompatibilní komplex nebo další polymorfismy v lidském genomu, porozumění jejich funkci je důležité pro zlepšení přežívání pacientů a snížení celkové úmrtnosti.

3.2.2.1 HLA

Lidské leukocytární antigeny (HLA, z angl. human leukocyte antigens) je označení pro molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. major histocompatibility complex) člověka. Jsou to polymorfní glykoproteiny vyskytující se na povrchu většiny jaderných buněk a jsou zodpovědné za buněčnou imunitu tím, že zprostředkovávají kontakt antigenu (antigenního peptidu) s receptorem T lymfocytů (Shiina a kol., 1999).

Genová oblast HLA, nebo také MHC komplex, se nachází na krátkém raménku chromozómu 6, konkrétně v pozici 6p21.3, je velká asi 4 Mb a obsahuje více jak 180 genů pro proteiny uplatňující se v imunitním systému. Tato oblast je dále dělena (směrem od centromery k telomeře) na oblast HLA-třídy II, třídy III a třídy I (Shiina a kol., 1999). Z hlediska histokompatibility a transplantace lze za nejdůležitější považovat lokusy HLA-I. třídy A, B, C a HLA-II. třídy DR, DQ a DP. Tyto lokusy vykazují obecně extrémně vysoký polymorfismus (variabilitu) v rámci lidského druhu, aktuálně bylo nalezeno téměř 7 000 alel pro HLA I. třídy s nejvíce polymorfním lokusem HLA-B, a téměř 1 900 alel pro HLA II. třídy, u které je nejvíce polymorfní lokus DRB1 (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html).

HLA molekuly jsou kritické pro tzv. tkáňovou kompatibilitu uplatňující se při transplantacích, obzvláště při transplantaci krvetvorných buněk. Pokud jsou dárcovy histokompatibilní antigeny rozpoznány příjemcovými lymfocyty, může dojít až k odmítnutí (rejekci) štěpu. Pokud nastane situace, že jsou naopak příjemcovy histokompatibilní antigeny rozpoznány dárcovými lymfocyty, může dojít ke vzniku nemoci štěpu proti hostiteli (GVHD). Tyto reakce a s nimi spojené komplikace, které do značné míry omezují úspěšnost transplantací, označujeme jako „aloimunitní“.

První transplantace kostní dřeně mezi sourozenci shodnými v HLA znacích byla provedena roku 1968 v Minnesotě skupinou vedenou doktorem Robertem A. Goodem.

S přibývajícím počtem úspěšných transplantací bylo jasné, že shoda v HLA znacích je nejdůležitější pro překonání genetických rozdílů mezi pacientem a dárce. S narůstajícím počtem pacientů a aplikací transplantací pro široké spektrum nemocí bylo potřeba vyhledávat dárce nejen mezi sourozenci, ale i v širší rodině a později i mezi nepříbuznými dárce, přičemž bylo zjištěno, že GVHD a TRM mají přímou spojitost se stupněm neshody v HLA znacích mezi pacientem a dárce. Po objevu PCR techniky a sekvencování DNA bylo možné testovat shodu v HLA na úrovni jednotlivých alel a v těchto genech byl nalezen nečekaně velký polymorfismus (Hansen a kol., 2008). V současné době je snahou nalézt dárce shodného s pacientem v 10 alelách na pěti nejvýznamnějších genech: HLA-A, B, C, DRB1 a DQB1 (tzv. HLA shoda 10/10).

3.2.2.2 Non-HLA

I přes úplnou shodu mezi dárce a pacientem v HLA alelách je úmrtnost pacientů poměrně vysoká a často se vyskytují komplikace jako je GVHD. Proto jsou hledány další genomové oblasti mimo HLA geny, které mají vliv na výsledek transplantace. Jedná se především o geny vedlejších histokompatibilních antigenů (mHag, z angl. minor histocompatibility antigen) a o jednonukleotidové polymorfismy (SNP, z angl. single nucleotide polymorphism) a mikrosatelity (jako markery kauzálních variant) v genech pro cytokiny a cytokinové receptory. Některé z těchto variant leží uvnitř MHC komplexu na chromozómu 6, některé v jeho těsné blízkosti a velká část je od něj ve větší vzdálenosti, i na jiných chromozómech. V poslední době se ukazuje, že roli mohou hrát i další polymorfismy v jiných genech podílejících se na funkci imunitního systému (Dickinson, 2008). Existuje také názor, že při alogenní transplantaci od nepříbuzného dárce by měla být shoda i v non-HLA sekvencích nacházejících se v těsné blízkosti nebo uvnitř MHC komplexu (obrázek č. 2), aby tak bylo dosaženo podobné shody, jakou má sourozenecký HLA-identický pár (Li a kol., 2004).

Nesynonymní SNP varianty v exonech způsobují změnu v aminokyselinovém řetězci produktu, v intronech pak mohou ovlivňovat expresi genu nebo sestřih mRNA. Určité sekvence tak díky změně jednoho nukleotidu mohou produkovat vyšší nebo nižší množství produktu nebo pozměněný až nefunkční produkt. Proto bývají asociovány i s některými onemocněními, nejen s potransplantačními komplikacemi, a jsou velmi intenzivně studovány. Potvrzený vliv na výsledek transplantace krvetvorných buněk mají např. SNP varianty v genech pro cytokiny, jako je *TNF* (tumor nekrotizující faktor), *IL-6*

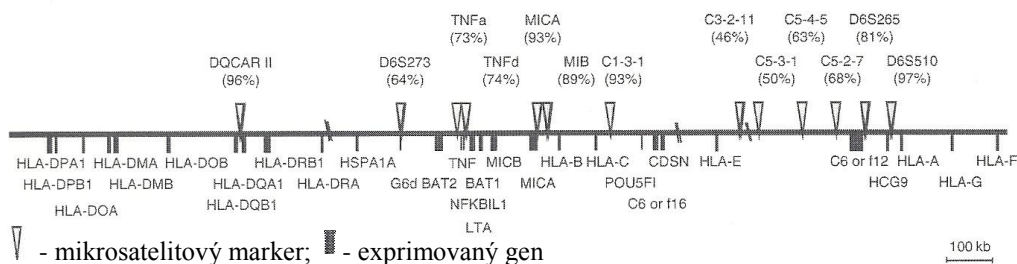
(interleukin 6), *IL-10* a *IFN γ* (interferon γ), a také *NOD2* genu, který produkuje protein rozpoznávající patogenní ligandy a spouštějící zánětlivou odpověď.

V praktické části této bakalářské práce byly testovány SNP v genech *ATXN2L* (ataxin-2-like) a *ITGA4* (integrin α_4). Tyto geny se staly pro svou funkci a spojení s nemocemi kandidátními geny pro možný vliv na výskyt a závažnost GVHD.

Gen *ATXN2L* byl pojmenován podle svého homologa ataxinu 2 (*SCA2*), jehož mutace způsobuje neuronální dysfunkci, a nachází se na chromozómu 16, konkrétně v pozici 16p11 blízko centromery (Figueroa a Pulst, 2003). Produkuje protein se zatím neznámou funkcí. SNP s označením rs8049439 se nachází v intronické sekvenci tohoto genu a jeho vzácná mutantní G varianta je spojena s výskytem zánětlivých onemocnění střev, jako je Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (Imielinski a kol., 2009), (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs8049439#map).

Gen *ITGA4* produkuje α_4 podjednotku integrinů $\alpha_4\beta_1$ a $\alpha_4\beta_7$. Tyto integriny jsou primárně exprimovány na povrchu řady leukocytů a hrají významnou roli ve vstupování lymfocytů, monocytů a eosinofilů do míst, kde se vyvíjí zánět. $\alpha_4\beta_7$ integrin, dříve nazývaný LPAM-1 (z angl. lymphocyte Peyer patch adhesion molecule), působí jako „homing-receptor“ lymfocytů do zažívacího traktu díky specifické reakci s MAdCAM-1 (z angl. mucosal addressin cell adhesion molecule-1) na endoteliálních venulách v Peyerových placích a ve střevní lamina propria. Méně pak reaguje s VCAM-1 a fibronectinem, které se váží spíše s $\alpha_4\beta_1$ integrinem. Blokací β_7 podjednotky u myši došlo k významnému snížení závažnosti GVHD a k menšímu poškození cílových orgánů (Waldman a kol., 2006). Při blokaci α_4 podjednotky bylo pozorováno zlepšení stavu zánětlivého onemocnění střev u zvířecích modelů i u lidí. Proto je tato podjednotka dalším kandidátem pro testování účinku na GVHD, a to konkrétně SNP rs4667319, který se nachází v exonu 24 a vyskytuje se ve variantě A a G (O’doherly a kol., 2009).

Obrázek č. 2: Fyzická mapa HLA regionu zahrnující 3,6 Mb s pozicemi některých mikrosatelitů (převzato od Li a kol., 2004)



3.2.3 Potransplantační komplikace

I přes veškeré pokroky moderní medicíny a typizace hlavních HLA genů se přežívání pacientů po 5 letech od transplantace pohybuje pouze kolem 50%. Hlavními příčinami úmrtí jsou infekce, relaps (návrat nemoci) a v neposlední řadě GVHD.

3.2.3.1 Relaps

V případě, že pacientovy defektní buňky nejsou zničeny ani předtransplantační léčbou ozářením a chemoterapií, ani následnou aloreakcí T lymfocytů dárce po transplantaci, nastává relaps nemoci. Děje se tak obzvláště u pacientů s redukovanou intenzitou přípravného režimu nebo nemyeloablativní přípravou, kdy hlavním nástrojem zničení vadných buněk je GVT. Hlavní strategií pro omezení relapsů je použití nových léčiv nebo zvyšování dávek léčiv již zavedených a také zvýšení účinnosti GVT se snížením vlivů GVHD.

3.2.3.2 Infekce

Při přípravě pacienta na transplantaci dochází k částečnému zničení jeho imunitního systému. Otvírají se tak možnosti pro různé infekce, které mohou napadnout pacientovy tkáně poškozené radioaktivním ozářením a chemoterapií. Po transplantaci trvá několik týdnů, než se imunitní systém obnoví, a u pacientů s rizikem vzniku GHVD je navíc potlačován pomocí léků. Infekce se nejčastěji projevují jako pneumonie, průjmy a systémové infekce. Patogeny, které tyto onemocnění způsobují, jsou především bakterie, jako jsou stafylokoky, enterokoky a streptokoky, ale vyskytují se i kvasinkové, virové a houbové infekce.

Před transplantací je důležité zjistit sérologický status cytomegaloviru (CMV) pacienta i dárce pomocí testování na anti CMV protilátky. Po transplantaci totiž může dojít k reaktivaci viru a k infekčnímu onemocnění až smrti, riziko je vyšší u pacientů s neúplnou shodou v HLA znacích. Nejlepších výsledků dosahují pacienti a dárce bez IgG CMV protilátek, ovšem pokud má pacient IgG CMV protilátky, je lepší vybírat imunokompetentní dárce s IgG CMV pozitivitou (Jaskula a kol., 2012).

3.2.3.3 GVHD

Nemoc štěpu proti hostiteli neboli GVHD je komplexní onemocnění způsobené rozpoznáním pacientových antigenů tkáňové kompatibility dárcovými T lymfocyty. Dělí se podle času objevení od transplantace na akutní GVHD, která se projeví do 100 dnů od transplantace, a chronickou GVHD, jejíž první známky se objevují až po 100 dnech od transplantace. Dále jsou klasifikovány podle stupně závažnosti, stupeň I-II značí lehčí až středně těžkou formu akutní GVHD, stupeň III-IV znamená těžkou akutní GVHD. Chronická GVHD je buď lokální, která je omezená na jeden typ tkáně a má poměrně slabé projevy, nebo extenzivní, která se projevuje podobně jako autoimunitní onemocnění a je agresivnější.

Předpokládaný mechanismus GVHD je poměrně komplikovaný a dá se popsat jako výsledek cytokinové bouře. Na začátku před transplantací jsou pacientovy orgány a tkáně poškozeny chemoterapií a ozářením, což způsobí vyplavení prozánětlivých cytokinů, jako $\text{TNF}\alpha$ a IL1. Tyto cytokiny zvýší expresi MHC antigenů, adhezivních molekul, kostimulačních molekul a vytváří se chemokinové gradienty; dochází také k aktivaci tkáňových buněk. Po transplantaci dárcovy zralé T lymfocyty rozpoznají pacientovy aloantigeny exprimované antigen prezentujícími buňkami pacienta a začnou proliferovat a diferencovat se. Tyto aktivované T lymfocyty pak vstupují do cílových tkání pro GVHD, což jsou plíce, střeva, kůže a játra a způsobují destrukci těchto tkání svou přímou cytotoxickou aktivitou a nepřímo vysíláním signálů dalším druhům lymfocytů, např. regulačním T lymfocytům a NK buňkám (z angl. natural killer cells). Poškozením tkáně se zvyšuje množství cytokinů signalizujících zánět a tato další cytokinová bouře jen podporuje rozvoj GVHD (Socié a Blazar, 2009; Ferrara, 1993).

Aloreaktivní T lymfocyty ovšem nemají jen negativní vliv na stav pacienta po transplantaci. V případě, že dárcovy T lymfocyty rozeznají reziduální nádorové buňky pacienta, dochází ke kontrole nad nemocí a může nastat až její úplné vymizení. Tato přínosná forma GVHD se nazývá efekt štěpu proti tumoru (GVT, z angl. graft versus tumor) nebo také efekt štěpu proti leukémii (GVL, z angl. graft versus leukemia). Ačkoliv je těžké oddělit tento efekt od GVHD, ukázalo se, že mohou existovat i samostatně a proto je snahou v klinické praxi potlačit GVHD bez stejného působení na GVT. Takovou roli by mohly sehrát infúze aloreaktivních NK buněk, které dokáží indukovat GVT efekt bez GVHD (Rezvani a Storb, 2008).

3.3 Identifikace a typizace polymorfismů imunitních genů

Pro typizaci HLA a dalších genů se používá velké množství metod, pro většinu z nich je zásadní první krok – amplifikace vybraného úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction), což je enzymatická amplifikace DNA pomocí krátkých sekvencí primerů a termostabilní DNA polymerázy (Saiki a kol., 1988). Před objevením PCR byly používány pouze sérologické metody založené na reakci protilátek s HLA antigeny. Až v éře molekulární biologie s použitím PCR reakce bylo možné typizovat samotné alely a objevit tak obrovský polymorfismus HLA genů. Dnešní metody používané v imunogenetických laboratořích zahrnují především PCR-SSP (PCR se sekvenčně specifickými primery), sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy (SSOP), tzv. microarray techniky, sekvencování podle Sanger a next-generation sekvencování.

3.3.1 PCR-SSP

PCR-SSP využívá metodiku PCR se sekvenčně specifickými primery. Tyto primery se od sebe navzájem liší svými 3' konci, kterými se váží na polymorfismy v HLA alelách a specificky amplifikují tyto sekvence. Specifické primery zajistí vznik PCR produktu pouze v případě, že se ve vzorku nachází „správná“ alela, ke které jsou navrženy. S narůstajícím počtem nově nalezených HLA alel přibývají i sady těchto specifických primerů, které se komerčně prodávají i s interpretačními programy. Tato metoda může sloužit pro nízké i vysoké rozlišení HLA. Má snadné využití i pro typizaci SNP v jiných genech a byla použita i v rámci praktické části této bakalářské práce.

3.3.2 SSOP

SSOP metoda je založena na hybridizaci specifické oligonukleotidové sondy se sekvencí nesoucí polymorfismus ve formě SNP namnoženou pomocí PCR. Sonda nese specifickou část uvnitř své sekvence, aby se vážala pouze na místo s polymorfismem. Na sondě je navázána částice, která dává specifický signál pro zviditelnění vazby sondy. Může jí být biotin, na který se váže avidin nebo streptavidin s navázaným enzymem (alkalická fosfatáza, křenuvová peroxidáza) a po přidání substrátu lze detekovat barevný produkt, nebo na sondě může být vázána molekula, která je při ozáření excitována a emituje záření specifické vlnové délky.

3.3.3 Microarray

Microarray technika spočívá v elektrostatické adsorpci krátkých jednovláknových oligonukleotidových sond na kladně nabitý, většinou skleněný, podklad. Po přidání značeného amplifikovaného zkoumaného úseku DNA dojde k vysoce specifickému navázání této DNA na sondy za definovaných podmínek. Poté je měřen fluorescenční signál z navázaných testovaných DNA. V současné době existují microarray techniky i v řadě jiných modifikací.

3.3.4 Sekvencování

Klasické Sangerovo sekvencování využívá směsi deoxynukleotidů a fluorescenčně značených dideoxynukleotidů, které při zařazení do sekvence zastavují polymeraci DNA. Takto amplifikovaná DNA je pak rozdělena v polyakrylamidovém gelu pomocí elektroforézy. Při horizontální elektroforéze se produkty od různých dideoxynukleotidů rozdělují zvlášť do jamek a porovnávají se jejich vzdálenosti, při kapilární elektroforéze běží všechny vzorky v jedné kapiláře a jsou detekovány laserem.

Tzv. „next-generation“ sekvencování je založeno na klonální amplifikaci krátkých úseku genomické DNA, která je imobilizována na pevném podkladu (na částici, sklíčku), a následném sekvencování pomocí detekce fluorescenčního nebo chemiluminescenčního signálu. Nejpoužívanější jsou systémy Illumina (HiSeq), Life Technologies (SOLiD, Ion Torrent) a Roche/454 GS FLX.

4. Materiál a metodika

4.1 Materiál

Výchozím biologickým materiálem byla periferní žilní krev odebraná venepunkcí pacientům indikovaným k transplantaci krvetvorných kmenových buněk a jejich příslušným dárčům. Krev byla odebrána do zkumavek s K₃EDTA. Vzorky krve byly získány od pacientů z Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze (ÚHK), z Fakultní nemocnice v Praze-Motole a z Fakultní nemocnice Brno. Všichni pacienti byli na základě svého informovaného souhlasu zahrnuti do grantového projektu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví (IGA MZ ČR), id. č. NT/12454 – 5.

Pro statistickou analýzu byla použita data z genotypizace genu *ITGA4* a klinické údaje od 58 pacientů po HSCT a jejich dárců ze Slovinska z transplantačního centra v Lublani. Klinické údaje k souboru českých pacientů nebyly v době ukončení bakalářské práce k dispozici, proto nebyli zařazeni do statistické analýzy. Pacienti ze Slovinska poskytli informovaný souhlas s výzkumným využitím jejich vzorků.

4.2 Metody

4.2.1 Izolace DNA a měření koncentrace

DNA jsem izolovala dvěma způsoby – 1) poloautomatickou extrakcí pomocí přístroje Arrow (NorDiag, Norsko) s využitím izolační soupravy pro 500 µl krve (Arrow Blood DNA 500, nebo 2) manuálně s použitím sady na izolaci DNA pomocí kolonky QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Německo). Poté jsem měřila koncentraci vyizolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

4.2.1.1 Izolace pomocí přístroje Arrow (NorDiag, Norsko) a soupravy Arrow Blood DNA 500

Přístroj provádí izolaci DNA v několika krocích – nejdříve se lyzují buňky, poté je DNA v lyzátu navázána na magnetické částice, DNA na částicích je několikrát promyta a separována mezi každým promytím pomocí magnetického pole. Komplex částic s DNA je

poté resuspendován v elučním pufru při vyšší teplotě a purifikovaná DNA bez magnetických částic je separována do eluční mikrozkušavky.

Součástí sady Arrow Blood DNA 500 jsou jednorázové pumpičky s pipetovacími špičkami a kazety („cartridges“) s reagensiemi, do přístroje se navíc vkládají 1,5 ml mikrozkušavky se vzorkem krve a prázdné eluční 1,5ml mikrozkušavky pro zachycení DNA. Používala jsem protokol pro izolaci DNA z 500 μ l krve s cílovým elučním objemem 300 μ l pufru pro rozpuštění získané DNA a tento objem jsem po dokončení protokolu přepipetovala do 1,5ml šroubovací mikrozkušavky s víčkem s těsněním označené zkratkou transplantačního centra, identifikačním číslem transplantačního páru a zkratkou P (u pacientů) nebo D (u dárců).

4.2.1.2 Mikroizolace pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit

Přístroje (výrobce, země původu):

- tepelný blok Grant QBT1, Grant Instruments, Velká Británie
- vortex 2x³, VELP Scientifica, Itálie
- centrifuga Hettich Universal 16R, Hettich, Německo
- příruční minicentrifuga, LabNet, Korea
- Flow Box Telstar Bio II A, Life Science Solutions, Španělsko

Chemikálie:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Německo
- ethanol absolutní

Postup (s použitím originálního firemního označení reagensů):

Do 1,5ml mikrozkušavky jsem pipetovala 20 μ l „QIAGEN“ proteázy (součást soupravy) a k tomu jsem pipetovala 200 μ l krevního vzorku pacienta nebo dárce a 200 μ l „AL“ pufru. Směs jsem okamžitě protřepala 15 vteřin na vortexu a poté 10 minut inkubovala v termobloku při 56°C. Mikrozkušavku jsem krátce centrifugovala, k obsahu přidala 200 μ l 96% ethanolu a míchala 15 vteřin na vortexu. Výslednou směs jsem přelila do filtrační kolonky vložené ve 2ml mikrozkušavce a dala centrifugovat při 8000 ot./1 min/20°C. Filtrační kolonku jsem poté přemístila do nové 2ml mikrozkušavky a starou zkušavku i s filtrem vyhodila. Do kolonky jsem přidala 500 μ l promývacího roztoku „AW1“ a centrifugovala ji při 8000 ot. /1 min/20°C. Filtrační kolonku jsem opět přemístila

do nové 2ml mikrozkušavky a starou s filtrátem vyhodila a do kolonky jsem přidala 500 μ l AW2 roztoku. Poté jsem mikrozkušavku s filtrační kolonkou centrifugovala při 14000 ot./3 min/20°C. Filtrační kolonku jsem poté vložila do 1,5ml mikrozkušavky s ustříženým vrškem a původní 2ml mikrozkušavku s filtrátem opět vyhodila. Do filtrační kolonky jsem přidala 210 μ l elučního „AE“ roztoku a nechala ji inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě (rozpuštění DNA). Filtrační kolonku umístěnou v 1,5ml mikrozkušavce jsem centrifugovala při 8000 ot. /1 min/20°C a poté kolonku vyhodila a nechala si 1,5ml mikrozkušavku s filtrátem obsahujícím DNA, který jsem přepipetovala do 1,5ml šroubovací mikrozkušavky s víčkem s těsněním. Zkušavku s DNA jsem označila zkratkou označení transplantačního centra, identifikačním číslem transplantačního páru a zkratkou P (u pacientů) nebo D (u dárců).

Vyizolovanou DNA jsem uskladnila do dalšího zpracování do ledničky a zbytek krevního vzorku jsem opět uschovala do mrazicího boxu.

4.2.1.3 Měření koncentrace DNA

Přístroje:

- NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA

Chemikálie:

- eluční „AE“ pufr, QIAGEN, Hilden, Německo
- deionizovaná voda

Postup:

Měření koncentrace DNA jsem prováděla pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 a příslušného ovládacího a databázového programu ND-1000 V3.5.2. Pro inicializaci jsem použila 2 μ l deionizované vody a jako „blank“ roztok 2 μ l „AE“ pufru. Poté jsem proměřovala 2 μ l jednotlivých vzorků DNA a v programu je označovala příslušným identifikačním kódem.

4.2.2 Amplifikace sekvence DNA pomocí PCR-SSP

Chemikálie:

- Specifické a kontrolní primery, Generi Biotech, Hradec Králové

- Sekvence specifických primerů:
 - 1169 Reverzní *ATXN2L* rs 8049439 varianta A: 5'cca tgg gtc agt ttc aag aaa a 3'
 - 1170 Reverzní *ATXN2L* rs 8049439 varianta G: 5'cca tgg gtc agt ttc aag aaa g 3'
 - 1187 Přímý konstantní *ATXN2L* rs8049439 5'tct gta ggc ctg tgc tga at 3'
- Sekvence kontrolních primerů:
 - 33 DRB ex3 519 5' tgc caa gtg gag caccca a 3'
 - 34 DRB ex4 579 5' gca tct tgc tct gtg cag at 3'
- Taq polymeráza, Top-Bio, Praha
- Reakční pufr pro PCR, Top-Bio, Praha
- Deoxynukleotidtrifosfáty (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), Promega, USA
- deionizovaná voda

Přístroje:

- Termocyklér DNA Engine TETRAD 2, MJ Research, USA
- Flow Box Telstar Bio II A, Life Science Solutions, Španělsko
- příruční minicentrifuga, LabNet, Korea

Postup:

Připravila jsem dva primerové mixy pro amplifikaci genu *ATXN2L*. Pro variantu C jsem použila 85,8 μ l Tris pufru, 5 μ l primerového roztoku P1169, 5 μ l primerového roztoku 1187, 2,1 μ l primerového roztoku P33 a 2,1 μ l primerového roztoku P34. Pro variantu T jsem použila 88,8 μ l Tris pufru, 2 μ l primerového roztoku P1170, 5 μ l primerového roztoku 1187, 2,1 μ l primerového roztoku P33 a 2,1 μ l primerového roztoku P34. Poté jsem připravila reakční směs pro PCR; na 1 reakci vycházelo 1,3 μ l 10x PCR pufru, 0,1 μ l směsi $25 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ dNTPs, 0,08 μ l Taq polymerázy a 6,52 μ l deionizované vody. Do připravených mikrozkušavek pro PCR jsem pak napipetovala příslušné primerové mixy po 5 μ l, k tomu jsem přidávala 0,3 μ l příslušné DNA a 8 μ l reakční směsi pro PCR. Mikrozkušavky s připravenou PCR směsí jsem vložila do termocykléru a nastavila protokol IL10 s následujícím časovým a teplotním profilem:

Začátek:

- 96 °C po dobu 60s

Cyklické střídání teplot:

- 5 cyklů střídání 96 °C po dobu 20s a 72 °C po dobu 65s

- 21 cyklů střídání 96 °C po dobu 25s, 67 °C po dobu 50s a 72 °C po dobu 30s
- 4 cykly střídání 96 °C po dobu 30s, 57 °C po dobu 60s a 72 °C po dobu 90s
- Do ukončení je pak teplota udržována na 4 °C

Po ukončení PCR reakce jsem mikroskopu s produktem vyjmula a přemístila je k elektroforetické komůrce k dalšímu zpracování.

4.2.3 Příprava 2% agarózového gelu a elektroforéza PCR směsí, focení gelu

Přístroje:

- Zdroj napětí MP-500P, Major Science, Taiwan
- UV transiluminátor EB 20, Ultra-Lum
- fotoaparát Polaroid DS34, Polaroid, USA
- software Gel Logic 112 system, Kodac

Chemikálie:

- agaróza, Serva, Heidelberg, Německo
- ethidium bromid, vodný roztok 10mg/ml, Top-Bio, Praha
- 0,5x TBE pufr, získaný ředěním 5x TBE pufru, který je složený z 0,5 mol \times l⁻¹ TrisCl, 0,66 mol \times l⁻¹ H₃BO₃ a 5 mmol \times l⁻¹ EDTA

Postup:

Do Erlenmayerovy baňky jsem navázila 2g agarózy a k ní přilila 100 μ l 0,5x TBE pufru. Gel jsem povařila v mikrovlnné troubě a v momentě, kdy byla agaróza dokonale rozpuštěná a homogenizovaná, jsem baňku přemístila do vodní lázně, kde jsem ho nechala chladnout. Při dosažení teploty 70 °C jsem do roztoku přidala 4 μ l roztoku ethidium bromidu a obsah baňky jsem opatrně promíchala. Roztok jsem poté nalila na připravenou misku na gel, ohraničenou lepicí páskou a s hřebínky v drážkách. Gel jsem nechala tuhnout cca 30 minut do mléčného zakalení. Po vyjmutí hřebínků jsem gel přenesla do horizontální elektroforetické komůrky s elektroforetickým pufrům (0,5x TBE pufr).

Do jednotlivých PCR produktů jsem přidávala 5 μ l nanášejícího pufru a do jamek gelu jsem pipetovala 10 μ l výsledné směsi pomocí vícekanálové pipety. Mezi každým nanesením jsem pipetu promývala v elektroforetickém pufru. Po nanesení všech vzorků

jsem elektroforetickou komůrku uzavřela a zapnula zdroj napětí, na kterém jsem nastavila 130 V a čas 20 minut. Po uplynutí této doby jsem gel přemístila z komůrky na UV-transluminátor a zkontrolovala výsledky elektroforézy. Pokud byly viditelné výsledky v pořádku, přešla jsem k focení gelu, a to buď pomocí fotoaparátu polaroid DS34 přímo na UV-transiluminátoru, nebo v transiluminační komoře pomocí systému Gel Logic 112 napojeného na počítač se stejnojmenným softwarem. Výsledné fotky jsem zakládala k vytištěným protokolům nebo ukládala do databáze v počítači.

4.2.4 Statistická analýza souboru pacientů genotypizovaných pro polymorfismus v genu *ITGA4*

Statistickou analýzu jsem provedla na souboru 58 pacientů po transplantaci krvetvorných kmenových buněk a jejich dárců. Rozdělila jsem soubor pacientů podle několika základních charakteristik, jako je věk, původ krvetvorných buněk, typ dárce, a vypočítala genotypové a alelové četnosti pacientů i dárců. Z těchto genotypových a alelových četností jsem poté vypočítala jednotlivé genotypové a alelové frekvence. Dále jsem testovala Hardy-Weinbergovu rovnováhu genotypů s použitím aplikace v programu MS Excel pro výpočet χ -kvadrátového testu s jedním stupněm volnosti, kdy pro platnost musí být hodnota $p > 0,05$. U souboru pacientů a dárců a pro sledování signifikantních rozdílů v podskupinách pacientů (přítomnost či absence akutní GVHD, přítomnost či absence chronické GVHD, vážná či nevýznamná akutní GVHD) jsem použila volně dostupný statistický program na internetové stránce <http://www.quantitativeskills.com/sisa> pod odkazem „Two by Two Table“, který pomocí χ -kvadrátového testu s jedním stupněm volnosti počítá hodnotu p pro testované podskupiny. Za signifikantní považujeme rozdíl, který odpovídá hodnotě $p < 0,05$ pro uvedený statistický test.

5. Výsledky

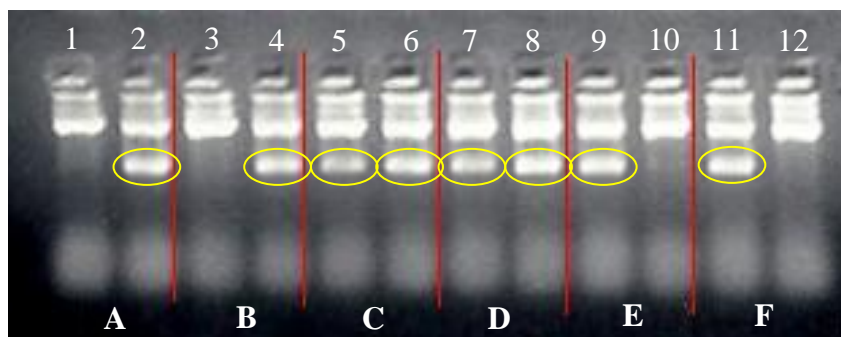
Izolace DNA

Z 215 vzorků krve pacientů a dárců z českých transplantačních center jsem vyizolovala DNA. Průměrná koncentrace získané DNA se pohybovala kolem $40 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$, naprostá většina se nacházela v rozmezí od 20 do $100 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$. Poměr absorbancí A260/A280 byl při zprůměrování vzorků přibližně 1,8, u naprosté většiny jsem naměřila rozmezí mezi 1,6 a 2,0. Všechny vzorky, které jsem izolovala, budou dále využity pro sledování série minimálně 20 SNP a několika CNV (z angl. copy number variation) genových variant ve vztahu k úspěšnosti alogenní HSCT v rámci řešení projektu Interní grantové agentury MZ ČR „Vybrané imunologické a imunogenetické parametry v predikci nemoci štěpu proti hostiteli a úspěšnosti alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk“.

Návrh, zavedení a optimalizace genotypizačního protokolu pro polymorfismus *ATXN2L* rs8049439

Pro genotypizaci kandidátního polymorfismu *ATXN2L* rs8049439 jsem navrhla a optimalizovala PCR reakci, kdy jsem upravovala její teplotní profil a vstupní objem DNA a primerů. Na základě prvních experimentů bylo třeba zvýšit teplotu připojování primerů (annealing) pro specifitější hybridizaci primeru s příslušnou alelickou sekvencí. Výsledný protokol i s objemy reagentů je uveden v kapitole Materiál a metodika, reprezentativním výstupem této genotypizace je fotografie gelu s popisky na obrázku č. 3. Mnou zavedený protokol byl následně využit pro ověření správnosti genotypizace polymorfismu *ATXN2L* rs8049439 vysokokapacitní technikou MassArray Sequenom na souboru 187 kontrolních jedinců (paralelně typizovaných) jako součást diplomové práce (Štaffová K., Diplomová práce, Olomouc 2013).

Obrázek č. 3: Fotografie výsledků elektroforézy amplifikovaných fragmentů DNA v agarózovém gelu pro vyšetření polymorfismu *ATXN2L* rs8049439 metodou PCR-SSP a úseku DNA pro vnitřní kontrolu reakce.



Na obrázku č. 3 jsou velkými písmeny označeny vzorky DNA od jednotlivých pacientů, čísla odpovídají číslování jamek. Ve všech jamkách je v horní řadě patrný produkt, který slouží pro kontrolu proběhnutí reakce. Do lichých jamek byla vložena reakční směs se specifickým primerem pro alelu T, do sudých jamek pro alelu C. Výsledné specifické amplikony jsou na obrázku zakroužkovány žlutě. Z obrázku lze snadno určit, že pacienti A a B jsou homozygoti pro alelu C, pacienti E a F jsou homozygoti pro alelu T a pacienti C a D jsou heterozygoti.

Statistická analýza souboru pacientů a dárců genotypizovaných pro polymorfismus rs4667319 v genu *ITGA4*

Hlavním cílem experimentální části této bakalářské práce je sledování případného vlivu genu *ITGA4* na výsledek transplantace krvetvorných kmenových buněk, a to formou hledání souvislosti mezi jednotlivými alelami SNP *ITGA4* rs4667319 a výskytem, formou a závažností GVHD. V tabulce č. 1 jsem shrnula hlavní charakteristiky testovaného souboru 58 pacientů po HSCT, ze kterých je patrné, že dárci krvetvorných kmenových buněk pro tyto pacienty byli převážně nalézáni v okruhu rodiny a čísla týkající se zdroje krvetvorných buněk dokumentují preferování odběru krvetvorných buněk z periferní krve před kostní dřeně. Průměrný věk pacientů byl 39 let, nejmladšímu bylo v době transplantace 22 let a nejstaršímu 64 let. Akutní GVHD se po transplantaci objevila u 47 % pacientů (27 z 58) a chronická GVHD se vyvinula u 33% (19 z 58). Poté jsem na základě dostupných dat z genotypizace SNP *ITGA4* rs4667319 metodou PCR-SSP vytvořila

tabulku č. 2, která poskytuje údaje o rozložení absolutních počtů genotypů pacientů po HSCT a jejich dárců v podskupinách charakterizovaných absencí nebo vývojem akutní a chronické GVHD a podle závažnosti akutní GVHD (stupeň 0-I proti stupňům II-IV). Z těchto dat jsem vypočetla hodnoty pro tabulku č. 3 s rozložením alelových a genotypových četností ve stejných podskupinách. Alela G se vyskytuje ve výrazně menším počtu než alela A a u největšího počtu testovaných osob, tzn. u 31 pacientů z 58 (51 %) a 29 dárců z 58 (50 %), se genotyp nacházel v homozygotním AA stavu. Distribuce genotypů testovaného polymorfismu byla v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou jak v souboru pacientů ($P = 0,090$), tak v souboru dárců ($P = 0,885$). Porovnávání počtů nosičů alel a frekvence vzácnější alely probíhalo u jednotlivých podskupin pacientů a dárců; první srovnání bylo provedeno mezi pacienty s akutní GVHD a bez této nemoci, stejným způsobem jsem srovnávala i jejich dárcy. Druhé srovnání jsem provedla mezi podskupinami pacientů s klinicky významnou formou akutní GVHD (stupeň II-IV) a žádnou až lehkou formou (stupeň 0-I) a jejich dárci. Na závěr jsem srovnala podskupiny pacientů s výskytem chronické GVHD a bez této choroby, stejně jsem porovnávala i jejich dárcy. Výsledky porovnávání jsou uvedeny v tabulce č. 4. Ukázalo se, že ani v jednom z uvedených srovnání mezi podskupinami nebyly signifikantní rozdíly v zastoupení alel testovaného polymorfismu a nelze tak žádné z těchto alel připisovat významnější vliv na výskyt, druh a stupeň GVHD.

Tabulka č. 1: Charakteristika souboru pacientů po HSCT a jejich dárců

Počet pacientů	58	Zdroj krvetvorných buněk	
Pohlaví		Kostní dřeň	16
Muži	34	Periferní krev	41
Ženy	25	Chybějící data	1
Typ dárce		Příprava na transplantaci	
Příbuzný - jiný	2	Myeloablativní	50
Příbuzný - sourozenec	38	Nemyeloablativní	7
Nepříbuzný	18	Chybějící data	1
Diagnóza pacienta		Akutní GVHD	
AML	26	Bez výskytu	31
ALL	15	Stupeň I	7
CML	8	Stupeň II	12
CLL	1	Stupeň III	5
MM	5	Stupeň IV	3
AA	1	Chronická GVHD	
MDS	1	Bez výskytu	39
CGD	1	extenzivní	9
Shoda v HLA znacích		limitovaná	10
Úplná	53	Relaps (návrat nemoci)	
Neshoda (9/10, 8/10)	5	Bez výskytu	39
Věk při transplantaci		S výskytem	15
průměr	39 <22;64>	Chybějící data	1

Tabulka č. 2: Absolutní počty genotypů testovaného polymorfismu genu *ITGA4* u pacientů a jejich dárců v podskupinách podle výskytu akutní a chronické GVHD.

Výskyt a druh GVHD	Genotypy pacientů			Genotypy dárců		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
aGVHD-	14	13	4	13	13	4
aGVHD+	17	6	4	16	10	1
aGVHD stupeň 0-I	18	14	6	18	15	4
aGVHD stupeň II-IV	13	5	2	11	8	1
cGVHD-	22	13	4	22	12	4
cGVHD+	9	6	4	7	11	1

aGVHD+/aGVHD-; cGVHD+/cGVHD-: Podskupiny pacientů a dárců po HSCT s akutní/chronickou GVHD a bez těchto komplikací

aGVHD II-IV: Pacienti s klinicky významnou aGVHD; aGVHD 0-I: Pacienti bez akutní GVHD nebo s mírnou formou

Tabulka č. 3: Výsledné relativní genotypové a alelické frekvence testovaného polymorfismu genu *ITGA4* u pacientů a jejich dárců v podskupinách podle výskytu akutní a chronické GVHD.

Výskyt a druh GVHD	Genotypové frekvence pacientů			Alelické frekvence pacientů		Genotypové frekvence dárců			Alelické frekvence dárců	
	AA	AG	GG	A	G	AA	AG	GG	A	G
aGVHD-	0.452	0.419	0.129	0.661	0.339	0.433	0.433	0.133	0.650	0.350
aGVHD+	0.630	0.222	0.148	0.741	0.259	0.593	0.370	0.037	0.778	0.222
aGVHD 0-I	0.474	0.368	0.158	0.658	0.342	0.486	0.405	0.108	0.689	0.311
aGVHD II-IV	0.650	0.250	0.100	0.775	0.225	0.550	0.400	0.050	0.750	0.250

Výskyt a druh GVHD	Genotypové frekvence pacientů			Alelické frekvence pacientů		Genotypové frekvence dárců			Alelické frekvence dárců	
	AA	AG	GG	A	G	AA	AG	GG	A	G
cGVHD-	0.564	0.333	0.103	0.731	0.269	0.579	0.316	0.105	0.737	0.263
cGVHD+	0.474	0.316	0.211	0.632	0.368	0.368	0.579	0.053	0.658	0.342

aGVHD+/aGVHD-; cGVHD+/cGVHD-: Podskupiny pacientů a dárců po HSCT s akutní/chronickou GVHD a bez těchto komplikací

aGVHD II-IV: Pacienti s klinicky významnou aGVHD; aGVHD 0-I: Pacienti bez akutní GVHD nebo s mírnou formou

Tabulka č. 4: Hodnoty p (χ -kvadrátový test) pro porovnání nosičství a alelické frekvence polymorfismu genu *ITGA4* pacientů a dárců podle výskytu akutní GVHD, klinicky významné akutní GVHD a chronické GVHD.

Podskupiny pacientů a dárců		Nosičství alely A (hodnota p)	Nosičství alely G (hodnota p)	Frekvence alely G (hodnota p)
aGVHD +/-	Pacienti	0,833	0,175	0,352
	Dárci	0,199	0,230	0,133
aGVHD 0-I/II-IV	Pacienti	0,543	0,201	0,192
	Dárci	0,459	0,647	0,494
cGVHD +/-	Pacienti	0,263	0,517	0,275
	Dárci	0,508	0,733	0,381

6. Diskuze

Metoda PCR-SSP, kterou jsem se v experimentální části své bakalářské práce zabývala, patří mezi dlouho používané konvenční techniky genotypizace polymorfismů především typu SNP. I když je PCR-SSP postupně ve výzkumných aplikacích nahrazována vysokokapacitními metodami jako jsou MassArray (hmotnostní spektrometrie), microarray nebo „next-generation“ sekvencování, stále se využívá např. v rutinních genotypizacích HLA znaků pro účely testování histokompatibility u transplantací. K optimalizaci protokolu pro genotypizaci polymorfismu genu *ATXN2L*, který je kandidátní variantou s možným vlivem na výsledek transplantace vzhledem ke svému spojení se zánětlivým onemocněním střev, jsem použila DNA zdravých kontrolních jedinců i pacientů po transplantaci z českých transplantčních středisek. Podle předpokladů vyžadoval protokol pro PCR-SSP genotypizaci uvedeného polymorfismu několik optimalizačních zásahů (změny teplot anealingu, korekce koncentrací specifických primerů). Při zavádění techniky jsme pozorovali zřetelnou závislost kvality výsledků genotypizace na metodě izolace DNA. Je tedy třeba vždy protokol přizpůsobit charakteru a kvalitě vstupního templátu. Kromě této nevýhody (novější techniky bývají obecně méně citlivé na původ a kvalitu vstupní DNA), patří mezi další nevýhody PCR-SSP její pracnost a omezená kapacita. Nespornou výhodou PCR-SSP je naopak její nenáročnost na přístrojové vybavení. Rozsáhlý soubor vzorků DNA pacientů po transplantaci a jejich dárců, které jsem v praktické části bakalářské práce získala, bude využit pro typizaci sady dalších kandidátních polymorfismů s potenciálem nalezení nebo potvrzení jejich efektu na výsledky transplantací.

Gen *ITGA4*, kterým jsem se v této práci dále zabývala, kóduje α_4 podjednotku některých integrinů. Integrin $\alpha_4\beta_7$ nacházející se na povrchu lymfocytů se specificky váže na slizniční adresin MAdCAM-1 a umožňuje T-lymfocytům dárce vstoupit do střevní tkáně, což je jeden z cílových orgánů pro GVHD. Vyřazení uvedeného signálního mechanismu prokazatelně snižuje závažnost GVHD na zvířecích modelech. Na pracovišti, kde vznikla má bakalářská práce, byly publikovány výsledky týkající se asociace polymorfismu genu pro IL-6 a akutní GVHD (Ambruzova a kol., 2008) a také výsledky poukazující na asociaci variant genu pro MAdCAM-1 s akutní GVHD (Ambruzova a kol., 2009). Právě díky důkazu o funkci MAdCAM-1 v potransplantačních komplikacích a studii, která dokázala spojitost absence β_7 podjednotky integrinu s menším výskytem

GVHD (Waldman a kol., 2006), jsem se v této bakalářské práci zaměřila na *ITGA4* gen jako další možný faktor ovlivňující výsledek transplantace. V rámci statistické analýzy souboru pacientů typizovaných pro SNP rs4667319 v genu *ITGA4* jsem však nenalezla signifikantní rozdíly v genotypch a alelových četnostech mezi pacienty postiženými akutní nebo chronickou GVHD a pacienty bez těchto komplikací. Tyto výsledky by mohly být interpretovány tak, že testovaná varianta genu pro *ITGA4* nemá zásadní vliv na výskyt GVHD po transplantaci. Vzhledem k tomu, že byl analyzován poměrně malý soubor pacientů, bude pro definitivní závěr o uplatnění genové variability genu *ITGA4* u transplantace krvetvorných kmenových buněk třeba nezávislé potvrzení na rozsáhlejším prospektivním souboru, které je plánováno.

7. Závěr

Transplantace krvetvorných kmenových buněk je zásadní metoda pro léčbu maligních onemocnění krvetvorby i pro řadu nemaligních onemocnění. Jako zdroj krvetvorných buněk se dnes používá nejčastěji periferní krev od co nejvíce geneticky shodného dárce. Klíčovou roli zde hrají geny MHC komplexu, u člověka nazývané HLA, které produkují hlavní proteiny tkáňové slučitelnosti, které mohou být rozpoznávány dárcovými T lymfocyty. Výsledek transplantace je ovšem ovlivněn i jinými polymorfismy, a to zejména v genech spojených s imunitní odpovědí organismu.

V této bakalářské práci jsem se zabývala jednonukleotidovými polymorfismy ve dvou genech – v genu *ATXN2L* a *ITGA4*. Pro gen *ATXN2L* jsem úspěšně zavedla protokol pro jeho genotypizaci a provedla jsem statistickou analýzu na souboru pacientů a jejich dárců typizovaných pro jednonukleotidový polymorfismus rs4667319 v genu *ITGA4*. Porovnávala jsem nosičství alel a četnost alely rs4667319 G ve třech subanalýzách; v první jsem porovnávala pacienty podle výskytu akutní GVHD, v druhé stupeň 0-I akutní GVHD s pacienty s klinicky významnou akutní GVHD stupně II-IV. Třetí subanalýza srovnávala výskyt a absenci chronické GVHD. Tyto analýzy ukázaly, že v daném souboru nabyly zjištěny signifikantní výsledky podporující spojení testovaného polymorfismu *ITGA4* genu s některou z forem nemoci štěpu proti hostiteli.

Pro definitivní ověření závislosti testovaného polymorfismu i dalších variant s výsledky HSCT je do budoucna žádoucí pracovat s většími soubory pacientů a příslušných dárců – k přípravě takové studie přispěla mj. zpracováním biologického materiálu i tato bakalářská práce.

8. Seznam použitých zkratk

AA	aplastická anémie
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
CGD	chronická granulomatózní choroba
CLL	chronická lymfoblastická leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
CMV	cytomegalovirus
GVHD	graft-versus-host disease – nemoc štěpu proti hostiteli
GVL	graft-versus-leukemia – efekt štěpu proti leukémii
GVT	graft-versus-tumor – efekt štěpu proti tumoru
HLA	human leukocyte antigens – lidské leukocytární antigeny
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation – transplantace krvetvorných kmenových buněk
IL	interleukin
INF	interferon
MDS	myelodysplastický syndrom
MHC	major histocompatibility complex – hlavní histokompatibilní komplex
MM	mnohočetný myelom
NOD2	nucleotide-binding oligomerisation domain containing 2
PCR	polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
Ph1	Philadelphia chromosome – filadelfský chromozóm
SNP	single nucleotide polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus
SSOP	sequence-specific oligonucleotide probe – sekvenčně specifická oligonukleotidová sonda
SSP	sequence-specific primer – sekvenčně specifický primer
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRM	treatment related mortality – úmrtí spojené s léčbou

9. Literatura

AMBRUZOVA, Z., MRAZEK, F., RAIDA, L., FABER, E., ONDERKOVA, J., KRIEGOVA, E., INDRAK, K., PETREK, M. (2008): Association of IL-6 gene polymorphism with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Czech patients. *International Journal of Immunogenetics* 35: 401 – 403

AMBRUZOVA, Z., MRAZEK, F., RAIDA, L., STAHELOVA, A., FABER, E., INDRAK, K. (2009): Possible impact of MADCAM1 gene single nucleotide polymorphisms to the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Human Immunology* 70: 457 – 460

BISHOP, M. R., ALYEA 3RD, E. P., CAIRO, FALKENBURG, J. H. F., JUNE, C. J., KRÖGER, N., LITTLE, R. F., MILLER, J. S., PAVLETIC, S. Z., PORTER, D., RIDDERLL, S. R., VAN BESIEEN, K., WAYNE, A. S., WEISDORF, D. J., WU, R. S., GIRALT, S. (2011): NCI 1st international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: summary and recommendations from the organizing committee. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17 (4): 443 – 454

BRODSKY, R. A., JONES, R. J. (2005): Aplastic anaemia. *Lancet* 365: 1647 – 1656

DICKINSON, A. M. (2008): Non-HLA genetics and predicting outcome in HSCT. *International Journal of Immunogenetics* 35: 375 – 380

DOBROVIC, A., TRAINOR, K. J., MORLEY, A. A. (1988): Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction. *Blood* 72 (6): 2063 – 2065

DUNN, P. P. J. (2011): Human leukocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. *International Journal of Immunogenetics* 38: 463 – 473

FERRARA, J. M. L. (1993): Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Current Opinion in Immunology* 5: 794 – 799

FIGUEROA, K. P., PULST, S. M. (2003): Identification and expression of the gene for human ataxin-2-related protein on chromosome 16. *Experimental Neurology* 184: 669 – 678

GRATWOHL, A., BALDOMERO, H., FRAUENDORFER, K., URBANO-ISPIZUA, A., NIEDERWIESER, D. (2007): Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplantation* 39: 71 – 87

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. *Cancer* 115 (20): 4715 - 4726

HANSEN, J. A., PETERSDORF, E. W., LIN, M. T., WANG, S., CHIEN, J. W., STORER, B., MARTIN, P. J. (2008): Genetics of allogeneic hematopoietic cell transplantation. Role of HLA matching, functional variation in immune response genes. *Immunologic Research* 41: 56 – 78

CHAMPLIN, R. E., SCHMITZ, N., HOROWITZ, M. M., CHAPUIS, B., CHOPRA, R., CORNELISSEN, J. J., GALE, R. P., GOLDMAN, J. M., LOBERIZA JR, F. R., HERTENSTEIN, B., KLEIN, J. P., MONTSERRAT, E., ZHANG, M. J., RINGDÉN, O., TOMANY, S. C., ROWLINGS, P. A., VAN HOEF, M. E. H. M., GRATWOHL, A. (2000): Blood stem cell compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* 95 (12): 3702 – 3709

IMIELINSKI, M., BALDASSANO, R. N., GRIFFITHS, A., RUSSELL, R. K., ANNESE, V., DUBINSKY, M., KUGATHASAN, S., BRADFIELD, J. P., WALTERS, T. D., SLEIMAN, P., KIM, C. E., MUISE, A., WANG, K., GLESSNER, J. T., SAEED, S., ZHANG, H., FRACKELTON, E. C., HOU, C., FLORY, J. H., OTIENO, G., CHIAVACCI, R. M., GRUNDMEIER, R., CASTRO, M., LATIANO, A., DALLAPICCOLA, B., STEMPAK, J., ABRAMS, D. J., TAYLOR, K., MCGOVERN, D., HEYMAN, M. B., FERRY, G. D., KIRSCHNER, B., LEE, J., ESSERS, J., GRAND, R., STEPHENS, M., LEVINE, A., PICCOLI, D., LIMBERGEN, J. V., CUCCHIARA, S., MONOS, D. S., GUTHERY, S. L., DENSON, L., WILSON, D. C., GRANT, S. F. A., DALY, M., SILVERBERG, M. S., SATSANGI, J., HAKONARSON, H. (2009): Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nature Genetics* 41 (12): 1335 – 1340

JASKULA, E., BOCHENSKA, J., KOCWIN, E., TARNOWSKA, A., LANGE, A. (2012): CMV serostatus of donor-recipient pairs influences the risk of CMV infection/reactivation in HSCT patients. *Bone Marrow Research*, article ID 375075, 8 stran, doi: 10.1155/2012/375075

KASSNER, P. D., ALON, R., SPRINGER, T. A., HEMLEER, M. E. (1995): Specialized functional properties of the integrin $\alpha 4$ cytoplasmic domain. *Molecular Biology of the Cell* 6: 661 – 674

KEKIK, C., BESISIK, S. K., SEYHUN, Y., OGUZ, F. S., SARGIN, D., CARIN, M. N. (2009): Relationship between HLA tissue type, CMV infection, and acute graft-vs-host disease

after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: single-center experience. *Transplantation proceedings* 41: 3859 – 3862

KIOSSOGLOU, K. A., MITUS, W. J., DAMESHEK, W. (1965): Chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 26 (5): 610 - 641

KÖGLER, G., ENCZMANN, J., ROCHA, V., GLUCKMAN, E., WERNET, P. (2005): High-resolution HLA typing by sequencing for HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ in 122 unrelated cord blood/patient pair transplants hardly improves long-term clinical outcome. *Bone Marrow Transplantation* 36: 1033 – 1041

KOLB, H. J., SCHATTENBERG, A., GOLDMAN, J. M., HERTENSTEIN, B., JACOBSEN, N., ARCESE, W., LJUNGMAN, P., FERRANT, A., VERDONCK, L., NIEDERWIESER, D., VAN RHEE, F., MITTERMUELLER, J., DE WITTE, T., HOLLER, E., ANSARI, H. (1995): Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86 (5): 2041 – 2050

KURTZBERG, J., LAUGHLIN, M., GRAHAM, M. L., SMITH, C., OLSON, J. F., HALPERIN, E. C., CIOCCI, G., CARRIER, C., STEVENS, C. E., RUBINSTEIN, P. (1996): Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *The New England Journal of Medicine* 335: 157 – 166

LEE, S. J., KLEIN, J., HAAGENSON, M., BAXTER-LOWE, L. A., CONTER, D. L., EAPEN, M., FERNANDEZ-VINA, M., FLOMENBERG, N., HOROWITZ, M., HURLEY, C. K., NOREEN, H., OUDSHOORN, M., PETERSDORF, E., SETTERHOLM, M., SPELLMAN, S., WEISDORF, D., WILLIAMS, T. M., ANASETTI, C. (2007): High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 110: 4576 – 4583

LI, S., KAWATA, H., OTA, M., MORISHIMA, Y., MANO, S., KULSKI, J. K., NARUSE, T., INOKO, H. (2004): Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at fice loci. *Tissue Antigens* 63: 362 – 368

MAYOR, N. P., SHAW, B. E., MADRIGAL, J. A., MARSH, S. G. E. (2012): NOD2 polymorphisms and their impact on haematopoietic stem cell transplant outcome. *Bone Marrow Research*, article ID 180391, 13 stran, doi: 10.1155/2012/180391

- MCSWEENEY, P. A., NIEDERWIESER, D., SHIZURU, J. A., SANDMAIER, M., MOLINA, A. J., MALONEY, D. G., CHAUNCEY, T. R., GOOLEY, T. A., HEGENBART, U., NASH, R. A., RADICH, J., WAGNER, J. L., MINOR, S., APPELBAUM, F. R., BENSINGER, W. I., BRYANT, E., FLOWERS, M. E. D., GEORGES, G. E., GRUMET, F. C., KIEM, H. P., TOROK-STORB, B., YU, C., BLUME, K. G. (2001): Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematological malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 97: 3390 – 3400
- NANNYA, Y., KATAOKA, K., HANGAISHI, A., IMAI, Y., TAKAHASHI, T., KUROKAWA, M. (2011): The negative impact of female donor/male recipient combination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on disease risk. *Transplant international* 24 (5): 469 – 476
- O'DOHERTY, C., FAVOROV, A., HEGGARTY, S., GRAHAM, C., FAVOROVA, O., OCHS, M., HAWKINS, S., HUTCHINSON, M., O'ROURKE, VANDENBROECK, K. (2009): Genetic polymorphisms, their allele combinations and IFN- β treatment response in Irish multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics* 10 (7): 1177 – 1186
- OLSSON, R., REMBERGER, M., SCHAFFER, M., BERGGREN, D. M., SVAHN, B. M., MATTSSON, J., RINGDEN, O. (2013): Graft failure in modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* 48 (4): 537 – 543
- PIDALA, J. (2011): Graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Control* 18 (4): 268 – 276
- REZVANI, A. R., STORB, R. F. (2008): Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of autoimmunity* 30 (3): 172 – 179
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487 – 491
- SANZ, J., SANZ, G. F. (2010): Umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in adult patients with chronic myeloid leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 23: 217 – 222

- SERVAIS, S. BARON, F., BEGUIN, Y. (2011): Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) after reduced intensity conditioning. *Transfusion and Apheresis Science* 44: 205 – 210
- SHIINA, T., TAMIYA, G., OKA, A., TAKISHIMA, N., YAMAGATA, T., KIKKAWA, E., IWATA, K., TOMIZAWA, M., OKUAKI, N., KUWANO, Y., WATANABE, K., FUKUZUMI, Y., ITAKURA, S., SUGAWARA, C., ONO, A., YAMAZAKI, M., TASHIRO, H., ANDO, A., IKEMURA, T., SOEDA, E., KIMURA, M., BAHRAM, S., INOKO, H. (1999): Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1796938 bp HLA class I region. *PNAS* 96: 13282 – 13287
- SOCIÉ, G., BLAZAR, B. R. (2009): Acute graft-versus-host disease: from bench to bedside. *Blood* 114 (20): 4327 – 4336
- STATKUTE, L., VERDA, L., OYAMA, Y., TRAYNOR, A., VILLA, M., SHOOK, T., CLIFTON, R., JOVANOVIĆ, B., SATKUS, J., LOH, Y., QUIGLEY, K., YAUNG, K., GONDA, E., KROSNJAR, N., SPAHOVIĆ, D., BURT, R. K. (2007): Mobilization, harvesting and selection of peripheral blood stem cells in patients with autoimmune diseases undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 39: 317 – 329
- SULLIVAN, K. M., PARKMAN, R., WALTERS, M. C. (2000): Bone marrow transplantation for non-malignant disease. *Hematology* 1: 319 – 338
- VARDIMAN, J. W., THIELE, J., ARBER, D. A., BRUNNING, R. D., BOROWITZ, M. J., PORWIT, A., HARRIS, N. L., LE BEAU, M. M., HELLSTRÖM-LINDBERG, E., TEFFERI, A., BLOOMFIELD, C. D. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114 (5): 937 – 951
- WALDMAN, E., LU, S. X., HUBBARD, V. M., KOCHMAN, A. A., ENG, J. M., TERWEY, T. H., MURIGLAN, S. J., KIM, T. D., HELLER, G., MURPHY, G. F., LIU, C., ALPDOGAN, O., BRINK, M. R. M. (2006): Absence of $\beta 7$ integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood* 107 (4): 1703 – 1711
- WANG, J., ZHAN, P., OUYANG, J., CHEN, B., ZHOU, R., YANG, Y. (2010): Unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients: a meta analysis. *Leukemia Research* 34: 1018 – 1022

WEINBERG, K. I., KAPOOR, N., SHAH, A. J., CROOKS, G. M., KOHN, D. B., PARKMAN, R. (2001): Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immune deficiency. *Current Allergy and Asthma Reports* 1 (5): 416 – 420

WHANG, J., FREI III, E., TJIO, J. H., CARBONE, P. P., BRECHER, G. (1963): The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 22 (6): 664 – 673

YOUNG, B. D. (1988): Molecular analysis of Philadelphia chromosome positive leukaemias. *British Journal of Cancer* 9: 58 – 61

Internetové odkazy:

www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html – statistická data HLA polymorfismů

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs8049439#map – databáze SNP, referenční SNP rs8049439

<http://www.quantitativeskills.com/sisa> - stránka s volně přístupnými statistickými programy