



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Lze u pacientů s AML indikovaných k nepříbuzenské transplantaci provádět v klinické praxi výběr nepříbuzných dárců na základě KIR genotypů?

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Michaela Fryčová

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Jindra, Ph.D.

České Budějovice, 2016

Lze u pacientů s AML indikovaných k nepříbuzenské transplantaci provádět v klinické praxi výběr nepříbuzných dárců na základě KIR genotypů?

Abstrakt

Akutní myeloidní leukémie (AML) je agresivní maligní onemocnění, kdy pro většinu pacientů je jedinou kurativní léčbou alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloTKB). Kromě reakce štetu proti hostiteli je základním limitujícím faktorem úspěšnosti transplantace relaps onemocnění. Podle několika nedávno publikovaných studií mohou být výsledky transplantací u pacientů s AML kromě HLA genů ovlivněny i dalšími, tzv. non-HLA geny. Obzvláště roste počet důkazů vlivu genů KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) dárce na ochranu před relapsem po transplantaci. HLA a KIR geny jsou kódovány na různých chromozomech (HLA-6. chromozom a KIR 19. chromozom), tudíž se segregují nezávisle a HLA shodní dárci s příjemce mají obvykle různé složení KIR genů. Cooley et al. (2010) doložil, že specifické složení motivů centromerních a telomerních B haplotypů KIR genů přispívá k ochraně před relapsem a zvyšuje šanci na úplné vyléčení AML. V případech kdy existuje více HLA shodných nepříbuzných dárců (UD) by pak logicky kompozice KIR genů u jednotlivých dárců mohla být kritériem výběru toho nejvhodnějšího, tedy toho s největším potenciálem protekce před relapsem.

Na základě této studie a dalších dat byla zahájena genetická typizace KIR u potenciálních dárců, pokud bylo možné volit z několika 10/10 nebo 9/10 HLA shodných UD u daného pacienta. Genotypizace byla prováděna metodikou PCR-SSP pomocí komerčně dostupných kitů. Byla provedena genová typizace 160 nejlépe shodných HLA dárců pro 55 vybraných pacientů s AML. Přítomnost KIR haplotypů A a B stejně jako jejich kombinací byla určena z druhu a počtu genů KIR. Všechny genotypy byly zadány do kalkulatoru, který umožňuje zadání až pěti potenciálních dárců a získání jejich přiřazení do jedné z 3 skupin dle obsahu KIR B. Skupiny, „neutrální“, „lepší“, „nejlepší“, odkazují na příslušnou ochranu proti relapsu.

Genová typizace KIR při hledání dárců odhalila 43 dárců s AA haplotypy, 90 dárců s AB haplotypy a 27 dárců s BB haplotypy. Po přiřazení stavů přítomnosti KIR B bylo objeveno 107 „neutrálních“ dárců, 35 „lepších“ dárců a 18 „nejlepších“ dárců. U 40 (~73%) pacientů byli k dispozici dárci s různými stavy přítomnosti KIR B. Tito pacienti představují skupinu pacientů, kde by mohlo být použito výběrové kritérium přítomnosti KIR B genu u dárce.

Potvrdila jsem, že dodatečný výběr HLA shodného nepříbuzného dárce na základě obsahu KIR B genů je proveditelný. Výběr takového dárce může zlepšit transplantační výsledky u pacientů s AML.

Klíčová slova: KIR – AML – alogenní transplantace krvetvorných buněk

Is it possible in clinical practice to perform selection of unrelated donors based on KIR genotypes for AML patients?

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is an aggressive malignant disease, during which is for most of the patients only possible treatment the curative allogeneic stem cell transplantation. Besides reaction of the graft against the host is a fundamental limiting factor of the successful transplantation the relapse of the disease. According to several recent published studies, the results of transplantation in patients with AML may be influenced except the HLA genes by others so-called non - HLA genes. Especially there is mounting evidence influence of the donors KIR genes (Killer -cell Immunoglobulin - like receptors) in protection against the relapse after transplantation. HLA and KIR genes are coded on different chromosomes (HLA-sixth chromosome and KIR chromosome 19), therefore are segregated independently and HLA identical donors with recipients usually have different compositions of the KIR genes. Cooley et al. (2010) demonstrated that the specific motifs composition of centromeric and telomeric B haplotypes of KIR genes helps to protect against relapse and increases the chances of complete cure AML.

In cases where there are multiple HLA identical unrelated donors (UD) then logically the composition KIR genes by the individual donor could be a criterion in selecting the most appropriate donor, therefore, the one with the greatest potential to protect over the relapse .

Based on this study and other data the genetic screening of KIR was started with potential donors, if it was possible to choose from several 10/10 or 10/09 HLA identical UD for the patient.

Genotyping was performed by PCR-SSP methodology using commercially available kits.

It was performed gene classification 160 preferably identical HLA donors for 55 selected patients with AML. The presence of KIR haplotypes A and B as well as their combinations was determined from the type and number of the KIR genes. All genotypes were entered into the calculator, which allows you to enter up to five potential donors and obtain their assigned into one of three categories according to content KIR B. Groups , "neutral" , "better" , "best" , refer to the appropriate protection against relapse. KIR gene classification in the search for donors revealed 43 donors with AA haplotypes, 90 donors with AB haplotypes and 27 donors with BB haplotypes . After assigning state of the presence KIR B was discovered 107 " neutral " donors , 35 "better " donors and the 18 "best " donors . At 40 (~ 73 %) patients were

available donors with the different states of the presence of KIR B. These patients represent a group of patients where the selection criterion of the presence B KIR gene at the donor could be used.

We confirmed that the additional selection of HLA-matched unrelated donor on the basis of the content B of KIR genes is feasible. Selection such donor for transplantation may improve the outcome of patients with AML.

Keywords: KIR - AML - hematopoietic stem cell transplantation

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Lze u pacientů s AML indikovaných k nepříbuzenské transplantaci provádět v klinické praxi výběr nepříbuzných dárců na základě KIR genotypů?“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15.8.2016

.....

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat zejména vedoucímu své bakalářské práce MUDr. Pavlu Jindrovi, Ph.D. za odbornou pomoc při zpracování dané problematiky, jeho cenné rady, ochotu spolupráce a jeho trpělivost. Dále bych ráda poděkovala kolegům z HLA laboratoře Českého národního registru dárců kostní dřeně za možnost uskutečnění experimentálních pokusů. V neposlední řadě bych ráda věnovala poděkování svému manželovi za podporu v průběhu studia.

OBSAH

Abstrakt	2
1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Akutní myeloidní leukémie (AML).....	11
2.1.1 Epidemiologie AML	11
2.1.2 Etiologie a patogeneze AML.....	11
2.1.3 Klinické příznaky při AML.....	11
2.1.4 Diagnostika AML.....	12
2.1.5 Klasifikace AML.....	12
2.1.6 Léčba a prognóza	13
2.2 KIR – killer immunoglobulin - like receptor	13
2.2.1 Definice a funkce KIR.....	13
2.2.2 Nomenklatura KIR genů	15
2.2.3 Přehled KIR genů a jejich ligandy	15
2.2.4 Organizace KIR genů v genomu	17
2.2.5 Haplotypická variabilita KIR genů	17
2.3 Základní principy HLA systému – základní principy	19
2.3.1 Funkce HLA systému.....	19
2.3.2 Polymorfismus HLA	22
2.3.3 Dědičnost HLA systému	23
2.3.4 HLA typizace u nepříbuzných dárců.....	24
2.4 KIR a HLA – vzájemné interakce, souhrn	24
2.5 Využití KIR genotypizace při výběru dárce k transplantaci krvetvorných buněk	26
3 CÍL PRÁCE	27
4 HYPOTÉZA	27

5	METODIKA	28
5.1	Metodika výběru jedinců, studovaná populace	28
5.2	Izolace DNA z periferní krve pomocí paramagnetické separace	28
5.3	Kontrola kvality izolované DNA.....	28
5.4	Vlastní DNA typizace - amplifikace	29
5.5	Vlastní DNA typizace - elektroforéza	30
5.6	Interpretace, stanovení KIR genotypu	31
6	VÝSLEDKY	35
7	DISKUZE	36
8	ZÁVĚR	37
9	SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ	38

1 ÚVOD

Pro většinu pacientů s AML je jedinou kurativní léčbou alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloTKB). Relaps onemocnění je kromě reakce štěpu proti hostiteli základním limitujícím faktorem úspěšnosti transplantace relaps. Podle několika nedávno publikovaných studií mohou být výsledky transplantací u pacientů s AML kromě HLA genů ovlivněny i dalšími, tzv. non-HLA geny. KIR jsou receptory na povrchu NK (natural killers) buněk. NK buňky jsou lymfocyty nespecifického imunitního systému, Jejich nejdůležitější vlastností je schopnost rozlišit zdravé buňky od buněk infikovaných virem či transformovaných v nádorové buňky a efektivně je likvidovat. HLA a KIR geny jsou kódovány na různých chromozomech (HLA-6. chromozom a KIR 19. chromozom), tudíž se segregují nezávisle a HLA shodní dárci s příjemce mají obvykle různé složení KIR genů. Bylo zjištěno, že specifické složení motivů centromerních a telomerních B haplotypů KIR genů přispívá k ochraně před relapsem a zvyšuje šanci na úplné vyléčení AML. V případech kdy existuje více HLA shodných nepříbuzných dárců (UD) by pak logicky kompozice KIR genů u jednotlivých dárců mohla být kritériem výběru toho nejvhodnějšího, tedy toho s největším potenciálem protekce před relapsem.

Cílem této bakalářské práce je stanovit reálnou proveditelnost výběru dle KIR genotypu nepříbuzných, srovnatelně HLA shodných dárců u pacientů s AML s více HLA shodnými nepříbuznými dárci. U všech těchto dárců pro daného pacienta byla provedena genotypizace KIR genů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Akutní myeloidní leukémie (AML)

2.1.1 Epidemiologie AML

Akutní myeloidní leukémie (AML) je nejčastějším typem akutní leukemie u dospělých pacientů. Ročně je v USA diagnostikováno 12000 případů (Appelbaum et al, 2009). V době diagnózy je medián věku 69 let. Incidence AML narůstá s věkem. Ve věku 40 let je AML diagnostikována u 1 pacienta na 100000 obyvatel za rok, ve věku nad 75 let je to již 15 pacientů na 100000 obyvatel za rok (Estey aDöhner, 2006, 2006).

2.1.2 Etiologie a patogeneze AML

AML představuje klinicky, morfologicky, imunologicky a geneticky různorodou skupinu maligních onemocnění, pro které je charakteristická klonální proliferace nezralých krvetvorných buněk. Pokud není AML specificky léčena a není touto léčbou dosaženo kompletní remise onemocnění, může být v krátké době fatální (Estey et al, 2006).

Etiologie AML není zcela jasná. V literatuře bylo popsáno několik rizikových faktorů pro rozvoj AML. Mezi tyto rizikové faktory patří věk, přítomnost předchozího hematologického onemocnění (zejména myelodyplastického syndromu a myeloproliferativních chorob) a předchozí chemoterapie. Pacienti trpící hereditárními syndromy, které jsou spojovány s vyšší fragilitou chromatinu (Bloomův syndrom, Fanconioho anémie, Kostmanův syndrom, Wiskotův-Aldrichův syndrom, ataxia teleangiectasia), mají zvýšené riziko vzniku AML. Zvýšená incidence AML je spojována s Downovým syndromem (trisomie 21), Klinefeterovým syndromem (XXY) a Patauovým syndromem (trisomie 13). Vznik AML může být indikován některými viry, radiačním zářením, chemickými agens (benzen, pesticidy, herbicidy, deriváty benzenu – tricyklické uhlovodíky). V patofyziologii vzniku AML mají zásadní význam genetické změny. Jedná se především o některé genetické přestavby (Souček et al, 2011; Češka et al, 2010).

2.1.3 Klinické příznaky při AML

Klinické projevy jsou nespecifické a jsou způsobeny nedostatkem funkčních krvinek v krevním oběhu. Stav nemocného se velmi rychle zhoršuje. Často pacienti, kteří byli přijati ve velmi vážném stavu, udávají, že před 2 – 3 týdny měli pocit plného zdraví. Charakteristické příznaky pro AML jsou malátnost, únava a pocit vyčerpání, bledost sliznic, dlaní, nehtových lůžek i celé kůže (anémie), u starších nemocných se anemický syndrom

manifestuje typickými ischemickými bolestmi na hrudi, dále bývá zvýšená četnost infekcí, které mají často velmi agresivní průběh, typické jsou záněty v horních cestách dýchacích, stomatitidy, anginy, nedostatečně reagující na ATB. Někdy jsou pozorovány zvýšené teploty nebo horečky bez prokazatelné infekce. Velkým problémem při nedostatku trombocytů může být metroragie. Dalšími projevy trombocytopenie je krvácení z nosu, dásní, petechie a ekchymózy. Může se objevit hyperplazie dásní, kožní infiltráty a příznaky poškození CNS u leukemií vycházejících z monocytární řady. Asi 10% pacientů s AML má v době stanovení diagnózy počet leukocytů nad $100 \times 10^9/l$, tito pacienti jsou ve zvýšené míře ohroženi postižením CNS, leukostázou a následným tumor lysis syndromem po zahájení léčby. Leukostáza se projevuje jako dušnost, bolest na hrudníku, bolest hlavy, alterace mentálního stavu, parézy kranálních nervů a priapismus (Adam et al, 2008).

2.1.4 Diagnostika AML

Podezření na AML, které vyplývá z klinických příznaků, je možné potvrdit vyšetřením periferního krevního obrazu s mikroskopicky hodnoceným diferenciálním rozpočtem leukocytů. Pokud je snížený počet erytrocytů a další krvinek, podezření na akutní leukemii zesílí. Počet leukocytů v periferní krvi není diagnostický, bývá zvýšený, může být i normální či snížený. Přítomnost blastů v diferenciálním krevním obraze dosahující > 5% celkového počtu jaderných buněk svědčí pro diagnózu akutní leukemie. Vy zralé granulocyty se vyskytují méně často. Jestliže vyšetření periferního krevního obrazu jednoznačně nepotvrdí diagnózu akutní leukémie, je třeba zjistit diagnózu a prognózu cytologickým vyšetřením kostní dřeně (>20% blastů v kostní dřeni). Pro podrobnější klasifikaci a určení specifického fenotypu ke sledování minimální reziduální nemoci po dosažení remise je aspirát kostní dřeně vyšetřován průtokovou cytometrií. Prognostický význam má cytogenetické vyšetření kostní dřeně, které hodnotí početní a strukturální chromozomové odchylky, a molekulární genetické vyšetření, zajišťující screening nejčastěji se vyskytujících genů (Souček et al, Češka et al, 2010, Adam et al, 2008).

2.1.5 Klasifikace AML

Klasifikace AML je složitá. Nejjednodušší je dělení de novo AML a AML s myelodysplastickými změnami. V praxi je starší FAB klasifikace (francouzsko – americko – britská) nahrazována novou klasifikací Světové zdravotnické organizace (WHO). FAB klasifikace je založena na morfologickém a cytochemickém hodnocení blastů. WHO klasifikace dělí AML nejen podle morfologie blastů, ale zohledňuje i klinická a imunofenotypizační kritéria, cytogenetické a molekulárně – genetické změny.

2.1.6 Léčba a prognóza

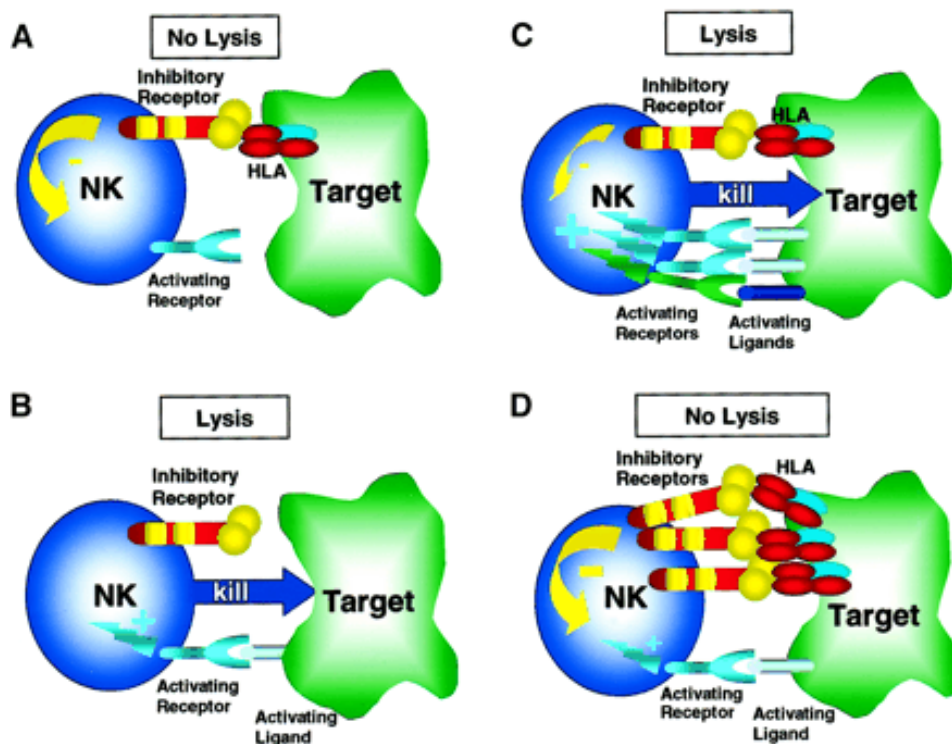
K současným standardním možnostem léčby AML patří intenzivní cytostatická léčba, jejímž cílem je navodit kompletní remisi onemocnění následovaná intenzivní konsolidační léčbou. Konsolidací rozumíme udržení (konsolidování) dosažené remise. Konsolidací může u příznivých subtypů být další intenzivní chemoterapie nebo je častěji indikovaná alogenní transplantace krvetvorných buněk, kterou provádíme 60-80% pacientů s AML. I přes významný pokrok v diagnostice a léčbě zůstává AML onemocněním s nepříliš příznivou prognózou, kde při netransplantačních léčebných možnostech dlouhodobě přežívá asi 40%-50% pacientů mladších 60 let a asi 10% pacientů starších 60 let (Estey a Döhner, 2006). Jak uvedeno výše, většina nemocných s AML je léčena alogenní transplantací krvetvorných buněk, která zlepší přežití u mladších nemocných na cca 60-70%, u starších na 20-30%. Pouze 20-25% pacientů má HLA shodného dárce v rodině, pro většinu nemocných tedy musíme hledat dárce v registrech nepříbuzných dárců. Zde naštěstí pro většinu z nich nalezneme několik HLA kompletně shodných dárců. Z těchto dárců lze toho optimálního vybrat dle nejrůznějších parametrů (věk, pohlaví, krevní skupina), důležitým faktorem snižujícím riziko relapsu je pak i kompozice KIR genů (KIR genotyp)

2.2 KIR – killer immunoglobulin - like receptor

2.2.1 Definice a funkce KIR

Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIR) jsou receptory na povrchu NK (natural killers) buněk. NK buňky jsou velké granulární lymfocyty, které patří do vrozeného imunitního systému, u lidí NK buňky představují 10 – 15% lymfocytů v periferní krvi (Caligiuri, 2008). Jsou to buňky, které reagují rychle a efektivně likvidují především nádorové buňky a buňky infikované virem (Robertson et al, 1990). Na rozdíl od T a B lymfocytů nemají antigenně specifické receptory, a proto zůstávalo záhadou, jak rozeznávají abnormální buňky (Hořejší et al, 2013). NK buňky mají schopnost identifikovat molekuly vlastního MHC systému (Major Histocompatibility Complex), jmenovitě HLA I. třídy, které jsou normálně exprimovány prakticky na všech buňkách v těle. Nádorové a některé virem napadené buňky potlačují expresi HLA I. třídy a tím se brání napadení cytotoxickými T lymfocyty (Restifo, 1993). Snížená exprese HLA I. třídy činí abnormální buňky citlivé k cytotoxicitě NK buněk (Karre, 1986). Molekuly HLA I. třídy rozpoznávají NK buňky pomocí pozitivních a negativních

receptorů, které mohou inhibovat nebo naopak aktivovat NK buňky k „zabíjení“ (Colonna, 1993). Zjednodušený princip interakce mezi oběma typy KIR receptorů a HLA molekulou na povrchu cílové buňky ukazuje obrázek 1 (Gasser, 2006). NK buňky neustále systematicky zjišťují přítomnost či absenci příslušných HLA ligandů pro své KIR receptory. Pokud je HLA molekula přítomna, pak dojde k vazbě KIR-ligand HLA, a protože za normálních okolností převládají inhibiční KIR nad aktivačními, tak nedojde ke spuštění cytotoxické reakce NK buněk. Tímto způsobem jsou „vlastní“ buňky chráněny před cytotoxicitou (viz část A a především D na obr. 1). Jestliže receptory KIR nenaleznou příslušný ligand HLA („vlastní“ molekulu HLA), aktivační KIR receptory převládají nad inhibičními, je spuštěna náležitá cytotoxická kaskáda (viz část B na obr. 1).



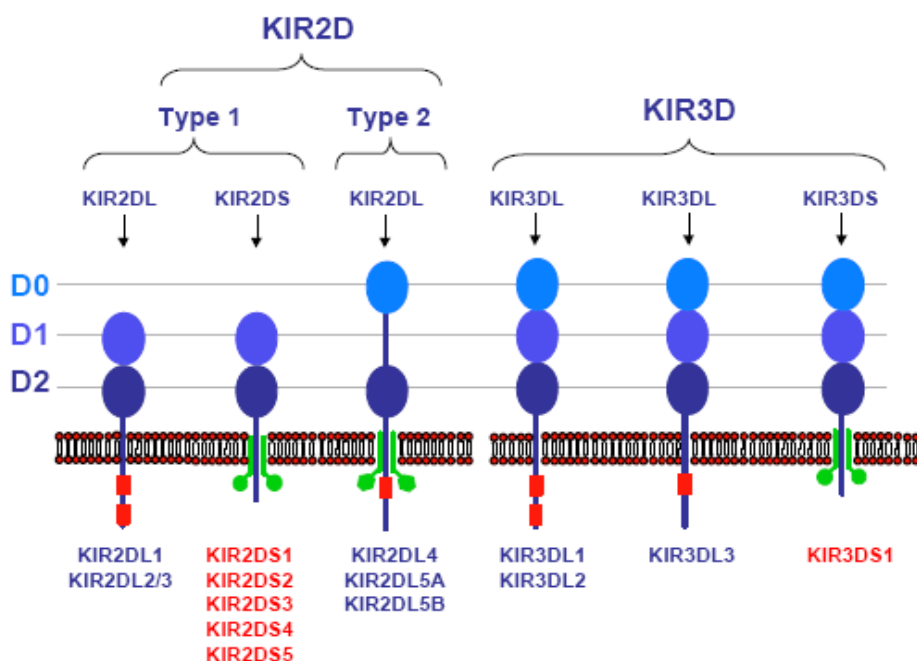
Obrázek 1: Regulace odpovědi NK buňky prostřednictvím interakce aktivačních/inhibičních KIR receptorů a HLA molekuly. Za normálních okolností inhibiční signál vždy převládá nad aktivačním. Převzato z Farag et al., Blood 2002, 100: s. 1937

Stručně lze shrnout, že NK buňky s potenciálem iniciovat cytotoxickou aloreakci používají KIR receptory jako inhibiční, směrem k „vlastním“, zdravým buňkám. Pokud však příslušný vlastní ligand HLA na cílové buňce chybí, pak dochází k iniciaci cytotoxické reakce. Proces interakce KIR/HLA a mechanismus regulace cytotoxicity NK buněk se jako celek nazývá

„missing-self“ hypotéza (Gasser a Raulet, 2006). Takto je zaručena tolerance NK buněk k „vlastním“ a zdravým buňkám, naopak „cizí“ alogenní buňky, buňky s „down“ – regulovaným HLA ligandem (molekulou), což jsou typicky buňky napadené virem a nádorové buňky, které jsou efektivně eliminovány (Farag et al, 2002).

2.2.2 Nomenklatura KIR genů

Nomenklatura KIR genů a receptorů je založena na struktuře molekul, které produkují. Vychází respektive z počtu „Ig-like“ domén a délky cytoplasmatického výběžku (tail) – viz obrázek 2.



Obrázek 2: Nomenklatura KIR genů/receptorů (převzato z www.ebi.ac.uk/Ipd/kir)

KIR receptory mají buď 2 nebo 3 imunoglobulinové domény (2D nebo 3D) a buď dlouhý (long-L) nebo krátký (short- S) cytoplasmatický úsek (tail). Podle kombinace počtu těchto Ig-like domén a přítomnosti S nebo L cytoplasmatického výběžku je generován název KIR genu/receptoru (Middleton et al 2002, Moretta et al, 2004).

2.2.3 Přehled KIR genů a jejich ligandy

Bylo popsáno celkem 15 exprimovaných KIR genů a 2 KIR pseudogeny. Přehled všech KIR genů/receptorů a jejich funkcí je uveden v tabulce 1.

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

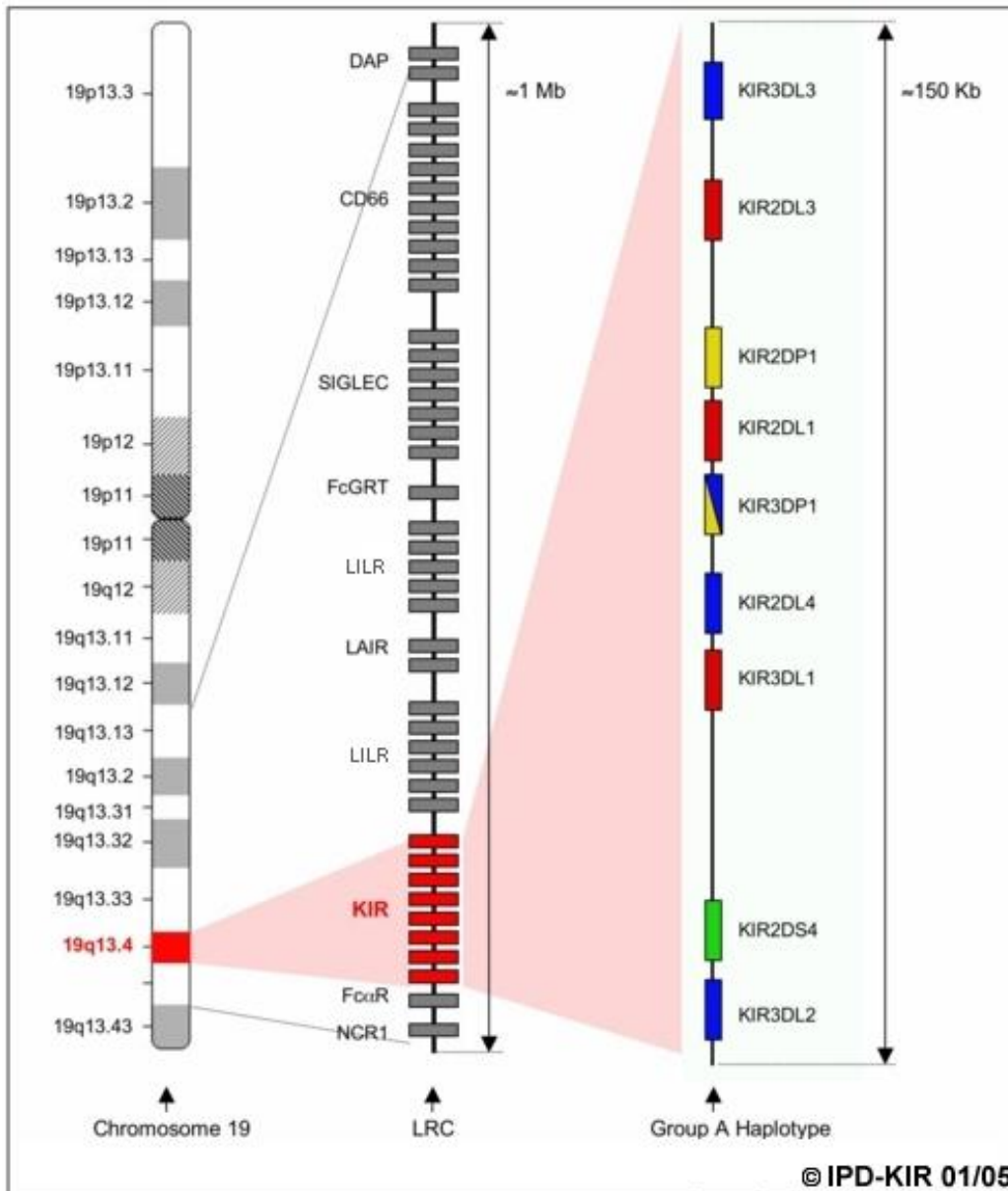
Tabulka 1: KIR geny/receptory a jejich vazební partneři (ligandy)

KIR gen	Funkce – typ signálu	HLA ligand
2DL1	Inhibiční	HLA-C2
2DL2	Inhibiční	HLA-C1
2DL3	Inhibiční	HLA-C1
2DL4	Aktivační	HLA-G
2DL5A	Inhibiční	Není znám
2DL5B	Inhibiční	Není znám
3DL1	Inhibiční	HLA-Bw4
3DL2	Inhibiční	HLA-A3,A11
3DL3	Není známo	Není znám
2DS1	Aktivační	HLA-C2
2DS2	Aktivační	HLA-C1
2DS3	Aktivační	Není znám
2DS4	Aktivační	Není znám
2DS5	Aktivační	Není znám
3DS1	Aktivační	HLA-Bw4?
2DP1, 3DP1	Pseudogeny, neexprimovány	

Vazebné ligandy KIR genů/receptorů jsou známy především pro inhibiční receptory a ve všech případech jde o HLA specifický I. třídy. Jedná se především o skupinu alel HLA-C alel lišících se aminokyselinovým reziduem na pozicích 77 a 80 α – helixu molekuly HLA-C (Colonna et al 1993). Byla publikována rozsáhlá data ukazující na význam inhibičních KIR a jejich HLA ligand pro výsledek transplantace krvetvorných buněk.

2.2.4 Organizace KIR genů v genomu

KIR geny jsou lokalizovány na chromosomu 19q13.4 v oblasti zvané „leukocyte receptor complex“ (LRC). Pro každý KIR gen navíc existují alelické varianty (Marsh et al, 2002; Hsu et al, 2002). Tak jako geny HLA systému se i KIR geny dědí podobně a to jako celý blok genů – haplotyp (viz obr. 3).



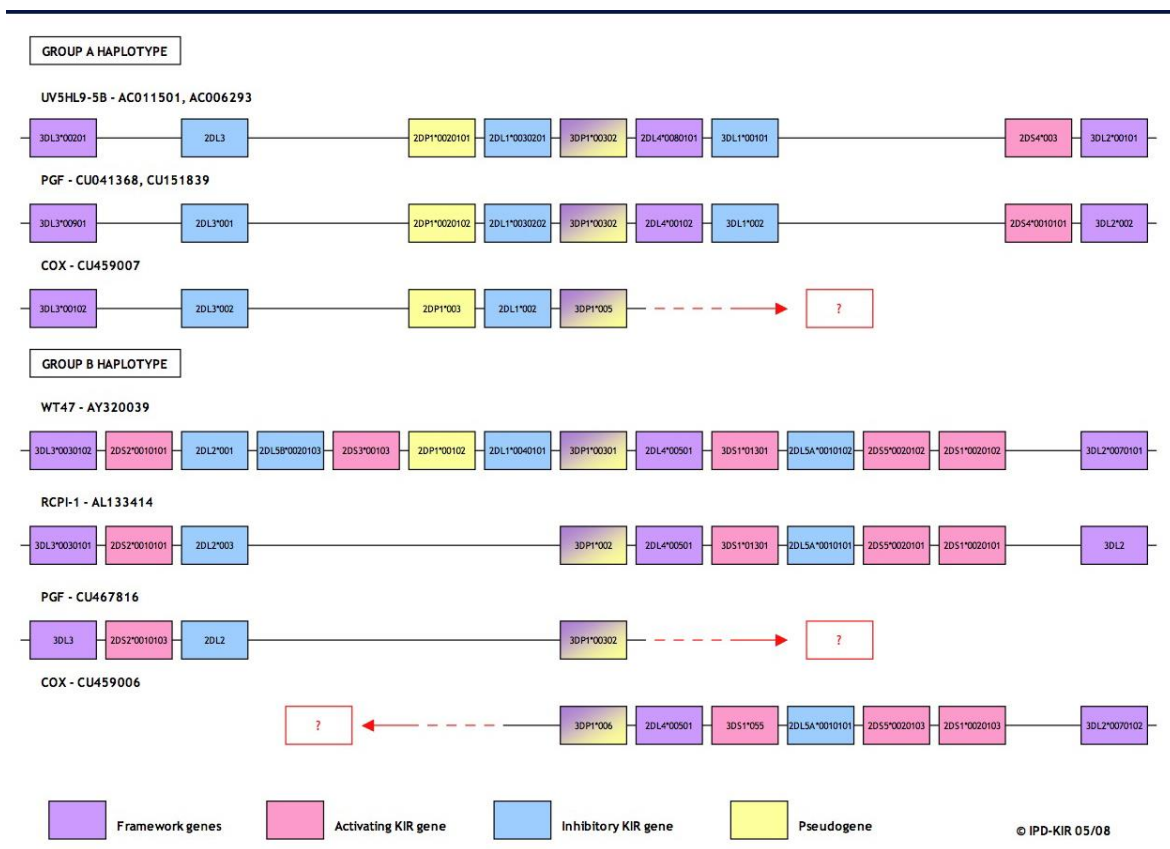
Obrázek 3: Genomická organizace KIR genů (převzato z Robinson et al., 2005)

2.2.5 Haplotypická variabilita KIR genů

Kromě alelického polymorfismu existuje pro KIR geny ještě výrazná haplotypická variabilita, která je způsobena variabilitou v počtu a v typu zastoupených KIR genů na daném haplotypu (Marsh et al, 2002; Hsu et al, 2002). Tato haplotypická různorodost je hlavním důvodem

diverzity KIR genů v populaci a repertoáru NK buněk. KIR geny se vyskytují v podobě 2 hlavních typů haplotypů, označovaných A a B, které jsou definovány typem a počtem specifických KIR genů. V současné době není k dispozici žádné jednoduché univerzální kritérium definující a odlišující tyto haplotypy. Používá se následující pracovní definice.

Skupina haplotypů B je charakterizována přítomností alespoň jednoho nebo více z následujících genů: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* a *KIR3DS1*. Logicky je pak tedy skupina haplotypů A charakterizována absencí těchto genů. V důsledku těchto rozdílů mají haplotypy B vždy více genů kódujících aktivační KIR než haplotypy A, které mohou mít pouze gen *KIR2DS4*. V definici haplotypů A a B bohužel není nadále jednoznačný konsensus (Hsu et al, 2002; Uhrberg et al, 1997), takže různými autory jsou používána rozdílná kritéria pro rozlišení haplotypů a to komplikuje srovnání a interpretaci různých studií v oblasti populační genetiky KIR genů. Schematický přehled základních KIR haplotypů ukazuje obrázek 4. Tzv. „framework“ KIR geny (2DL4, 3DL2 A 3DL3, viz obr. 4) jsou přítomny prakticky u všech dosud typizovaných jedinců, ale přítomnost ostatních 14 KIR genů je výrazně variabilní. Tato variabilita v zastoupení je větší pro aktivační KIR geny („S“), které mají navíc limitovaný alelický polymorfismus. Inhibiční geny jsou obvykle vždy v genotypu přítomné, ale mají zase extenzivní alelický polymorfismus. Bylo popsáno několik desítek KIR haplotypů a na základě toho více než 300 rezultujících KIR genotypů (viz www.allelefreqencies.net, Middleton, 2003), přičemž jsou neustále popisovány nové haplotypy a genotypy. Proto bylo pokládáno za nezbytné zavedení robustního a praktického systému, který by definoval obsah genů různých KIR haplotypů. Bylo navrženo, aby každý KIR haplotyp byl označen „KH“ s následnou pomlčkou a poté unikátním trojmístným číslem, které bylo přiřazováno postupně jednotlivým haplotypům. Tento systém umožňuje pojmenovat 999 KIR haplotypů.



Obrázek 4: Příklad typických KIR haplotypů skupiny A a skupiny B, převzato z www.ebi.ac.uk/ipd/KIR (Robinson et al, 2005)

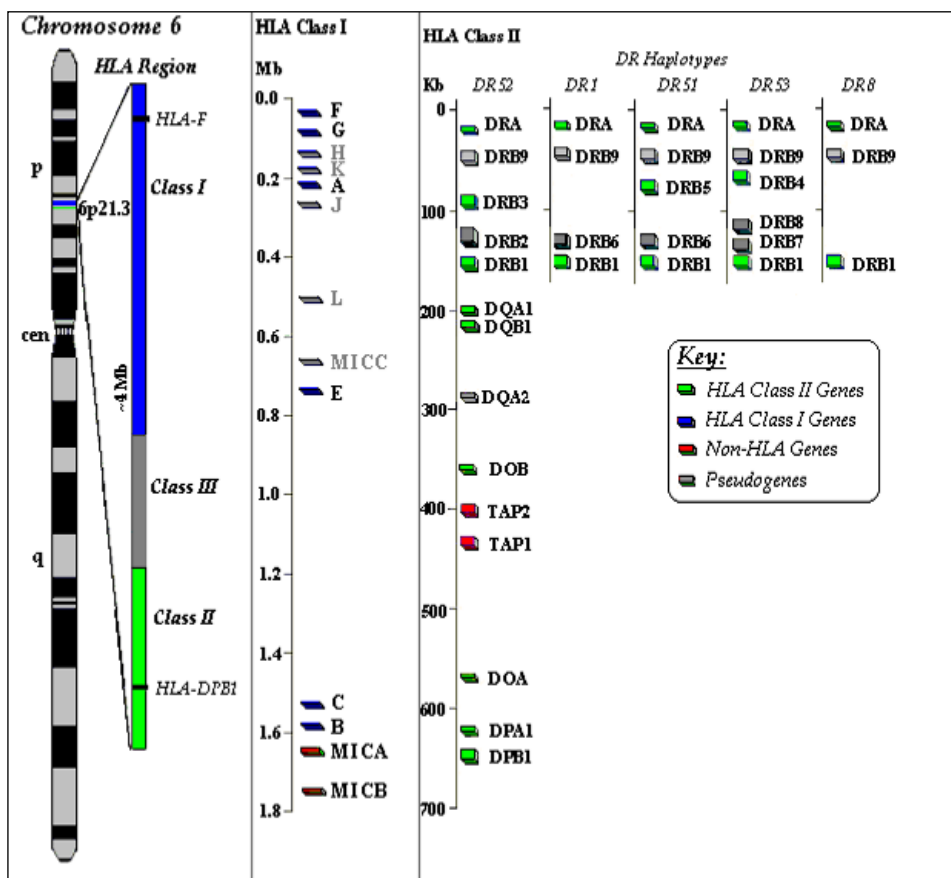
2.3 Základní principy HLA systému – základní principy

2.3.1 Funkce HLA systému

HLA antigeny jsou skupinou bílkovin, které mají klíčovou úlohou v imunitním systému a jsou lokalizovány na povrchu buněk jako „antigeny“. Jedná se o polypeptidové produkty skupiny genů nazývaných „hlavní histokompatibilní komplex“ (MHC – major histocompatibility complex). Dosud byly tyto geny a aloreaktivita jimi podmíněná popsány pouze u obratlovců. Geny tohoto komplexu se nazývají uvnitř každého druhu obratlovců „druhově“ specifickým jménem. U lidí je tak označujeme jako geny HLA (Human Leukocyte Antigen) systému a tento „druhově“ specifický název produktů genů MHC se uplatňuje i u dalších druhů. Například u psů se analogicky nazývá DLA – Dog Leukocyte Antigen apod. Z funkčního i biologického hlediska jde však u všech savců o stále stejnou skupinu genů. Je však třeba podotknout, že termíny HLA a MHC se často používají synonymně a celkově nekonzistentně. Je doporučováno v současnosti termínem HLA systém označovat pouze geny přímo kódující

antigen-prezentující HLA molekuly. Termínem MHC je doporučeno nazývat celý komplex regiónu obsahující kromě „klasických“ HLA genů i celou řadu dalších genů (např TAP1,2, MICA apod.), které se podílejí také na aloreaktivní odpovědi, ale s méně významnou funkcí (viz obr. 5).

Lze tedy velice zjednodušeně říci, že HLA molekuly jsou spolu s imunoglobuliny a receptory T-lymfocytů (TCR-T-cell receptors) základem adaptivní imunity člověka. Jejich základní funkce v antigen-specifické imunitní odpovědi je v tom, že T-lymfocyty, které slouží jako klíčová regulační a efektorová složka imunitního systému, jsou schopny poznávat a reagovat na antigenní části pouze v kontextu HLA molekul – tedy pokud jsou tyto antigeny navázané na molekuly HLA systému. Jedná se o HLA restrihované rozpoznávání antigenů. Pouze molekuly HLA systému (I. a II. třída) na povrchu buněk mohou tedy intracelulárně „zpracované“ antigenní peptidy prezentovat T-lymfocytům a tak zprostředkovávat imunitní reakci, která je výlučně zprostředkována systémem HLA . Za interakcí mezi buňkou nesoucí molekulu HLA a T-lymfocyttem stojí poměrně složitý komplex HLA molekuly, T-lymfocytárního receptoru (TCR) a antigenního peptidu (Neefjes a Momburg, 1993).



Obrázek 5: Genomická organizace genů HLA systému (převzato z Robinson et al, 2005)

2.3.1.1 Funkční a strukturální rozdělení HLA antigenů

Ze strukturálního a funkčního hlediska je možné HLA geny a molekuly (antigeny) rozdělit do 2 základních skupin, jako HLA (anti)geny I. a II. třídy. Rozdíly ve zpracování a prezentaci antigenů imunokompetentním buňkám (především T-lymfocytům) jsou zahrnuty pod funkční hledisko. CD4⁺ T-lymfocyty (T-helpery) poznají zpracovaný antigen pouze v kontextu molekuly HLA II. třídy. Oproti tomu cytotoxické T-lymfocyty, tedy CD8⁺, vyžadují prezentaci antigenu HLA molekulami I. třídy. Antigeny prezentované molekulami I. třídy jsou hlavně tvořeny intracelulárně syntetizovanými antigeny, jedná se například o vlastní či virové proteiny. Na rozdíl od molekul HLA II. třídy prezentující peptidy, které byly získány proteolytickým štěpením fagocytovaných (tedy extracelulárních) proteinových antigenů, např. bakteriálních antigenů. Další rozlišení je v expresi. Molekuly I. třídy jsou přítomny prakticky na všech buňkách, přestože s různou expresí v různých tkáních, kde se vyskytují s největší denzitou na buňkách imunitního systému. Molekuly II. třídy mají omezenou expresi pouze na povrch B-lymfocytů, aktivovaných T-lymfocytů (na klidových T-lymfocytech je jejich exprese nízká), antigen-prezentujících buněk (APC) a dendritických buněk (Thorsby, 1999).

2.3.1.2 Genetická organizace a struktura HLA molekuly

HLA systém je polygenní a velmi polymorfní (Campbell, 1997). Celý komplex genů, který kóduje výše uvedené HLA bílkoviny je lokalizován na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21.1-6p21.3). Jedná se o oblast s největší hustotou genů v celém genomu (~3500 kbp). Tento komplex je složen z 3 základních regionů (viz obr. 5) o celkovém obsahu přibližně 140 genů. Nejbližce centromery je region II. třídy, obsahující geny pro α a β řetězce molekul HLA II. třídy a na druhé straně, tedy nejbližce telomery je region I. třídy, jenž obsahuje geny pro těžké α řetězce molekul HLA I. třídy. Mezi regionem I. třídy a regionem II. třídy se nachází region III, který se také někdy označuje jako region HLA III. třídy, s geny pro komplement (C4), některé cytokiny (TNF α) a stresové proteiny (hsp). Prakticky všechny geny regionu II se nějakým způsobem podílí na základní funkci HLA systému, což znamená zpracování a prezentaci antigenů T-lymfocytům, z genů regionu III se žádný nepodílí na funkci HLA systému a region třídy I je v tomto směru intermediární, obsahuje totiž směs genů jak bezprostředně se podílejících, tak přímo nesouvisejících s funkcí HLA systému.

Geny regionu I, HLA I. třídy:

Tato oblast obsahuje přibližně 20 genů. Mezi nejdůležitější patří geny HLA - A, - B a - C, které jsou nazývány klasickými geny HLA I. třídy kódující těžké α - řetězce molekul HLA I. třídy, jež jsou klasickými sérologickými specifitami I. třídy a prezentují antigenní části CD8⁺ T-lymfocytům. Dalšími geny jsou, někdy také nazývané „neklasické“, HLA E, F, G, MICA a MICB, které mají úlohu především v přirozené cytotoxicitě (NK buňky), slizniční a reprodukční imunitě. Další geny, jako HLA H, J, K a MICC, jsou řazeny mezi pseudogeny. Někdy jsou také geny HLA-A, -B,-C označovány jako „major“ MHC geny regionu a geny E, G a G jako „minor“.

Geny regionu II, HLA třídy II:

V oblast regionu II (třídy II. HLA) se vyskytuje poměrně složitý komplex 3 párů genů kódující dimér HLA molekul II. třídy („major“ MHC II. proteiny), které jsou někdy zjednodušeně nazývány HLA DR, HLA DP as HLA DQ. Tato oblast dále obsahuje geny, jež kódují další glykoproteiny (DM, DO) s funkcí ve zpracování a prezentaci antigenů („minor“ geny – DOA,DOB).

Mezi typy DR a DQ proteinů existuje silná vazebná nerovnováha.

2.3.2 Polymorfismus HLA

Geneticky nejvariabilnějšími kódujícími lokusy u savců jsou obecně MHC lokusy a lidských HLA lokusů tomu není jinak. Evoluce MHC polymorfismu je způsobena 2 primárními selekčními tlaky: 1) selekcí ve prospěch MHC heterozygotů a 2) selekcí ve prospěch vzácných HLA alel prostřednictvím koevoluce hostitele-patogenu (host-pathogen coevolution) (Neefjes a Momburg, 1993; Thorsby, 1999). Charakteristickým znakem HLA komplexu je absence „wild“ typu. Většina z hlavních lokusů (genů) HLA zmíněných výše obsahuje desítky až stovky alel. K dubnu 2016 bylo popsáno celkem 14473 HLA alel (viz www.hla.alleles.org/alleles/index.html), přičemž každý měsíc jsou popisovány přibližně desítky nových alel. Nejpolymorfnějším genem je HLA-B*, dále pak HLA-A a HLA-DRB1. Podrobnější a aktuální statistika se nachází na adrese www.hla.alleles.org. V oblastech genů kódujícím aminokyseliny vazebného žlábků HLA molekuly pro antigenní peptid je koncentrována většina variací aminokyselin daných polymorfismem HLA genů, zatímco úseky HLA genů, které kódují část molekuly reagující s TCR receptorem, jsou relativně konzervované. Takto je zajištěna pravděpodobnost úspěšné prezentace jakéhokoliv antigenního podnětu alespoň některými jedinci dané populace a je tak zaručena imunologická odpověď daného živočišného druhu jako celku.

K vývoji polymorfismu HLA genů v místě pro prezentaci antigenů došlo jednak postupnou akumulací bodových mutací u potomků a jednak genovou konverzí a rekombinacemi. Rozhodujícím činitelem především genové konverze a rekombinace je ohromná diverzita HLA genů. Důsledkem je jejich polymorfická struktura. Pokud se podrobně podíváme na sekvence různých alel daného HLA genu, pak zjistíme, že alelická diverzita není dána pro alelu specifickou bodovou mutací, ale především různou kombinací sekvenčních motivů ze základního „poolu“ různých sekvenčních motivů. Tato mozaikovitá struktura alelických sekvencí je v souladu s tím, že polymorfismus je generován především výměnami celých sekvenčních segmentů (Jeffreys et al, 2004). Jednotlivé alely pak mohou být považovány za chiméry složené z různých segmentů ostatních alel, toto sledování potvrzuje i fakt, že nově identifikované alely jsou většinou charakterizovány novou kombinací již známých a popsaných sekvenčních motivů. Zjednodušeně lze tedy říci, že celkový počet alel daného lokusu je hlavně určen počtem teoreticky možných kombinací známých sekvenčních motivů genu.

Pro HLA geny I. třídy je polymorfismus lokalizován především v exonech 2 a 3, ale u HLA genů II. třídy je omezen takřka pouze na exon 2.

2.3.3 Dědičnost HLA systému

Všechny geny kódující HLA molekuly se dědí kodominantně a řídí se mendelovským typem dědičnosti a dědí vcelku jako blok – takzvaný haplotyp. Jedinci jsou heterozygotní. Na buňkách mají dvě kompletní sady HLA antigenů.

Geny HLA systému mají docela těsnou genetickou vazbu, takže jsou většinou přenášeny jako bloky genů, mezi kterými pouze vzácně dochází k rekombinaci (crossing-over). Jak ukázaly rodinné studie, pro některé oblasti uvnitř HLA komplexu je relativní absence rekombinací („crossing-over“) typická. Jedná se především o subregiony HLA-B k HLA-C a HLA-DQB1 k HLA-DRB1. Tyto regiony jsou někdy nazývány jako „polymorfní zmražené bloky“. Jejich odolnost vůči rekombinacím je základem vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium) – tedy nenáhodné asociaci alel 2 nebo více lokusů - mezi specifickými alelami HLA-B a HLA-C, respektive HLA-DR a DQ.

Vazebná nerovnováha je dokonce typickým rysem HLA systému, jak prokázaly populačně genetické studie. Jako pravděpodobné příčiny se jeví již uváděná redukováná frekvence rekombinací a selekce ve prospěch vázaného polymorfismu (Messaoudi et al, 2002) haplotyp

A1-B8-DR3, který se v bělošské populaci vykytuje až s 5-10% frekvencí a někdy je označován jako ancestrální haplotyp AH8.1.

2.3.4 HLA typizace u nepříbuzných dárců

V případě nepříbuzenských transplantací se vybírají potenciální dárci, kteří nemají s daným pacientem žádný děděný haplotyp. Snahou je najít takového dárce, který má shodné, přestože děděné od jiných rodičů, HLA antigeny. Informace o tom, jak jsou alely haplotypicky uspořádány obvykle chybí, proto je vždy nutná typizace maximálním rozlišením ve více HLA lokusech. Zjišťovaný minimální rozsah HLA shody se v jednotlivých transplantačních centrech liší. V současné době je u nepříbuzného páru požadována typizace vysokým rozlišením v lokusech HLA – A, B, C, DR a DQ (<http://www.efiweb.eu/efi-committees/standards-committee.html>). Pokud pacient a dárce mají stejné alely na všech těchto lokusech, hovoříme o shodě 10/10. Při jedné neshodě se jedná o shodu 9/10, při dvou o shodu 8/10.

K typizaci se nejčastěji používá PCR – SSP (PCR se sekvenačně specifickými primery) či SBT (sequence based typing) technika, v posledních letech se stává zlatým standardem přímá sekvenace (SBT) HLA genu.

2.4 KIR a HLA – vzájemné interakce, souhrn

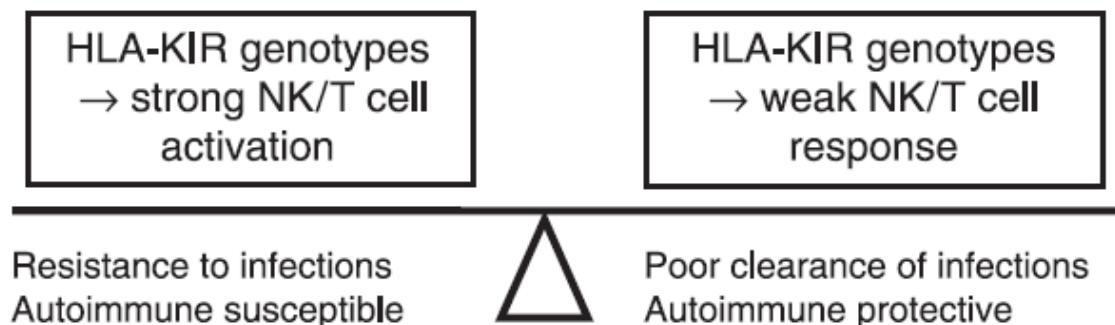
Z výše uvedeného textu je patrné, že KIR a HLA molekuly společně formují přirozenou a získanou (adaptivní) imunitu tak, že vzájemnou interakcí kontrolují efektorové buňky. Tyto systémy mají řadu společných rysů. Jsou jednak kódovány v genomických regionech s velmi komplexní organizací a oba mají mimořádnou rozmanitost jak uvnitř, tak mezi jednotlivými lidskými populacemi. Tato různorodost vznikla na základě nepřetržité snahy účinně eliminovat neustále se měnící spektrum patogenů. Pro efektorové buňky získané imunity (čili B a T lymfocyty) je požadované variability imunitní odpovědi dosaženo somatickou přestavbou genomické DNA a selekcí náležitě reagujících buněk. Naopak pro KIR a HLA molekuly je funkční variabilita zajištěna přímo jejich výrazným genetickým polymorfismem. V obsahu genů daného haplotypu mají značnou variabilitu KIR geny oproti HLA. Klíčová role NK buněk ve vrozené imunitní „surveillance“ organismu implikuje možnost, že by patogeny mohly být pro KIR geny nositeli podobného typu selektivního tlaku, který u HLA systému rezultuje v univerzální a komplexní genetickou diverzitu (Trowsdale, 2001; Vilches a Parham, 2001). Srovnatelná rychlost evoluce KIR poskytuje další důkaz pro selekci, která je primárně ovlivňována zevně působícími patogeny (Guethlein et al, 2007). KIR a HLA

systémy jsou kódovány odlišnými chromozomy a jsou tedy segregovány i děděny nezávisle, přesto se zdá, že alespoň některé KIR mají společnou evoluci s HLA (Single et al, 2007). Tímto je podpořena hypotéza, že stejný princip selektivního tlaku a demografických faktorů, ovlivňující populační frekvenci výskytu alel HLA I. třídy, je zodpovědný i za evoluci KIR repertoáru, protože takto příslušným NK receptorům usnadňuje interakci s HLA molekulami I. třídy (Khakoo et al, 2000). Dalším nepřímým důkazem určité vzájemné ko-evoluce KIR a HLA, který byl doložen, je silná negativní korelace mezi přítomností aktivačních KIR a jejich HLA ligand v různých populacích (Single et al, 2007). Mezi frekvencí genotypů obsahujícími KIR2DL2 a 2DL3 a frekvencí jejich ligand – HLA C1 byla pozorována signifikantní korelace (Hollenbach et al, 2010). Na význam určitých specifických KIR-HLA kombinací v patogenezi autoimunitních onemocnění, nádorových infekcí i průběhu určitých virových infekcí ukazuje tak na stále se více kumulujících dat (Parham, 2005).

Interpretaci a pochopení úlohy interakce KIR-HLA v těchto patologických stavech brání mnoho faktorů, ale především je to extenzivní polymorfismus HLA a KIR a dalším faktorem je silná vazebná nerovnováha mezi variantami obou rodin genů. Je ale přeci jen možné dojít k těmto obecným závěrům:

1. KIR – HLA kombinace s převládající tendencí k aktivaci NK buněk nebo s nižší inhibiční úrovní jsou asociované se zvýšeným rizikem autoimunitních nemocí, ale naopak mají výraznější úroveň protektivity proti infekčním onemocněním.
2. HLA-KIR kombinace s převládajícím inhibičním potenciálem mají naopak protektivní vliv proti chronickým zánětlivým onemocněním a poruchám gestace.

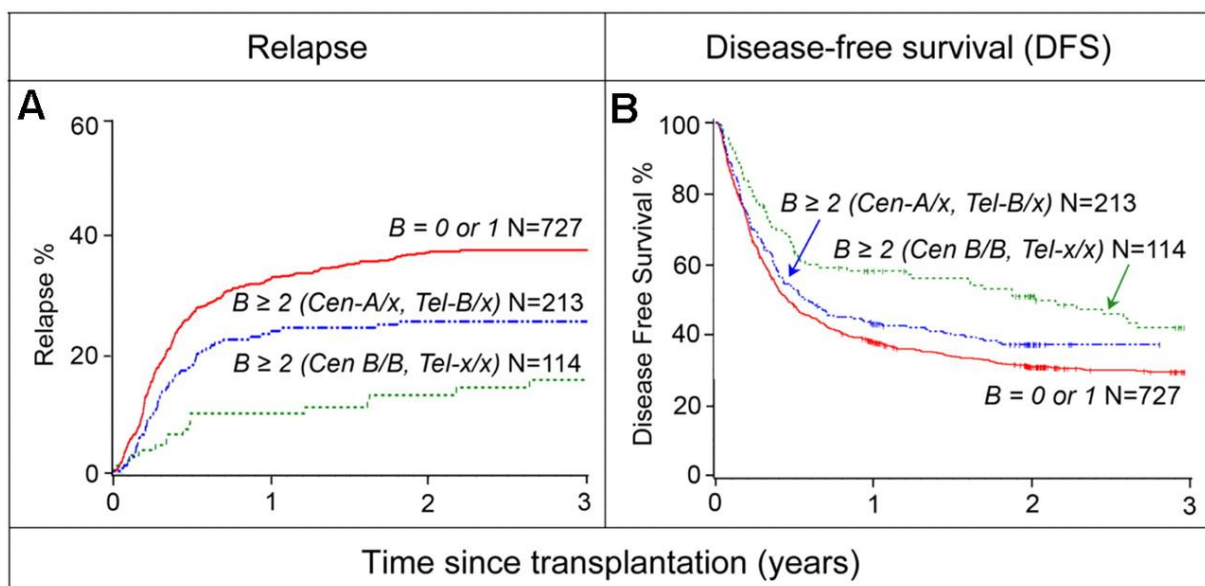
Obrázek 6 shrnuje tuto představu (Traherne, 2008).



Obrázek 6: Synergie mezi kompozicí KIR-HLA genotypů a výslednou dualitou mezi tendencí k autoimunitnímu či infekčnímu onemocnění. Různou úroveň aktivační/inhibiční NK a T buněk jsou vyvolávány různými KIR-HLA kombinacemi, to má za následek odlišnou náchylnost k autoimunitnímu onemocnění a naopak protektivitu vůči infekčním onemocněním. Obrázek je převzatý z Traherne et al.

2.5 Využití KIR genotypizace při výběru dárce k transplantaci krevetvorných buněk

Jak už je v předešlém textu zmíněno KIR a HLA geny mají odlišnou chromozomální lokalizaci, je tedy zřejmé, že páry perfektně shodné v HLA systému jsou obvykle neshodné v genech KIR systému. V současné době jsou dostupná ověřená data, že výsledek transplantace krevetvorných buněk (HCT = hematopoetic cell transplantation) je kromě stupně HLA shody ovlivněn i interakcí KIR/HLA dárce a příjemce a také i repertoárem KIR genů a KIR genotypu dárce (Miller et al, 2007; Cook et al, 2006; Cooley et al, 2009; Hsu et al, 2005). Podle některých studií může mít vyšší počet KIR genů příznivý vliv na výsledek HCT (Cook et al, 2006; Cooley et al, 2009) a typ KIR genotypu příjemce může být jedním z kritérií výběru nepříbuzného dárce v případech, kdy je k dispozici více HLA shodných nepříbuzných dárců. Bylo zjištěno, že ze dvou haplotypů mají dárcovské haplotypy B signifikantně lepší ochranu před relapsem (Cooley et al, 2010)(viz. obrázek 7). Benefity se stoupají s počtem B specifických motivů KIR a to zejména u homozygotů, které mají v centromerické části lokusu KIR Cen- B/B. Z toho vyplývá, že klinický benefit CEN B/B by mohl být způsoben přítomností KIR 2DS2, KIR 2DL2 a nepřítomností KIR 2DL3, nebo kombinací těchto faktorů. Možnou výhodou je, že se KIR2DL2 váže na C1 a C2 epitopy HLA – C s větší aviditou než KIR2DL3. Silnější avidita KIR2DL2, oproti KIR2DL3 edukuje NK buňky, které jsou opak účinnější v odstraňování reziduálních nádorových buněk.



Obrázek 7: Riziko relapsu a přežívání bez známek onemocnění u KIR B haplotypů. Převzato z Cooley et al, 2010.

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je stanovit reálnou proveditelnost výběru dle KIR genotypu nepříbuzných, srovnatelně HLA shodných dárců u pacientů s AML s více HLA shodnými nepříbuznými dárci. U všech těchto dárců pro daného pacienta bude provedena genotypizace KIR genů.

4 HYPOTÉZA

Výsledky transplantací u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) mohou být kromě HLA genů ovlivněny i dalšími geny, jak ukazuje několik nedávno publikovaných studií. Je zmiňován rostoucí počet důkazů vlivu genů KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) na ochranu před relapsem. Cooley et al. (2010) doložil, že u transplantovaných pacientů s AML má specifické složení motivů centromerních a telomerních B KIR haplotypů dárce protektivní vliv před relapsem a zvyšuje tak úspěšnost nepříbuzenské transplantace. HLA a KIR geny jsou lokalizovány na různých chromozomech (HLA 6. a KIR 19. chromozom) a jsou tedy segregovány nezávisle. Tudíž většina HLA shodných párů příjemce - nepříbuzný dárce má rozdílné KIR genotypy (nejsou KIR shodní). Logicky by tedy kompozice KIR genů (KIR genotyp) mohla teoreticky být kritériem výběru nepříbuzných dárců v případech, kdy existuje větší množství HLA shodných dárců, což jsou typicky pacienti s běžnými HLA fenotypy.

5 METODIKA

5.1 Metodika výběru jedinců, studovaná populace

Celkem jsem vyšetřila 160 nepříbuzných dárců pro 55 pacientů s AML. Volila jsem výběr takových nepříbuzných dárců u pacientů, kde bylo možné volit z několika 10/10 nebo 9/10 HLA shodných UD pro daného pacienta.

5.2 Izolace DNA z periferní krve pomocí paramagnetické separace

Celkem jsem analyzovala 160 dárců pro 55 pacientů. DNA vyšetřovaných dárců jsem získala izolací z plné krve v EDTA. Izolaci DNA jsem prováděla v izolačním automatu Maxwell®16 s pomocí komerčního kit Maxwell®16 DNA purification Kits firmy Promega. Principem metody je separace a uchycení DNA pomocí paramagnetických částic. Celý proces probíhá automatizovaně v uzavřeném systému a všechny potřebné reagenty (s výjimkou elučního pufru) jsou předem předplněny v kartuších, ty obsahují lyzační pufr, Magnesil® částice a 5 jamek s promývacím pufrem. Do jamky s lyzačním pufrem jsem napipetovala 400 µl vzorku plné krve a do poslední jamky s promývacím pufrem jsem vložila planžetu. Kartuše s planžetou jsem přendala do platformy přístroje, vložila jsem eluční zkumavky do příslušného místa platformy a do každé jsem napipetovala 300 µl elučního roztoku. Přístroj jsem nastavila na izolaci DNA z plné krve, zavřela jsem dvířka přístroje a tímto okamžikem začal přístroj s izolací DNA. Po ukončení izolace jsem eluční zkumavky přendala na magnetický stojánek, čím došlo k uchycení reziduálních magnetických částic na stěnu zkumavek. Z elučních zkumavek jsem přepipetovala izolovanou DNA do připravených a označených šroubovacích zkumavek. Zkontrolovala jsem kvalitu a koncentraci DNA. Výsledný objem izolované DNA 150 – 200 µl.

5.3 Kontrola kvality izolované DNA

Čistotu a koncentraci DNA jsem stanovovala spektrofotometrem *NanoDrop®ND-1000* (NanoDrop Technologies Inc., USA), je to spektrofotometr speciálně určený pro měření koncentrace a kvality nukleových kyselin. Nukleové kyseliny vzhledem k své molekulární struktuře absorbují světlo určité vlnové délky, přičemž DNA i RNA nejvíce absorbují světlo o vlnové délce 260 nanometrů. Mezi absorpcí světla a koncentrací DNA existuje lineární závislost a tohoto faktu jsem využila ke stanovení koncentrace nukleové kyseliny v roztoku. Hodnota optické hustoty měřené DNA při 260 nm mi tak umožnila kalkulaci koncentrace DNA v měřeném vzorku. Optická hustota 1 (OD = 1) totiž odpovídá přibližně koncentraci

dvouvláknové DNA 50 µg/ml, takže z naměřené optické denzity při 260 nm jsem mohla extrapolovat koncentraci DNA za pomoci tohoto vzorce:

$$\text{Koncentrace DNA} = A_{260} \times 50 \text{ µg/ml}$$

Poměr (ratio) mezi hodnotou 260 nm a 280 nm (OD_{260} / OD_{280}) mi pak poskytl údaj o čistotě nukleové kyseliny. „Čistá“ DNA měla tento poměr 1,8. Jestliže by byla DNA kontaminovaná proteiny, pak by došlo ke snížení hodnoty tohoto poměru, na druhé straně degradovaná DNA či kontaminace ribonukleovou kyselinou by dávala hodnoty vyšší než 1,8. K měření koncentrace a čistoty jsem použila 2 µl.

5.4 Vlastní DNA typizace - amplifikace

Vlastní genotypizaci jsem prováděla metodou PCR – SSP pomocí kitů od firmy OLERUP SSP™ (GENOVISION, Austria). PCR – SSP (Polymerase Chain Reaction- Sequence-Specific Primers) je metoda, při které dochází k rozlišení jednotlivých alel již přímo během PCR amplifikace. Princip PCR-SSP spočívá v tom, že kompletně nasedající primer (tedy oligonukleotid se sekvencí nukleotidů komplementární s vyšetřovaným úsekem DNA) je mnohem účinněji využíván při PCR než primer s jednou či více neshodami v sekvencích nukleotidů při jeho 3 - konci, především během několika prvních, kritických cyklů. Taq polymeráza nemá 3 - 5 exonukleázovou aktivitu a tedy primer s jednou neshodou („mismatch“) na 3 - konci nemůže být efektivně v reakci využit. Pokud dochází k PCR amplifikaci za striktních a jednoznačně definovaných PCR podmínek, u perfektně nasedajícího páru primerů dojde k amplifikaci, to jest pozitivnímu výsledku a tedy určení specifity reakce daného vzorku. Jestliže tedy specifita typizačního systému je již součástí PCR amplifikačního kroku, postamplifikační „zpracování“ vzorku může být omezeno na minimum. Nepřítomnost amplifikace může být dána i jinými (technickými) faktory, než pouhou nepřítomností dané alely či skupiny alel (chyby v pipetování, přítomnost PCR inhibitorů, nekvalitní DNA), proto je součástí každé PCR amplifikace kontrolní pár primerů. Tyto kontrolní primery amplifikují fragment genu pro lidský růstový hormon, který je přítomen ve všech lidských DNA a tak potvrzují úspěšnost PCR amplifikace. Určení alel pak spočívá pouze ve stanovení, zdali amplifikace proběhla či ne. Připravila jsem si příslušný primer mix (mikrozkumavky o objemu v množství odpovídajícím počtu PCR reakcí v kitu pro KIR). V laminárním boxu jsem je vložila do chladicí podložky a dále jsem pracovala výhradně na této podložce. Pro každý vzorek jsem si připravila PCR reakční směs, která obsahovala PCR master mix, vyšetřovanou DNA, Taq DNA polymerázu a destilovanou vodu.

PCR master-mix jsem před použitím promíchala a krátce zcentrifugovala. Taq DNA polymerázu jsme vyndala z mrazáku až těsně před jejím použitím a také jsem ji krátce zcentrifugovala. Abych vykompenzovala odchylky při pipetování a ztráty dané adhezí tekutiny na stěnu zkumavky, počítala jsem s více PCR reakcemi, než odpovídá skutečnému počtu provedených reakcí. Připravila jsem tedy reakční směs, která obsahovala 84 µl PCR master – mixu, 190 µl destilované vody, 2,2 µl Taq polymerázy (o koncentraci 5 U/µl) a 20 µl vyšetřovaného vzorku. Do každé mikrozukavky obsahující směs primerů jsem napipetovala 10 µl připravené PCR reakční směsi. Pevně jsem zkumavky uzavřela a vložila do termálního cyklu a spustila jsem amplifikační program, který je naprogramovaný na cykly uvedené v tabulce.

Tabulka 2: Schéma amplifikačního programu

1 x	94 °C	2 min
10 x	94 °C 65 °C	10 s 60 s
20 x	94 °C 61 °C 72 °C	10 s 50 s 30 s
1x	4 °C	neomezeně

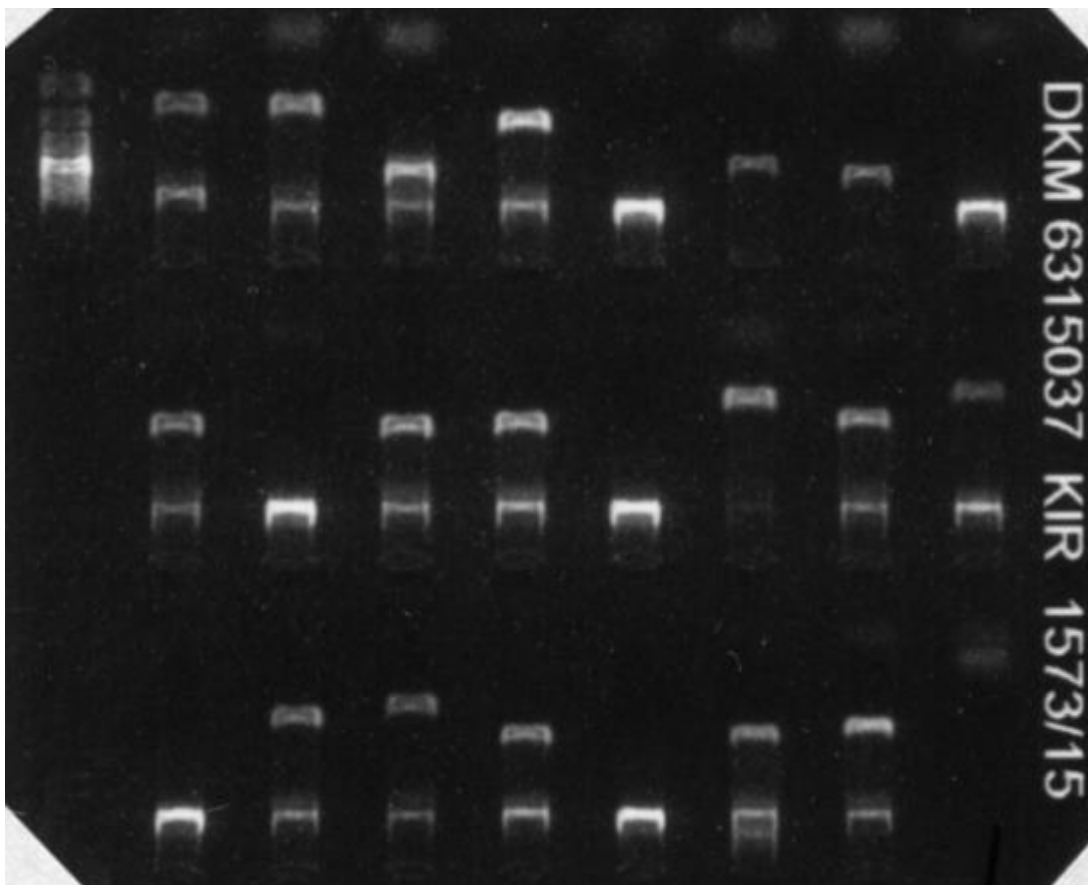
5.5 Vlastní DNA typizace - elektroforéza

DNA fragmenty amplifikované PCR jsem elektroforézou separovala na agarózovém gelu a vizualizovala jsem ethidiumbromidem (EtBr) pod UV světlem s možností fotodokumentace. Elektroforéza agarózového gelu umožňuje současně vizualizaci fragmentu interní kontroly a dává i relativní informaci o velikosti amplifikovaného fragmentu. Pro přípravu 1 x TAE pufru pro přípravu gelů a pufru pro elektroforézu jsem smíchala 20 ml koncentrovaného TAE (50x) s 980 ml destilované vody. Na nádoby jsem napsala datum, iniciály a použití (gely, vany). Gel jsem si připravila rozpuštěním 3 g agarózy v 150 ml 1xTAE povařením v mikrovlnné troubě. Přidala jsem 4 µl ethidiumbromidu na 100 ml roztoku a důkladně jsem promíchala. Ethidiumbromid je silný mutagen, při práci s ním jsem proto používala nitrilové rukavice. Nalila jsem tekutý gel do připravených elektroforetických „vaniček“ a vložila jsem hřebínky a nechala jsem vychladnout do úplného ztuhnutí. Odstranila jsem hřebínky a dala jsem PCR

amplikony do jamek. Ke každé jednotlivé řádce na gelu jsem napipetovala velikostní standard (měřítko). Vložila jsem gel opatrně do elektroforetické vany (aby nedošlo k vyplavení produktu) s 1xTAE pufrem. Spustila jsem elektroforézu na cca 15 minut (10 V/cm). Poté jsem vyndala gel z elektroforézy a vložila ho do video-dokumentačního zařízení a označila jsem číslem typizace a identifikací vzorku. Výsledek jsem zdokumentovala fotografií.

5.6 Interpretace, stanovení KIR genotypu

Fotografii jsem nalepila na pracovní list a podle specifických KIR interpretačních tabulek jsem stanovila genotyp a dle typu a počtu KIR genů stanovila přítomnost KIR haplotypu A a B, jakož i kombinace haplotypu (AA nebo Bx) a současně centromerické a telomerické motivy B-haplotypů. Všechny genotypy jsem zadala do „online“ kalkulátoru (http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html), který tyto dárce dle obsahu KIR B rozřadil do 3 skupin. Skupiny, „neutrální“, „lepší“, „nejlepší“, odkazují na příslušnou ochranu proti relapsu. Výsledek jsem zaznamenala do formuláře pro výsledky nepříbuzných dárců (viz obrázek).



Obrázek 8: Výsledná fotografie gelu, autorčina vlastní

Tabulka 3: Interpretační tabulka, <http://www.olerup-ssp.com/products/downloads/kir/?ProductNo=104.101-12u&LotNo=97X>

Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
KIR allele ¹																								
2DL1*001-025	1																							
2DL2*0010101-010 ²		2																						
2DL3*0010101-017			3																					
2DL4*00101-022				4																				
2DL5A*0010101-00105, 0050101-005010104, 01201-01202, 014-015					5	6																		
2DL5B*0020101-004, 00601-011, 01301-01303, 016					5		7																	
2DS1*001								8														21		
2DS1*0020101-008 ³								8															22	
2DS2*0010101-008									9															
2DS3*00101-005										10														
2DS4*0010101-00104, 01101-01102, 014, 015											11													
2DS4*0030101-0030104, 0040101-0040102, 0060101-0060102, 007-010, 012, 013												12												
2DS5*001-011													13											
3DL1*0010101-003, 0050101-009, 01501-018, 020, 022-035, 038, 040-044, 051-054, 057, 059-068, 073														14										
3DL1*00401-00403, 019, 021, 036, 037, 039, 056, 072														14										23
3DL2*0010101-062															15									
3DL3*00101-055																16								
3DS1*010-014, 045-049N, 050, 055, 058																	17							
2DP1*00101-010																		18						
3DP1*001-002, 004, 007, 0090101-00902 ³																			19				22	
3DP1*0030101-0030402, 005, 006, 008, 010																				19	20			
Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Neg. Control

Prospective Donor KIR Typings																
Prospective Patient ID																
CZ 4066D																
CEN genes					TEL genes					CEN or TEL genes			Framework genes			
2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DL1	2DS4	3DS1	2DS1	2DL5	2DS3	2DS5	3DL3	3DP1	2DL4	3DL2	
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
The Predicted KIR B-content group for prospective donor 1 is: Best.																
DKM 3841917																
CEN genes					TEL genes					CEN or TEL genes			Framework genes			
2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DL1	2DS4	3DS1	2DS1	2DL5	2DS3	2DS5	3DL3	3DP1	2DL4	3DL2	
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
The Predicted KIR B-content group for prospective donor 2 is: Better.																
DKM 3828662																
CEN genes					TEL genes					CEN or TEL genes			Framework genes			
2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DL1	2DS4	3DS1	2DS1	2DL5	2DS3	2DS5	3DL3	3DP1	2DL4	3DL2	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
The Predicted KIR B-content group for prospective donor 3 is: Neutral.																
DKM 3826504																
CEN genes					TEL genes					CEN or TEL genes			Framework genes			
2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DL1	2DS4	3DS1	2DS1	2DL5	2DS3	2DS5	3DL3	3DP1	2DL4	3DL2	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
The Predicted KIR B-content group for prospective donor 4 is: Neutral.																
Submit Further Haplotypes																

Obrázek 9: Příklad on-line kalkulátoru. Donor KIR B-contentgroupcalculator, http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html

Tabulka 4: Formulář pro zaznamenání výsledků nepříbuzných dárců

VÝSLEDEK HLA TYPIZACE ALTERNATIVNÍCH DÁRCŮ																																																																									
Patient: XXXXXXXXXX Dg: XXXXXXXXXX AML Pozn.:	RC: XXXXXXXXXX																																																																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: center;">Patient</th> <th style="text-align: center;">Dárc</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">NN01965</td> <td style="text-align: center;">CZ 40660</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">Datum ozn. vzorku: -</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A* 01:01</td> <td style="text-align: center;">A* 01:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B* 08:01 35:01</td> <td style="text-align: center;">B* 08:01 35:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">C* 04:01 07:01</td> <td style="text-align: center;">C* 04:01 07:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB1* 01:01 03:01</td> <td style="text-align: center;">DRB1* 01:01 03:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB3*</td> <td style="text-align: center;">DRB3*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB4*</td> <td style="text-align: center;">DRB4*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB5*</td> <td style="text-align: center;">DRB5*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DQB1* 02:01 05:01</td> <td style="text-align: center;">DQB1* 02:01 05:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DPB1*</td> <td style="text-align: center;">DPB1*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Věk/Pohlaví 35 F</td> <td style="text-align: center;">Věk/Pohlaví 40 M</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Váha/Grav 53 kg</td> <td style="text-align: center;">Váha/Grav 92 kg</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">KS/CNV 0 POS POS</td> <td style="text-align: center;">KS/CNV A POS POS</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Kir genotyp</td> <td style="text-align: center;">Kir genotyp BB</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Kir B content</td> <td style="text-align: center;">Kir B content BEST</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Pozn.</td> <td style="text-align: center;">Pozn.</td> </tr> </table>	Patient	Dárc	NN01965	CZ 40660	Datum ozn. vzorku: -		A* 01:01	A* 01:01	B* 08:01 35:01	B* 08:01 35:01	C* 04:01 07:01	C* 04:01 07:01	DRB1* 01:01 03:01	DRB1* 01:01 03:01	DRB3*	DRB3*	DRB4*	DRB4*	DRB5*	DRB5*	DQB1* 02:01 05:01	DQB1* 02:01 05:01	DPB1*	DPB1*	Věk/Pohlaví 35 F	Věk/Pohlaví 40 M	Váha/Grav 53 kg	Váha/Grav 92 kg	KS/CNV 0 POS POS	KS/CNV A POS POS	Kir genotyp	Kir genotyp BB	Kir B content	Kir B content BEST	Pozn.	Pozn.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: center;">Dárc</th> <th style="text-align: center;">Dárc</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DKM 3841917</td> <td style="text-align: center;">DKM 3828662</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">Datum vys. vzorku: 23.03.2012</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A* 01:01</td> <td style="text-align: center;">A* 01:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B* 08:01 35:01</td> <td style="text-align: center;">B* 08:01 35:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">C* 04:01 07:01</td> <td style="text-align: center;">C* 04:01 07:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB1* 01:01 03:01</td> <td style="text-align: center;">DRB1* 01:01 03:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB3*</td> <td style="text-align: center;">DRB3*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB4*</td> <td style="text-align: center;">DRB4*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB5*</td> <td style="text-align: center;">DRB5*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DQB1* 02:01 05:01</td> <td style="text-align: center;">DQB1* 02:01 05:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DPB1*</td> <td style="text-align: center;">DPB1*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Věk/Pohlaví 23 M</td> <td style="text-align: center;">Věk/Pohlaví 22 M</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Váha/Grav 94 kg</td> <td style="text-align: center;">Váha/Grav 74 kg</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">KS/CNV 0 POS NEG</td> <td style="text-align: center;">KS/CNV 0 POS POS</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Kir genotyp</td> <td style="text-align: center;">Kir genotyp AB</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Kir B content</td> <td style="text-align: center;">Kir B content BETTER</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Pozn.</td> <td style="text-align: center;">Pozn.</td> </tr> </table>	Dárc	Dárc	DKM 3841917	DKM 3828662	Datum vys. vzorku: 23.03.2012		A* 01:01	A* 01:01	B* 08:01 35:01	B* 08:01 35:01	C* 04:01 07:01	C* 04:01 07:01	DRB1* 01:01 03:01	DRB1* 01:01 03:01	DRB3*	DRB3*	DRB4*	DRB4*	DRB5*	DRB5*	DQB1* 02:01 05:01	DQB1* 02:01 05:01	DPB1*	DPB1*	Věk/Pohlaví 23 M	Věk/Pohlaví 22 M	Váha/Grav 94 kg	Váha/Grav 74 kg	KS/CNV 0 POS NEG	KS/CNV 0 POS POS	Kir genotyp	Kir genotyp AB	Kir B content	Kir B content BETTER	Pozn.	Pozn.
Patient	Dárc																																																																								
NN01965	CZ 40660																																																																								
Datum ozn. vzorku: -																																																																									
A* 01:01	A* 01:01																																																																								
B* 08:01 35:01	B* 08:01 35:01																																																																								
C* 04:01 07:01	C* 04:01 07:01																																																																								
DRB1* 01:01 03:01	DRB1* 01:01 03:01																																																																								
DRB3*	DRB3*																																																																								
DRB4*	DRB4*																																																																								
DRB5*	DRB5*																																																																								
DQB1* 02:01 05:01	DQB1* 02:01 05:01																																																																								
DPB1*	DPB1*																																																																								
Věk/Pohlaví 35 F	Věk/Pohlaví 40 M																																																																								
Váha/Grav 53 kg	Váha/Grav 92 kg																																																																								
KS/CNV 0 POS POS	KS/CNV A POS POS																																																																								
Kir genotyp	Kir genotyp BB																																																																								
Kir B content	Kir B content BEST																																																																								
Pozn.	Pozn.																																																																								
Dárc	Dárc																																																																								
DKM 3841917	DKM 3828662																																																																								
Datum vys. vzorku: 23.03.2012																																																																									
A* 01:01	A* 01:01																																																																								
B* 08:01 35:01	B* 08:01 35:01																																																																								
C* 04:01 07:01	C* 04:01 07:01																																																																								
DRB1* 01:01 03:01	DRB1* 01:01 03:01																																																																								
DRB3*	DRB3*																																																																								
DRB4*	DRB4*																																																																								
DRB5*	DRB5*																																																																								
DQB1* 02:01 05:01	DQB1* 02:01 05:01																																																																								
DPB1*	DPB1*																																																																								
Věk/Pohlaví 23 M	Věk/Pohlaví 22 M																																																																								
Váha/Grav 94 kg	Váha/Grav 74 kg																																																																								
KS/CNV 0 POS NEG	KS/CNV 0 POS POS																																																																								
Kir genotyp	Kir genotyp AB																																																																								
Kir B content	Kir B content BETTER																																																																								
Pozn.	Pozn.																																																																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: center;">Dárc</th> <th style="text-align: center;">Dárc</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DKM 3826504</td> <td style="text-align: center;">DKM 3826504</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">Datum vys. vzorku: 02.04.2012</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A* 01:01</td> <td style="text-align: center;">A* 01:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B* 08:01 35:01</td> <td style="text-align: center;">B* 08:01 35:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">C* 04:01 07:01</td> <td style="text-align: center;">C* 04:01 07:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB1* 01:01 03:01</td> <td style="text-align: center;">DRB1* 01:01 03:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB3*</td> <td style="text-align: center;">DRB3*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB4*</td> <td style="text-align: center;">DRB4*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB5*</td> <td style="text-align: center;">DRB5*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DQB1* 02:01 05:01</td> <td style="text-align: center;">DQB1* 02:01 05:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DPB1*</td> <td style="text-align: center;">DPB1*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Věk/Pohlaví 21 M</td> <td style="text-align: center;">Věk/Pohlaví 21 M</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Váha/Grav 90</td> <td style="text-align: center;">Váha/Grav 90</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">KS/CNV 0 POS NEG</td> <td style="text-align: center;">KS/CNV 0 POS NEG</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Kir genotyp</td> <td style="text-align: center;">Kir genotyp AA</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Kir B content</td> <td style="text-align: center;">Kir B content NEUTRAL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Pozn.</td> <td style="text-align: center;">Pozn.</td> </tr> </table>	Dárc	Dárc	DKM 3826504	DKM 3826504	Datum vys. vzorku: 02.04.2012		A* 01:01	A* 01:01	B* 08:01 35:01	B* 08:01 35:01	C* 04:01 07:01	C* 04:01 07:01	DRB1* 01:01 03:01	DRB1* 01:01 03:01	DRB3*	DRB3*	DRB4*	DRB4*	DRB5*	DRB5*	DQB1* 02:01 05:01	DQB1* 02:01 05:01	DPB1*	DPB1*	Věk/Pohlaví 21 M	Věk/Pohlaví 21 M	Váha/Grav 90	Váha/Grav 90	KS/CNV 0 POS NEG	KS/CNV 0 POS NEG	Kir genotyp	Kir genotyp AA	Kir B content	Kir B content NEUTRAL	Pozn.	Pozn.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: center;">Dárc</th> <th style="text-align: center;">Dárc</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DKM 3826504</td> <td style="text-align: center;">DKM 3826504</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">Datum vys. vzorku: 02.04.2012</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A* 01:01</td> <td style="text-align: center;">A* 01:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B* 08:01 35:01</td> <td style="text-align: center;">B* 08:01 35:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">C* 04:01 07:01</td> <td style="text-align: center;">C* 04:01 07:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB1* 01:01 03:01</td> <td style="text-align: center;">DRB1* 01:01 03:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB3*</td> <td style="text-align: center;">DRB3*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB4*</td> <td style="text-align: center;">DRB4*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DRB5*</td> <td style="text-align: center;">DRB5*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DQB1* 02:01 05:01</td> <td style="text-align: center;">DQB1* 02:01 05:01</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">DPB1*</td> <td style="text-align: center;">DPB1*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Věk/Pohlaví 21 M</td> <td style="text-align: center;">Věk/Pohlaví 21 M</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Váha/Grav 90</td> <td style="text-align: center;">Váha/Grav 90</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">KS/CNV 0 POS NEG</td> <td style="text-align: center;">KS/CNV 0 POS NEG</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Kir genotyp</td> <td style="text-align: center;">Kir genotyp AA</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Kir B content</td> <td style="text-align: center;">Kir B content NEUTRAL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Pozn.</td> <td style="text-align: center;">Pozn.</td> </tr> </table>	Dárc	Dárc	DKM 3826504	DKM 3826504	Datum vys. vzorku: 02.04.2012		A* 01:01	A* 01:01	B* 08:01 35:01	B* 08:01 35:01	C* 04:01 07:01	C* 04:01 07:01	DRB1* 01:01 03:01	DRB1* 01:01 03:01	DRB3*	DRB3*	DRB4*	DRB4*	DRB5*	DRB5*	DQB1* 02:01 05:01	DQB1* 02:01 05:01	DPB1*	DPB1*	Věk/Pohlaví 21 M	Věk/Pohlaví 21 M	Váha/Grav 90	Váha/Grav 90	KS/CNV 0 POS NEG	KS/CNV 0 POS NEG	Kir genotyp	Kir genotyp AA	Kir B content	Kir B content NEUTRAL	Pozn.	Pozn.
Dárc	Dárc																																																																								
DKM 3826504	DKM 3826504																																																																								
Datum vys. vzorku: 02.04.2012																																																																									
A* 01:01	A* 01:01																																																																								
B* 08:01 35:01	B* 08:01 35:01																																																																								
C* 04:01 07:01	C* 04:01 07:01																																																																								
DRB1* 01:01 03:01	DRB1* 01:01 03:01																																																																								
DRB3*	DRB3*																																																																								
DRB4*	DRB4*																																																																								
DRB5*	DRB5*																																																																								
DQB1* 02:01 05:01	DQB1* 02:01 05:01																																																																								
DPB1*	DPB1*																																																																								
Věk/Pohlaví 21 M	Věk/Pohlaví 21 M																																																																								
Váha/Grav 90	Váha/Grav 90																																																																								
KS/CNV 0 POS NEG	KS/CNV 0 POS NEG																																																																								
Kir genotyp	Kir genotyp AA																																																																								
Kir B content	Kir B content NEUTRAL																																																																								
Pozn.	Pozn.																																																																								
Dárc	Dárc																																																																								
DKM 3826504	DKM 3826504																																																																								
Datum vys. vzorku: 02.04.2012																																																																									
A* 01:01	A* 01:01																																																																								
B* 08:01 35:01	B* 08:01 35:01																																																																								
C* 04:01 07:01	C* 04:01 07:01																																																																								
DRB1* 01:01 03:01	DRB1* 01:01 03:01																																																																								
DRB3*	DRB3*																																																																								
DRB4*	DRB4*																																																																								
DRB5*	DRB5*																																																																								
DQB1* 02:01 05:01	DQB1* 02:01 05:01																																																																								
DPB1*	DPB1*																																																																								
Věk/Pohlaví 21 M	Věk/Pohlaví 21 M																																																																								
Váha/Grav 90	Váha/Grav 90																																																																								
KS/CNV 0 POS NEG	KS/CNV 0 POS NEG																																																																								
Kir genotyp	Kir genotyp AA																																																																								
Kir B content	Kir B content NEUTRAL																																																																								
Pozn.	Pozn.																																																																								

6 VÝSLEDKY

Genová typizace KIR při hledání dárců odhalila 43 dárců s AA haplotypy, 90 dárců s AB haplotypy a 27 dárců s BB haplotypy. Po přiřazení stavů přítomnosti KIR B bylo objeveno 107 „neutrálních“ dárců, 35 „lepších“ dárců a 18 „nejlepších“ dárců. U 40 (~73%) pacientů byli k dispozici dárci s různými stavy přítomnosti KIR B. Tito pacienti představují skupinu, kde by mohlo být použito výběrové kritérium přítomnosti KIR B genu u dárce. Zjistila jsem, že pro 22 (40%) pacientů možné bylo vybírat dárce mezi skupinami „neutrálních“ a „lepších“ dárců. V patnácti případech bylo možné vybírat dárce jen z „neutrální“ skupiny. U třinácti pacientů se mohlo vybírat mezi dárci ze skupiny „neutrální“ a „nejlepší“. Pro 3 pacienty byl možný výběr ze skupiny „lepší“ a „nejlepší“ a pouze 2 pacienti měli na výběr ze všech tří skupin dárců.

Tabulka 5: Výsledky typizace a přiřazení k jednotlivým KIR genotypům

celkem pacientů			55		
celkem dárců			160		
KIR genotyp	počet dárců	%	KIR B subtyp	počet dárců	%
AA	43	26,9%	NEUTRAL	43	100,0%
Bx	117	73,1%	NEUTRAL	64	54,7%
			BETTER	35	29,9%
			BEST	18	15,4%

Tabulka 6: Možnosti výběru dárců pro pacienty podle výběrového kritéria přítomnosti KIR B genu u dárce

počet pacientů		skupina		
		neutral	better	best
22	40,0%			
2	3,6%			
3	5,5%			
13	23,6%			
15	27,3%			

7 DISKUZE

Ve studii jsem určila výskyt KIR haplotypu AA, AB a BB u 160 dárců pro 55 pacientů s AML a dále jsem sledovala po přiřazení stavů ke KIR B subtypu rozložení „neutrálních“, „lepších“ a nejlepších“ dárců. Potvrdila jsem, že KIR geny se segregují nezávisle na HLA genech. Kompozice genotypů KIR a KIR haplotypu obecně souhlasila s publikovanými daty u indoevropské („kavkazoidní“) populace (Cooley et al, 2009), kdy cca 1/3 osob v našem souboru má pouze AA genotyp, zbylé 2/3 pak genotyp Bx. Dále jsem ověřila, že selekce dle kompozice KIR genů je v reálné klinické praxi dobře a snadno aplikovatelná. U více než 70% pacientů s AML a s více HLA shodnými dárci může být provedená sekundární selekce dárce dle KIR genotypů. Toto zjištění je poměrně zásadním poznatkem, který dosud v ČR nebyl zkoumán a publikován a má i klinicky relevantní důsledky. Jestliže u AML po transplantaci je incidence relapsu v závislosti na subtypu 15-40%, pak dle citované práce Cooley et al. by výběr dárce s příznivým KIR genotypem („best“) mohl snížit riziko relapsu o cca 20%. Relativně nenáročnou a levnou KIR genotypizací HLA shodných dárců bychom tedy celkem zásadně zlepšily prognózu nemocných především s rizikovou AML. V současnosti je tento postup – tedy sekundární selekce dle KIR genotypů již prospektivně testován velkou multicentrickou studií probíhající v USA (výsledky dosud nebyly zveřejněny). V naší laboratoři se KIR genotypizace a stanovení kompozice centromerických genů staly rutinním vyšetřením u všech dárců pro pacienty s AML a více shodnými dárci, která navíc nevede k žádnému zdržení při identifikaci dárce, neboť se dělá v podstatě souběžně s HLA typizací.

Na základě našich výsledků je tato selekce i reálně klinicky prováděna na 3 transplantačních centrech ČR (Plzeň, Hradec Králové, Olomouc), pro které naše laboratoř dárce genotypizuje (osobní komunikace). Ověření literárních dat uvádějících, že přítomnost centromerických KIR genů u nepříbuzného dárce příznivě ovlivňuje přežití po transplantaci krvetvorných buněk díky nižšímu riziku relapsu (Cooley et al, 2010) zatím nebylo možné provést pro krátkou dobu sledování, relativně malý soubor a obtížně získatelná data z klinik.

8 ZÁVĚR

Potvrdila jsem, že dodatečný výběr HLA shodného nepříbuzného dárce na základě obsahu KIR B genů je proveditelný. Výběr takového dárce může zlepšit transplantační výsledky u pacientů s AML a KIR genotypizaci je tedy vhodné rutinně provádět u všech vyšetřovaných potenciálních dárců pro pacienty s AML.

9 SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. ADAM Z., KREJČÍ M., VORLÍČEK J. *Hematologie - Přehled maligních hematologických nemocí*. Grada, Praha, 2008. ISBN 978-80-247-2502-4, s. 29-38.
2. APPELBAUM F. R., FORMAN S. J., NEGRIN R. S., BLUME K. G. *Hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia*. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation: Stem Cell Transplantation. 4th ed. Malden, MA: Blackwell Publishing; 2009, s. 761.
3. CALIGIURI M. A. *Human natural killer cells*. Blood. 2008, č. 112, s. 461–469.
4. CAMPELL R. D., TROWSDALE J. *A map of the major histocompatibility complex*. Immunol Today 1997, č. 18, s. 43.
5. COLONNA M., BROOKS E. G., FALCO M., FERRARA G. B., STROMINGER J. L. *Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C*. Science 1993, č. 260, s. 1121-4.
6. COOK M., BRIGGS D., CRADDOCK C., MAHENDRA P., MILLIGAN D., FEGAN C., DARBYSHIRE P., LAWSON S., BOXALL E., MOSS P. *Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation*. Blood 2006, č. 107, s. 1230-1232.
7. COOLEY S., TRACHTENBERG E., BERGEMANN T.L., SAETEUM K., KLEIN J., LE C. T., MARSH S. G. E., GUETHLEIN L.A., PARHAM P., MILLER J.S., WEISDORF D. J. *Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia*. Blood, 2009, č. 113, s.726-732.
8. COOLEY S., WEISDORF D. J., GUETHLEIN L. A., KLEIN J. P., WANG T., LE C. J., MARSH SGJ, GERAGHTY D., SPELLMAN S., HAAGENSON M. D., LADNER M., TRACHTENBERG E., PARHAM P., MILLER J. S. *Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia*. Blood, 2010, č. 116, s. 2411–2419.
9. ČEŠKA R., DÍTĚ P., ŠTULC T., TESARŮ V. *Interna*. Triton, Praha, 2010. ISBN 978-80-7387-423-0, s. 684.
10. DÖHNER H., ESTEY E. H., AMADORI S. et al. *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net*. Blood, 2010, č. 115, s. 453-474.
11. ESTEY E., DÖHNER H. *Acute myeloid leukemia*. Lancet, 2006, č. 368, s. 1894-1907.

12. FARAG S. S., FEHNIGER T. A., RUGGERI L., VELARDI A. et al. *Natural killer cells receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect*. Blood, 2002, č. 100, s. 193.
13. FLOMENBERG N., BAXETER-LOWE L. A., CONFER D., et al. *Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome*. Blood, 2004, č. 104, s. 1923-1930.
14. GASSER S., RAULET D.H. *Activation and self-tolerance of natural killer cells*. Immunol Rev, 2006, č. 214, s. 130.
15. GUERTHLEIN L. A., OLDER AGUILAR A. M., ABI-RACHED L., PARHAM P. *Evolution of killer cell Ig-like receptor (KIR) genes: definition of an orangutan KIR haplotype reveals expansion of lineage III KIR associated with the emergence of MHC-C*. J Immunol, 2007, č. 179, s. 491–504.
16. HOLLENBACH J. A., MEENAGH A., SLEATOR C., ALAEZ C, BENGOCHE M., CANOSSI A., CONTRERAS G. et al. *Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA*. Tissue Antigens, 2010, č. 76, s. 9-17.
17. HOŘEJŠÍ V., BARTUŇKOVÁ J., BRDIČKA T., ŠPÍŠEK R. *Základy imunologie*, 4. vydání, Triton, Praha, 2013, ISBN 978 – 7387 – 713 – 2, s. 154.
18. HSU K, C., CHIDA S., GERAGHTY D. E., DUPONT B. *The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism*. Immunological Review, 2002, č. 190, s. 40-52.
19. HSU K., C., KEEVER-TAYLOR C., A., WILTON A., PINTO C., HELLER G., ARKUN K., O'REILLY R. J., HOROWITZ M. M., DUPONT B. *Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes*. Blood, 2005, č. 105, s. 4878 – 4884.
20. JEFFREYS A. J., HOLLOWAY J. K., KAUPPI L., MAY C. A., NEUMANN R., SLINGSBY M. T. et al. *Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004, č. 359, s. 141-152.

21. KARRE K., LJUNGGREN H. G., PIONTEK G., KIESSLING R. *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy.* Nature, 1986, č. 319, s. 675–8.
22. KHAKOO S. I., RAJALINGAM R., SHUM B. P. et al. *Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans.* Immunity, 2000, č. 12, s. 687–98.
23. MARSH S. G. E., PARHAM P., DUPONT B., GERAGHTY D. E., TROWSDALE J., MIDDLETON D., VILCHES C., CARRINGTON M., WITT C., GUETHLEIN L. A., SHILLING H., GARCIA C. A., HSU K. C., WAIN H. *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Nomenclature Report, 2002.* Tissue Antigens, 2003, č. 62, s. 79-86.
24. MESSAOUDI I., GUEVARA PATINO J. A., STALL R., LE MAOUKL J., NIKOLICH-ZUGICH J. *Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity , and diversity in immune defense.* Science, 2002, č. 298, s. 1797-1800.
25. MIDDLETON D., CURRAN M., MAXWELL I. *Natural killer cells and their receptors.* Transplant Immunol, 2002, č. 10, s. 147-64.
26. MIDDLETON D., MENCHACA L., ROOD H., KOMEROFSKY R. *New Allele Frequency Database: <http://www.allelefrequencies.net>.* Tissue Antigens, 2003, č. 61, s. 403-407.
27. MILLER J. S., COOLEY S., PARHAM P., FARAG S. S., VERNERIS M. R. MCQUENN K. L., GUETHLEIN L. A., TRACHTENBERG E. A., HAAGENSON M., HOROWITZ M. M., KLEIN J. P., WEISDORF D. J. *Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated allogeneic HCT.* Blood, 2007, č. 109, s. 5058-5061.
28. MORETTA L., MORETTA A. *Killer immunoglobulin-like receptors.* Current Opinion in Immunology, 2004, č. 16, s. 626-33.
29. NEEFJES J. J., MOMBURG F. *Cell biology of antigen presentation.* Current Opinion in Immunology, 1993, č. 5, s. 27-35.
30. PARHAM P. *MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival.* Nature Reviews Immunology, 2005, č. 5, s. 201.
31. RESTIFO N. P., KAWAKAMI Y., MARINCOLA F., SHAMAMIAN P., TAGGARSE A., ESQUIVEL F. et al. *Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenetherapy and the cell biology of major*

- histocompatibility complex class I*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1993, č. 14, s. 182–90.
32. ROBERTSON M. J., RITZ J. *Biology and clinical relevance of human natural killer cells*. Blood, 1990, č. 76, s. 2421.
33. ROBINSON J., WALLER M. J., STOEHR P., MARSH S. G. E. *IPD – the Immuno Polymorphism Database*. Nucleic Acids Research, 2005, č. 331, s. 523-526.
34. SINGLE R. M., MARTIN M. P., GAO X. et al. *Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA*. Nature Genetics, 2007, č. 39, s. 1113.
35. SOUČEK M., ŠPILAR J., VORLÍČEK J. *Vnitřní lékařství* 1. díl. Grada, Praha, 2011. ISBN 978-80-247-2-1, s. 626 - 629.
36. THORSBY E. *MHC structure and function*. Transplant Proc, 1999, č. 31, s. 713.
37. TRATHERNE J. A. *Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies*. Int J Immunogenetics, 2008, č. 35, s. 179-192.
38. TROWSDALE J. *Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes*. Immunity, 2001, č. 15, s. 363–74.
39. UHRBERG M., VALIANTE N. M., SHUM B. P., SHILLING H. G., LIENERT-WEIDENBACH K., ARNETT K. L., D'ANDREA A., PHILLIPS J. H., LANIER L. L., PARHAM P. *Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes*. Immunity, 1997, č. 7, s. 753-63.
40. VILCHES C., PARHAM P. *KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2002, č. 20, s. 217–51.

POUŽITÉ ZKRATKY

aloTKB – alogenní transplantace krvetvorných buněk

AML – akutní myeloidní leukémie

APC – antigen-presenting cell (buňka předkládající antigen)

CD – cluster designation

DLA – dog leukocyte antigen (leukocytární antigen u psů)

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

GF – frekvence genů pro daný znak

HCT – haematopoietic cell transplantation (transplantace krvetvorných buněk)

HLA – human leucocyte antigens (tkáňové znaky na povrchu bílých krvinek)

KIR – killer immunoglobulin-like receptors (receptory podobné imunoglobulinům na povrchu NK buněk)

MHC – major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)

NK – natural killers (buňky imunitního systému se schopností přímé likvidace)

PCR-SBT – polymerázová řetězová reakce s využitím metodiky přímé sekvenace (sequence based typing)

PCR-SSP – polymerázová řetězová reakce s využitím metodiky sekvenčně specifických primerů

TCR – T-cell receptor (receptor T-lymfocytů pro antigen)

TNF – tumor necrosis factor (tumor nekrotizující faktor)

UD – unrelated donor (nepříbuzný dárce)