

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Imunologie



Mgr. Ondřej Pelák

**Specifická protivirová imunita u imunokompromitovaných
pacientů, především po transplantaci kostní dřeně**

**Specific anti-viral immunity in immunocompromised
patients, not only after bone marrow transplantation**

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Tomáš Kalina, PhD.

Praha, 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 4.5.2020

ONDŘEJ PELÁK

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval zejména svému školiteli doc. MUDr. Tomáši Kalinovi, PhD. za vedení mé dizertační práce a za cenné rady týkající se nejen mého vědeckého působení. Také děkuji doc. MUDr. Ondřeji Hrušákovi, PhD. za možnost pracovat v laboratořích CLIP. Dále děkuji RNDr. Martině Váškové, PhD., MUDr. Michaele Novákové, PhD., Mgr. Daniele Kužílkové, PhD., MUDr. Lucii Slámové PhD., RNDr. Karlovi Fišerovi, PhD. a Mgr. Kateřině Rejlové, PhD. za vytvoření podnětného a motivačního prostředí, které mi pomohlo dosáhnout kvalitních vědeckých výsledků, a všem ostatním kolegům za ochotu účastnit se mého výzkumu šlechetným darováním cenných vzorků krve. Mé poděkování pak patří také Danovi Thurnerovi a Pavlovi Semerákovi, kteří mi poskytli neocenitelné rady nejen při práci v laboratoři.

Na závěr bych rád poděkoval Luce za její trpělivost, podporu a teplé večere po celou dobu mého studia a Báře a Matějovi za jejich neustále dobrou náladu, která mi byla vždy povzbuzením a motivací.

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

PELÁK, Ondřej. *Specifická protivirová imunita u imunokompromitovaných pacientů, především po transplantaci kostní dřeně. [Specific anti-viral immunity in immunocompromised patients, not only after bone marrow transplantation]*. Praha, 2020. 76 s, 5 příloh. Dizertační práce (PhD.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie. Vedoucí závěrečné práce doc. MUDr. Tomáš Kalina, PhD.

OBSAH

Prohlášení

Poděkování

Identifikační záznam

<i>Seznam použitých zkratek</i>	1
<i>Abstrakt</i>	2
<i>Summary</i>	3
<i>Předmluva</i>	4
1. Úvod	6
1.1. Význam porozumění adaptivnímu imunitnímu systému	6
1.2. Obnova protivirové imunity po transplantaci hematopoetických buněk	6
1.3. Důležitost rozlišení na úrovni jednotlivých buněk	8
1.4. Vysoká variabilita imunitního systému	10
1.4.1. Variabilita T lymfocytů	10
1.5. Moderní možnosti sledování imunitního systému	14
1.5.1. Fluorescenční cytometrie	15
1.5.2. Hmotnostní cytometrie	19
1.5.3. Sekvenování na úrovni jednotlivých buněk	22
1.6. Analýza dat	24
1.7. Mnohparametrické metody umožňující rozlišení na úrovni jednotlivých buněk v klinické praxi	25
1.7.1. Potřeba personalizované medicíny	29
2. Cíle práce	31
3. Materiál a metody	32
3.1. Materiál	32
3.2. Detekce fenotypových a funkčních profilů lymfocytů	32
3.3. Přímá a proliferační detekce CMV a alo specifických T lymfocytů	32
3.4. Izolace virus a alo specifických T lymfocytů	33
3.5. Extrakce DNA a sekvenování nové generace	34
3.6. Vliv binderů na proliferaci Th17 buněk	34
3.7. Protilátky pro průtokovou a hmotnostní cytometrii	34
3.8. Statistické a nesupervidované analýzy dat	34
4. Výsledky	35
4.1. Identifikovat takovou populaci T lymfocytů, která je zodpovědná za kontrolu CMV reaktivace u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk a zároveň určit její funkční profil.	35
4.2. Najít takové funkční znaky T lymfocytů, které by mohly být použity při klinickém rozhodování u pacientů s CMV reaktivacemi.	37
4.3. Určit fenotypové a funkční charakteristiky buněk vhodných pro adoptivní přenos u pacientů s častými CMV reaktivacemi.	39
4.4. Rozpoznat klony T lymfocytů, které jsou zodpovědné za odhojení transplantovaných ledvin a které zprostředkovávají ochranu proti CMV.	42
4.5. Zmapovat výskyt zkříženě-reaktivních T lymfocytů u pacientů po transplantaci ledvin.	44
4.6. Zavést metodu hmotnostní cytometrie s ohledem na získání co největšího množství informace o buněčném a funkčním složení periferní krve	46
4.7. <i>Ex vivo</i> otestovat funkci a vliv vysoce afinitních binderů IL-23p19 a IL-23R na Th17 lymfocytech.	52
5. Diskuze a závěr	54
6. Seznam publikací	58
7. Ostatní publikace autora	59
8. Seznam použité literatury	60
9. Seznam příloh	76

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACT	Adoptivní transfer antigen specifických T buněk
ADV	Adenovirus
AML	Akutní myeloidní leukémie
BCR	B buněčný receptor
CMV	Cytomegalovirus
CTLA-4	Cytotoxický T lymfocytární antigen 4
EBV	Virus Epstein-Barrové
FACS	Fluorescencí aktivovaný buněčný sorter
Foxp3	Hlavní regulační protein ve vývoji a funkci CD4+ T regulačních buněk
GMP	Správná výrobní praxe
GvHD	Reakce štěpu proti hostiteli
HSA	Lidský sérový albumin
HSC	Hematopoetická kmenová buňka
HSCT	Transplantace hematopoetických buněk
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICS	Intracelulární značení cytokinů
IFN γ	Interferon γ
IGH	Těžká podjednotka imunoglobulinu
IgM	Imunoglobulin třídy M
IL-17	Interleukin 17
IL-2	Interleukin 2
IL-23p19	Podjednotka p19 interleukinu 23
IL-23R	Receptor interleukinu 23
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MLR	Směsná lymfocytární reakce
PBMC	Periferní mononukleární buňky
PD1	Receptor programované buněčné smrti 1 (CD279)
ROR γ t	Transkripční faktor exprimovaný hlavně Th17 buňkami
SCID	Těžký kombinovaný imunodeficit
scRNA/DNA-seq	RNA/DNA sekvenování na úrovni jednotlivých buněk
TCM	Centrální paměťové T lymfocyty
TCR	T buněčný receptor
TCR α/β	α/β podjednotka T buněčného receptoru
TEM	Efektorově paměťové T lymfocyty
Tfh	Folikulární pomocné T buňky
TNF	Faktor nádorové nekrózy
TNF α	Faktor nádorové nekrózy α
Treg	Regulační CD4+ T buňky
TRM	Tkáňově rezidentní paměťové T buňky
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
V(D)J	Variabilní, (diverzifikované) a spojující DNA segmenty B a T buněčných receptorů
WGS	Sekvenování celého genomu

ABSTRAKT

Virové reaktivace po transplantaci hematopoetických buněk významně přispívají k morbiditě a mortalitě. Včasná rekonstituce funkční T buněčné složky imunitního systému hraje při kontrole těchto virových reaktivací klíčovou roli. V předkládané dizertační práci identifikujeme několik funkčních populací T lymfocytů, jejichž přítomnost v době virové reaktivace vede k jejímu rychlému vyřešení. Výskyt některých těchto populací může být dokonce použit pro predikci incidence virové reaktivace. Léčba kortikoidy pro potlačení reakce štěpu proti hostiteli se v našem modelu dále ukázala jako významný negativní prediktor incidence virové reaktivace. Pro pacienty s dlouhotrvajícími virovými komplikacemi nabízíme adoptivní buněčnou terapii virus specifickými T lymfocyty, kdy identifikujeme vhodné dárce pomocí dvou různých metod. Virové reaktivace jsou komplikací i u pacientů po orgánových transplantacích. V této dizertační práci se nám podařilo nalézt spojitost mezi virus a alo specifickými T lymfocyty. Identifikovali jsme několik klonů T lymfocytů, které vykazují zkříženou reaktivitu a mohou tak být zodpovědné za odhojení transplantovaných ledvin, pokud zároveň dochází k T buněčné odpovědi na reaktivaci viru.

Abychom mohli obsáhnout co nejširší spektrum populací obnovujícího se imunitního systému, je potřeba zkoumat imunitní odpovědi za použití metod s vysokým množstvím parametrů na úrovni jednotlivých buněk. Za tímto účelem jsme zavedli metodu hmotnostní cytometrie spolu s novou metodou izolace buněk přes CD81+ imunoafinitní chromatografii.

Získané zkušenosti z funkčního testování T lymfocytů v komplexním kontextu ostatních lymfocytárních populací jsme také zúročili při studiu potenciálních terapeutických vlivů nových vysoce afinitních binderů. Za použití funkčních testů jsme prokázali jejich významný imunosupresivní efekt na proliferaci Th17 lymfocytů, který umožňuje jejich další terapeutické použití.

SUMMARY

Viral reactivations after hematopoietic cell transplantation contribute to significant morbidity and mortality. Timely immune reconstitution of functional T cell immunity is crucial in controlling these viral reactivations. In this thesis we were able to identify several functional T cell populations, which are responsible for fast resolution of viral reactivation. Appearance of some of these populations may be even used for prediction of the occurrence of viral reactivation. On the other hand, the administration of corticoids due to the treatment of graft versus host disease contributes as significant negative predictor to viral reactivation incidence. We are also offering an option of adoptively transferred virus specific T cells for patients suffering from prolonged virus complications, through identification of suitable donors by two different methods.

Viral reactivations cause complication also in patients who underwent the solid organ transplantation. In this thesis we have found the connection between allo and virus specific T cells. We have successfully identified several cross-reactive T cell clones which have responded to both allo and viral stimulation. Further it seems that these clones may play an important role in rejection of transplanted kidney if there is also present an ongoing T cell response to viral reactivation.

It is important to study the responses of immune system through methods allowing for multiparametric measurements at a single cell level. These methods are extremely useful in studies covering the broad spectrum of immune subpopulations in reconstituting immune system after hematopoietic transplantation. To make this possible we have implemented mass cytometry together with a new cell isolation method through CD81+ immunoaffinity chromatography.

We have used gained experience in the field of T cells functional testing in complex environment of other lymphocyte subsets in the study of newly developed high affinity binders proofing their potential therapeutical effect. Functional testing of Th17 cells has shown significant immunosuppressive effect of these binders on the proliferation of Th17 cells which makes their further therapeutical usage possible.

PŘEDMLUVA

S prací na hlavních částech této dizertační práce jsem začal již v průběhu magisterského studia, kdy jsem sbíral vzorky od pacientů po transplantaci hematopoetických buněk a prováděl vyšetření analyzující protivirové funkce T lymfocytů. S narůstajícím počtem vyšetřených pacientů zároveň narůstala klinická potřeba pokusit se pacientům po transplantaci hematopoetických buněk nabídnout nějakou účinnější terapii, než která byla aktuálně k dispozici. S tímto požadavkem jsme se pustili do procesu přípravy adoptivní imunoterapie virus specifických T lymfocytů. Celý proces příprav jsme úspěšně dokončili v roce 2013, kdy jsme získali povolení Státního ústavu pro kontrolu léčiv. Ve stejnou chvíli ovšem došlo na transplantační jednotce FN Motol, vzhledem k hojným posttransplantačním virovým komplikacím, ke změně systému výběru dárců pro transplantace hematopoetických buněk. V důsledku toho došlo k výraznému snížení incidence cytomegalovirových reaktivací, což nám znemožnilo indikování pacientů k naší připravené imunoterapii. Díky navázání spolupráce s Transplantační skupinou FN Brno jsme mohli připravit buněčnou terapii alespoň pro dva dospělé pacienty.

Zkušenosti při vyšetřování virus specifických T lymfocytů a spolupráce s transplantační laboratoří Institutu klinické a experimentální medicíny mi umožnily pracovat na projektu zkříženě reagujících T lymfocytů u pacientů po transplantaci ledviny. Tento projekt mi přinesl unikátní poznání T buněčné imunity i z její negativní stránky. Celá problematika zkříženě reagujících T lymfocytů vlastně jen ukazuje flexibilitu imunitního systému, který je tak schopný maximálně využívat dostupné zdroje nejen proti původním cílům.

Všechny tyto poznatky vedly k potřebě rozšířit naše možnosti vyšetřování adaptivního imunitního systému. Využití metody hmotnostní cytometrie nám přineslo poměrně rychlé navýšení vyšetřovaných parametrů na jedné buňce na třicet, což před tím nebylo možné. Ukázalo se ovšem, že pro použití hmotnostní cytometrie je potřeba zvýšit kvalitu přípravy vzorků, abychom umožnili její rutinní použití. Dále bylo potřeba zavést nové přístupy analýzy těchto mnohparametrických dat, abychom byli schopni tato data efektivně analyzovat. Po překonání těchto počátečních překážek se nám podařilo zpřístupnit použití hmotnostní cytometrie v naší laboratoři i pro následné vědecké projekty, případně další vědecké spolupráce. Své zkušenosti s intracelulárním vyšetřováním cytokinů u T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie jsem v neposlední řadě použil při testování nových vysoce afinitních binderů odvozených od ABD domény streptokokového proteinu G. V tomto projektu se nám podařilo prokázat imunosupresivní efekt těchto binderů na Th17 buňky, což ukazuje jejich slibný

klinický imunomodulační potenciál u onemocnění způsobených Th17 lymfocyty (například psoriáza).

V průběhu mého působení v laboratoři CLIP jsem se autorsky podílel na vzniku 11 prací přijatých do tisku. Vzhledem k šíři jejich záběru by bylo obtížné je shrnout do jedné konzistentní práce. Předkládaná dizertační práce tedy zahrnuje 5 vybraných publikací (viz kapitola 6 a přílohy), které se zabývají studiem a izolací T lymfocytů.

1. ÚVOD

1.1. Význam porozumění adaptivnímu imunitnímu systému

Lidský adaptivní imunitní systém je mezi jednotlivci vysoce variabilní a zároveň velmi komplexní. Je složen z několika specializovaných buněčných populací (B a T lymfocytů), které cirkulují a vytváří unikátní niky v různých tkáních. Unikátním zdrojem informací o funkcích adaptivního imunitního systému, a to i z distálních míst, je periferní krev, která přivádí buňky adaptivní imunity do míst, kde jsou potřebné (1). Souhra mezi těmito specializovanými populacemi buněk pak umožňuje komplexní imunitní odpověď, a proto pokud chceme plně porozumět adaptivnímu imunitnímu systému, je potřeba vzít do úvahy všechny buňky, které se těchto procesů účastní.

Nové analytické metody jako je fluorescenční a hmotnostní cytometrie nebo RNA/DNA sekvenování na úrovni jednotlivých buněk umožňují zkoumat tyto komplexní procesy adaptivního imunitního systému v jednom vzorku periferní krve. Díky těmto metodám se nyní můžeme snažit lépe porozumět nemocem, které jsou způsobeny nesprávným fungováním adaptivní složky imunitního systému, nebo terapiím, které modulují imunitní odpověď (2). Obzvláště zajímavou možností pro sledování vývoje a obnovy adaptivního imunitního systému u lidí je transplantace hematopoetických kmenových buněk.

1.2. Obnova protivirové imunity po transplantaci hematopoetických buněk

Alogenní transplantace hematopoetických buněk (HSCT) je léčbou mnoha hematologických malignit, vrozených imunodeficiencí a některých metabolických poruch jako například akutní myeloidní a lymfoblastické leukémie, myelodisplastického syndromu, myeloproliferativní neoplázie, hyper IgM syndromu a těžké kombinované imunodeficience (3). Vedlejším efektem HSCT je hluboký a dlouho trvající deficit adaptivní složky imunitního systému, který může trvat po dobu 3–6 měsíců (4, 5). Ovšem k úplnému obnovení repertoáru B lymfocytů dochází až po 1–2 letech po HSCT (6) a k plné obnově repertoáru T lymfocytů dochází až po 10–30 letech po HSCT (7, 8). Během doby deficitu T lymfocytů jsou pacienti vystaveni riziku infekčních komplikací, kdy zhruba 11 % všech úmrtí po HSCT (medián 3 měsíce po HSCT) jsou způsobeny právě infekčními komplikacemi (9). Dokonce celá třetina z těchto komplikací je způsobena viry, které zahrnují i reaktivace latentně přítomných herpesvirů jako je například cytomegalovirus (CMV) (10), virus Epstein-Barrové (EBV) (11) a varicella-zoster virus (12).

Infekce herpesviru probíhají obvykle v dětství a jsou kontrolovány vývojem virus specifické T buněčné odpovědi a tvorbou paměťových T lymfocytů. I když virus specifické T lymfocyty kontrolují tyto viry, ve skutečnosti nedochází ke kompletnímu vymizení viru z organismu a dochází k ustavení jisté rovnováhy mezi virem a virus specifickými T lymfocyty. Zajímavé je, že frekvence paměťových virus specifických T lymfocytů, které kontrolují tyto latentní viry, jsou poměrně vysoké u imunokompetentních jedinců – u CMV nebo EBV nakažených jedinců mohou virus specifické T buňky kontrolující tyto viry tvořit až 40 % celého T buněčného repertoáru (13, 14). Takovéto vysoké množství paměťových buněk je nejspíše dáno častými reaktivacemi CMV a EBV během života. Právě endogenní reaktivace CMV je nejčastější herpesvirovou reaktivací po HSCT. V západní Evropě a v USA je celkem zhruba 45 % – 60 % příjemců alogenní HSCT seropozitivní na přítomnost CMV, a proto jsou v riziku endogenní reaktivace latentní CMV infekce (15, 16).

Pro dlouhotrvající kontrolu reaktivace CMV po HSCT jsou klíčové CMV specifické T lymfocyty (17–19). Pokud nedojde u pacientů po HSCT k obnovení CMV specifické T buněčné imunity ať už kvantitativně (eradikace během přípravného režimu), nebo kvalitativně (kvůli imunosupresi nebo kvůli vyčerpání chronickou stimulací antigenem (20, 21)), je následkem zhoršená kontrola CMV reaktivace, což může vést až k rozvinutí CMV nemoci jako je CMV pneumonie, CMV kolitida nebo CMV encefalitida (22). Rozvinutí CMV nemoci během období nefunkční CMV specifické T buněčné imunity pomáhá předejít antivirotická preemptivní terapie. Tato terapie je založená na pravidelném monitorování hladiny virové nálože pomocí metody kvantitativní PCR. V momentě, kdy hladina virové nálože překročí předem stanovenou mez, dojde k zahájení protivirové léčby pomocí gancicloviru, valgancicloviru nebo foscarnetem (23). I přes tuto preemptivní terapii je incidence CMV nemoci 10 % jeden rok po HSCT u CMV seropozitivních pacientů (24, 25), což jasně ukazuje na důležitost efektivní CMV specifické T buněčné imunity. Zároveň vede tato preemptivní terapie k nadměrnému používání antivirotik u pacientů, kteří jsou schopni kontrolovat CMV reaktivaci rekonstitucí svých CMV specifických T lymfocytů (22). Nadbytečné používání antivirotik má pak také několik nevýhod: a) antivirotika působí značně toxicky na kostní dřeň (ganciclovir, valganciclovir) nebo na ledviny (foscarnet) (26, 27); b) ganciclovir může potlačovat proliferaci T lymfocytů (28); c) existují důkazy o tom, že CMV virémie indukuje CMV specifickou T buněčnou odpověď, která může zároveň vyvolat výhodný antileukemický efekt (29–31) nebo zlepšit rekonstituci T buněčné imunity (32). Ideální terapeutické přístupy by měly zajistit, aby pacienti ve vysokém riziku rozvinutí CMV nemoci byli léčeni antivirotiky a ti, kteří na tuto léčbu nereagují dostatečně pak byli dále směřováni

k buněčné terapii CMV specifickými T buňkami. Pacienti s adekvátní spontánní CMV odpovědí by pak nebyli zatěžováni zbytnými dávkami antivirotik a jejich vedlejším účinkům. Nezávisle na používání preemptivní terapie antivirotiky existují rizikové faktory, které zvyšují riziko rozvoje CMV nemoci. Hlavním faktorem je nepřítomnost dárcovských CMV specifických buněk ve štěpu u CMV seronegativních dárců (33). Druhým faktorem je imunosupresivní léčba kortikoidy, která zabraňuje reakci štěpu proti hostiteli (GvHD), což ukazují v této dizertační práci (34). Taková léčba totiž ovlivňuje nejen alo reaktivní lymfocyty, které způsobují GvHD, ale i CMV specifické T lymfocyty.

Potlačování příjemcovy T buněčné imunity je klíčové i pro orgánové transplantace, kdy je tím zabráněno rejekci štěpu. Ovšem u orgánových transplantací mohou CMV specifické T lymfocyty hrát zásadní úlohu i v odhojení štěpu a to například prostřednictvím jejich zkřížené reaktivity s alo antigeny štěpu (35). Jedná se o nový pohled na problematiku rejekce transplantovaných ledvin, který se v této práci snažíme více objasnit (36).

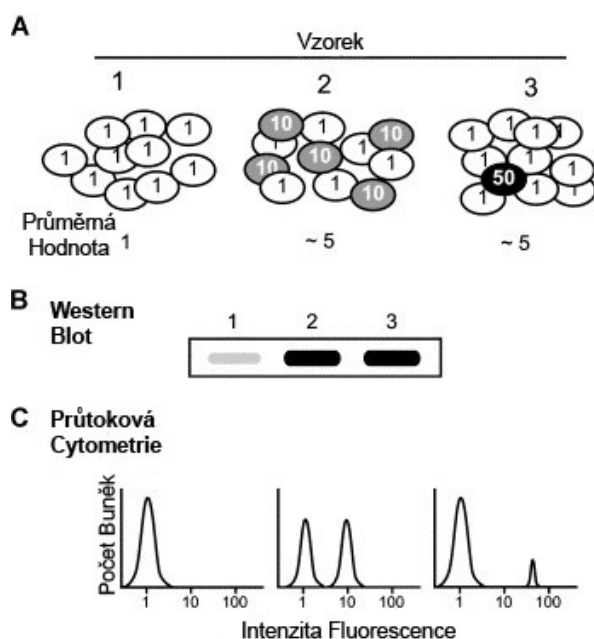
Pro úspěšné zvládnutí CMV reaktivity nejen po HSCT je tedy nutné najít rovnováhu mezi potlačováním nechtěných alo reaktivních T lymfocytů tak, aby protektivní CMV specifické T lymfocyty byly stále schopné kontrolovat CMV reaktivaci. To ovšem vyžaduje sledování kinetiky virové nálože v kontextu se sledováním protektivního potenciálu anti-CMV T buněčné odpovědi. K tomu je potřeba sledovat odpověď T lymfocytů ideálně nejenom na úrovni jednotlivých buněk, ale i za použití mnohparametrických metod tak, abychom získali komplexní informaci o aktuálním stavu imunitního systému.

1.3. Důležitost rozlišení na úrovni jednotlivých buněk

Buněčná aktivita je řízena velkým množstvím transkriptů a proteinů. Tyto molekuly neurčují pouze vnitřní charakter jednotlivých buněk jako je jejich zralost (37), zacílení do specifické tkáně (38) a jejich schopnost dělit se (39), ale také to, jak tyto buňky ovlivňují své tkáňové mikroprostředí. Právě obrovské množství kombinací různých transkriptů a proteinů, které může jedna buňka exprimovat, umožňuje, aby v jednom organismu byla vysoká rozmanitost různých buněk. A právě určité kombinace těchto znaků jsou používány ke klasifikaci a zařazení jednotlivých buněk. Vzniklo tak celé klasifikační schéma, na jehož základě je možné studovat buněčnou biologii (40). Měření proteinových nebo transkripčních profilů nám také pomáhá odhalit, jak jednotlivé onemocnění negativně ovlivňují funkci celého organismu nebo jak se organismus vyrovnává s konkrétním onemocněním. Díky tomuto přístupu bylo objeveno mnoho významných terapeutických cílů jako například CD20 (rituximab u lymfomů) (41),

TNF (infiximab u autoimunitních onemocnění) (42) a PD1 (nivolumab, například u melanomů, nádorů plic, Hodgkinova lymfomu a dalších nádorových onemocnění) (43). Z výše uvedeného je zřejmé, že technologie, které detekují proteiny a transkripty buněk imunitního systému, jsou klíčové pro biomedicínský výzkum.

Již od roku 2008 se začaly hojně objevovat metody, které byly schopné analyzovat buněčné proteiny a mRNA (44). Důležitou vlastností všech těchto technologií je jejich schopnost měření těchto znaků na úrovni jednotlivých buněk. A právě data na úrovni jednotlivých buněk umožňují přesnou anotaci exprese zkoumaných znaků na jednotlivých buňkách v celém vzorku. Díky tomu je možné přesně určit identitu a množství jednotlivých komponent, z kterých se skládá zkoumaná heterogenní buněčná směs. Naproti tomu u metod, které detekují expresi daných znaků z většího množství buněk (například ELISA, Western blot, hmotnostní spektrometrie, microarray nebo hromadné RNA sekvenování), dochází k zprůměrování výsledného množství zkoumaného proteinu nebo transkriptu u všech vyšetřovaných buněk, čímž se stírají rozdíly mezi jednotlivými buňkami (45, 46) a snižuje se tím celková senzitivita daného experimentu (Obr. 1).



Obrázek 1: Výhody rozlišení na úrovni jednotlivých buněk. (A) Hypotetický příklad složení tří vzorků, kdy každý vzorek obsahuje buňky s různým množstvím zkoumaného proteinu. Číselně je uveden průměrný počet molekul zkoumaného proteinu ve všech buňkách. (B) Analýza těchto vzorků pomocí Western blotu ukazuje identické výsledky pro vzorky 2 a 3. (C) Analýza těchto vzorků pomocí průtokové cytometrie. Lze odlišit, že vzorek 2 obsahuje dvě různé rovnoměrné zastoupené populace podle množství zkoumaného proteinu. Naproti tomu vzorek 3 obsahuje minoritní množství buněk s vysokým obsahem zkoumaného proteinu. Upraveno podle Krutzik et al. (47).

Tento jev hraje obzvláště významnou roli, pokud se snažíme identifikovat specifické znaky pro dané onemocnění nebo pro sledování léčby (46, 47). Přístupy na úrovni jednotlivých buněk jsou pak klíčové při sledování tak rozmanitého a dynamického prostředí jakým je právě imunitní systém.

1.4. Vysoká variabilita imunitního systému

Různorodost buněk adaptivního imunitního systému jen odráží vysokou míru flexibility a plasticity, které umožňují adaptivnímu imunitnímu systému efektivně bojovat s různými patogeny. Na druhou stranu to studium procesů a buněk adaptivního imunitního systému velmi komplikuje. Již od ranných sedmdesátých let se používá slovo variabilita ve spojení s imunitním systémem a jeho buňkami (48). Od té doby známá úroveň komplexity a diverzifikace imunitního systému ještě značně narostla. Mezi diverzifikace se řadí rozdíly na úrovni DNA, RNA, i jednotlivých proteinů. Pokud se podíváme jen na rozdíly na úrovni DNA, tak je zajímavé podotknout, že zatímco lidský genom má zhruba 30 000 různých genů, tak jen množství různých T buněčných receptorů se odhaduje v řádech 10^7 a to samé platí i pro B buněčné receptory (49). Této variability je dosaženo pomocí procesu somatické rekombinace DNA, který je výlučný pouze pro B a T lymfocyty. Tento extrémní případ je jasným důkazem toho, jak velkou roli v adaptivním imunitním systému hraje právě jeho vysoká variabilita, která je výsledkem evolučních procesů (pro rozpoznání široké škály patogenů je využívána vysoká variabilita repertoáru B a T buněk). Tato situace platí obdobně i na proteinové a RNA úrovni, kdy například už v roce 1995 a 1996 bylo zřejmé, že množství syntézy různých cytokinů se liší při použití různých stimulů mezi Th1 a Th2 buňkami (50, 51). I když se tyto práce zabývají zkoumáním pouze dvou cytokinů současně, již z těchto výsledků bylo patrné, že existuje vysoká variabilita odpovědí mezi jednotlivými buňkami.

Pro přehlednost a kvůli dalšímu zaměření této práce převážně na T buněčnou složku imunitního systému, ilustruji dále variabilitu imunitního systému právě na příkladu T lymfocytů.

1.4.1. Variabilita T lymfocytů

Ačkoliv by se T lymfocyty na první pohled mohly zdát jako poměrně jasně definovaná a homogenní populace imunitního systému, opak je pravdou. Mezi T lymfocyty existuje ohromná variabilita, kterou lze rozdělit na dvě základní kategorie:

1. Strukturální diverzita, která je dána primární, sekundární, terciální anebo kombinatorickou strukturou T buněčného receptoru.

2. Funkční diverzita, kterou tvoří různá diferenciací a maturační stádia T lymfocytů, která jsou příčinou odlišných efektorových funkcí, dokonce i mezi buňkami se stejným T buněčným receptorem.

Základní strukturální variabilita mezi T lymfocyty je na úrovni úseků DNA, kde je kódován klonálně odlišný komplex heterodimerů zajišťující rozpoznávání antigenu – T buněčný receptor (TCR). Jedná se o základní protein definující T lymfocyty, který je ale exprimován na povrchu T buněk až v momentě, kdy dojde k nevratným somatickým rekombinacím a mutagenézím na úrovni DNA, v oblastech kódujících právě proteiny pro TCR. Ke strukturální diverzifikaci TCR dochází zejména v thymu pomocí náhodných rekombinací nesousedících V(D)J fragmentů (52). Variabilita je dále prohlubována jednak pomocí nepřesného spojování přerušovaných segmentů, dále přidáváním nově syntetizovaných nukleotidů a také pomocí párování odlišných řetězců TCR α a β nebo TCR γ a δ . Diverzita, kterou zajišťuje takový systém, je obrovská a teoreticky se jedná zhruba o 10^{15} různých možností, jak může být vytvořen jeden TCR $\alpha\beta$ (53). Celková variabilita je dále navýšena tím, že u některých T buněk může dokonce dojít k expresi dvou různých T buněčných receptorů (dva různé TCR α řetězce párují s jedním TCR β řetězcem, díky chybám při alelické exkluzi). Maximální četnost takových buněk je udávána kolem 30 %, ale zároveň je funkčnost těchto „sekundárních“ TCR velice omezená díky špatnému párování s odpovídajícími MHC molekulami. Jejich příspěvek do celkové T buněčné variability tak zůstává sporný (54–56). Strukturální variabilita T lymfocytů je ovšem omezena 3-100krát díky pozitivní a negativní selekci, která se odehrává v thymu (57–60). Díky tomu je teoretická horní hranice diverzity TCR repertoáru vyskytujícího se v periferní krvi zhruba 10^{13} různých klonů. Jenže v lidském organismu je celkem asi 10^{12} T lymfocytů (61). Pokud dále vezmeme do úvahy skutečnost, že výskyt daného TCR není v organismu omezen pouze na jednu buňku, jelikož dochází k intra-thymické a extra-thymické expanzi naivních buněk a zároveň k homeostatické a antigenem stimulované expanzi paměťových buněk, je zřejmé, že v lidském těle se v jednom okamžiku nemůže vyskytovat více unikátních TCR, než je celkové množství T lymfocytů v celém organismu. Celková variabilita TCR $\alpha\beta$ je ve skutečnosti ještě nižší, a to zhruba okolo $2,5 \times 10^7$ u naivních buněk a u paměťových buněk je ještě zhruba 100krát nižší (61). V celkových počtech je tedy u člověka zhruba 1000 – 4000 buněk, které nesou identický TCR. Z výše uvedených čísel je zřejmé, že teoretická variabilita T buněčného repertoáru je mnohonásobně větší, než může být přítomna v každém člověku. Tato obrovská potenciální variabilita vede k tomu, že dokonce i geneticky identičtí jedinci mají odlišné repertoáry

T lymfocytů. Takové rozdíly byly pozorovány při analýzách inbredních myší, jejichž repertoár naivních T lymfocytů byl shodný jen asi z 20 – 25 % (62).

Vzhledem k tomu, že většina T buněk má na svém povrchu pouze jednu variantu funkčního TCR, je diverzita TCR repertoáru vykoupena omezenou hloubkou – tu představuje množství naivních T buněk, které jsou schopné rozpoznat daný antigení epitop. Ve skutečnosti je frekvence naivních T buněk, které mají na povrchu TCR specifický pro daný epitop, velice nízká. U lidí i u myší se tato frekvence pohybuje mezi 1 až 10 buňkami na milión CD4+ T lymfocytů a 1 až 100 buňkami na milión CD8+ T lymfocytů (63). Vzhledem k těmto nepatrným počátečním frekvencím je důležité, aby se epitop-specifické T buňky po aktivaci rychle množily, aby mohly poskytnout dostatečnou imunitní odpověď během akutní infekce. Tato teorie byla poprvé představena už v roce 1957 australským imunologem Frankem Mcfarlenem Burnetem jako teorie klonální selekce (64). Klonální expanze antigen-specifických T buněk obvykle dosahuje svého maxima během jednoho týdne po jejich prvotní aktivaci. Během této expanze T buňky zároveň získávají své účinné efektorové funkce a dochází také k rychlému odstranění patogenu z organismu. Po skončení této efektorové fáze umírá i většina antigen-specifických T buněk. Některé buňky ovšem zůstávají přítomny i po této kontraktilní fázi a dlouhodobě přežívají i bez přítomnosti antigenu. Tyto procesy vedou k celkovému namnožení epitop-specifických buněk o 2–3 řády v porovnání se stavem před infekcí či imunizací, což v konečném důsledku vede k rychlejší a účinnější imunitní odpovědi při opětovné infekci. Důležitou vlastností epitop-specifických paměťových T buněk, tedy těch, které jsou v organismu přítomny i po fázi kontrakce, je nejenom jejich větší počet, ale zároveň i jejich odlišná funkčnost. Paměťové T lymfocyty na rozdíl od naivních mají například rozdílné migrační vlastnosti (65, 66), nebo také produkují odlišné cytokiny bezprostředně po aktivaci jejich TCR (67, 68). Všechny tyto unikátní vlastnosti paměťových T buněk je jednoznačně odlišují od jejich naivních protějšků a tím celkově kvalitativně přispívají k rychlejší imunitní odpovědi při opětovné infekci.

Celý výše popsany proces tak uvádí druhou úroveň variability T lymfocytů, a to sice funkční variabilitu. Do této skupiny spadají odlišné efektorové funkční profily podle typu reakce na antigen, kdy aktivované T lymfocyty mohou: a) proliferovat, b) sekretovat různé cytokiny nebo c) působit cytolyticky. Všechny tyto tři skupiny se dále mohou lišit v jejich migračních vlastnostech a místech, kam jsou naváděné.

Naše znalosti ohledně funkční diverzity se v posledních letech rozšířily díky možnosti využití různých metod, které dokážou rozlišovat jednotlivé buňky. Tyto technologie pak umožnily identifikaci řady různých efektorových a paměťových T buněčných subpopulací. Na základě

produkce cytokinů, expresních profilů transkripčních faktorů a exprese proteinových znaků na povrchu CD4⁺ T lymfocytů můžeme nyní CD4⁺ T pomocné buňky rozdělit do několika linií – Th1, Th2, Th17 (69, 70), Th9 (71), Th22 (72), folikulární pomocné T buňky (Tfh) (73) a regulační T buňky (Treg) (74). Tato velmi zjednodušená kategorizace je názornou ukázkou toho, jak se variabilita populací T lymfocytů stává komplikovanější a provázanější, místo toho, aby docházelo k jasnému vymezení jednotlivých populací. To je zapříčiněno zejména tím, že jsou jednotlivé populace definované expresí několika specifických genů (75), ale neví se toho mnoho o stádiích, která vedou do těchto konečných populací T lymfocytů.

Potřeba rozdělení buněk na základě jejich paměťových schopností se poprvé ukázala jako důležitá v práci Federica Sallusta a Antonia Lanzavecchia (76), kteří poprvé ukázali, že T buňky mohou být rozděleny díky rozdílům v expresi adhezivních molekul a chemokinových receptorů. Tyto rozdíly pak vedou k odlišným schopnostem buněk migrovat v organismu. Díky této práci se T lymfocyty nyní dají rozlišovat na centrální paměťové (TCM), které neustále recirkulují (obdobně jako naivní T buňky) v krevním řečišti do lymfoidních orgánů, a na efektorové paměťové buňky (TEM), které přednostně migrují do nelymfoidních tkání (65). Nedávno objevené tkáňově rezidentní paměťové T buňky (TRM) (77, 78), které se mohou dále dělit na základě orgánů, kde sídlí (79), dále navyšují diverzitu a komplexitu celé T buněčné složky imunitního systému.

S neustále narůstajícím počtem různých T buněčných subpopulací vyvstává dále otázka, jak je fenotypová a funkční rozmanitost tvořena. Záleží diverzifikace T buněk hlavně na vnějších faktorech, jako je například tkáňové mikroprostředí, nebo k tomu dochází spontánně na základě vnitřních buněčných vývojových programů? Obzvláště důležitá znalost toho, co ovlivňuje osudy jednotlivých buněk je například v případě, kdy účinná a dlouhodobá imunitní odpověď vyžaduje, aby T buňky se stejnou specifitou vykonávaly velmi odlišné funkce. Jedním takovým příkladem jsou klasické T pomocné buněčné subpopulace, které migrují do místa zánětu, na rozdíl od Tfh buněk, které zůstávají v sekundárních lymfoidních orgánech a podílí se na B buněčné odpovědi (80–83). Druhým takovým příkladem je vývoj dlouze a krátce přežívajících T buněk, které všechny rozeznávají stejný epitop. Tahle vlastnost zajišťuje jak přechodnou povahu akutní imunitní odpovědi adaptivní složky imunitního systému, tak umožňuje efektivní uchování užitečné TCR specifity. Nedávné výsledky dokonce ukazují, že některé Tfh buňky mají obdobnou funkci jako TCM buňky (84, 85), což naznačuje, že oba výše popsané procesy by mohly být úzce spojeny.

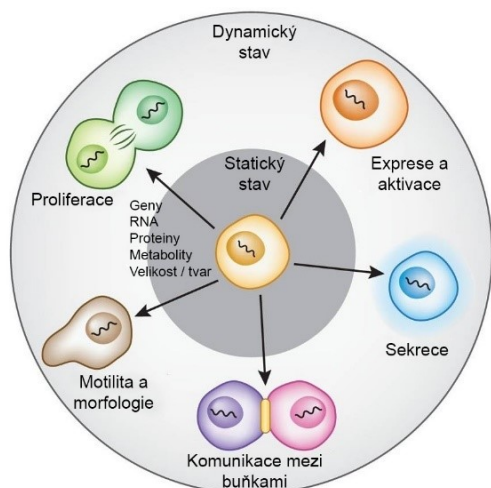
Technologické pokroky v možnostech fenotypové a funkční charakterizace T lymfocytů na úrovni jednotlivých buněk umožnily identifikovat rozdílné efektorové, funkční a paměťové

T buněčné subpopulace. Ovšem až opravdu v poslední době jsou k dispozici takové metody, které umožňují zkoumání všech těchto populací najednou. A dokonce se ukazuje, že pro úplné porozumění všech komplexních vztahů je nutné tyto mnohparametrické metody kombinovat, abychom byli schopni obsáhnout celou informaci o všech možnostech T buněčného kompartmentu.

1.5. Moderní možnosti sledování imunitního systému

Pro charakterizaci aktuálního stavu a schopností imunitního systému lze využít celou škálu různých analytických metod. Takto získaná data pomáhají v odhalování základních principů fungování imunitního systému, poskytují vhled do rozvoje onemocnění, pomáhají při vývoji klinické diagnostiky nebo intervence a definují jasné znaky pro rozpoznání efektivní imunitní odpovědi. Zlepšování možností rozlišení těchto měření za účelem zachycení celé komplexity imunitního systému, která zahrnuje i změny v čase a vzájemnou propojenost buněčných populací, není úplně snadné.

Leukocyty vyizolované jak z krve, tak z jiných tkání, v sobě nesou spoustu informací, a to buď v jejich homeostatickém stavu nebo po *ex vivo* aktivaci. Důležitými zkoumanými parametry těchto buněk jsou jednak jejich absolutní i relativní počty, status transkripce, schopnosti sekrece, proliferační kapacita nebo cytolytický potenciál (Obr. 2).



Obrázek 2: Zkoumané vlastnosti buněk. Schéma buněčných vlastností, které mohou být měřeny v klidovém (homeostatickém) stavu nebo po aktivaci znázorňující dynamické změny v buňkách. Upraveno podle Chattopadhyay et al. (45)

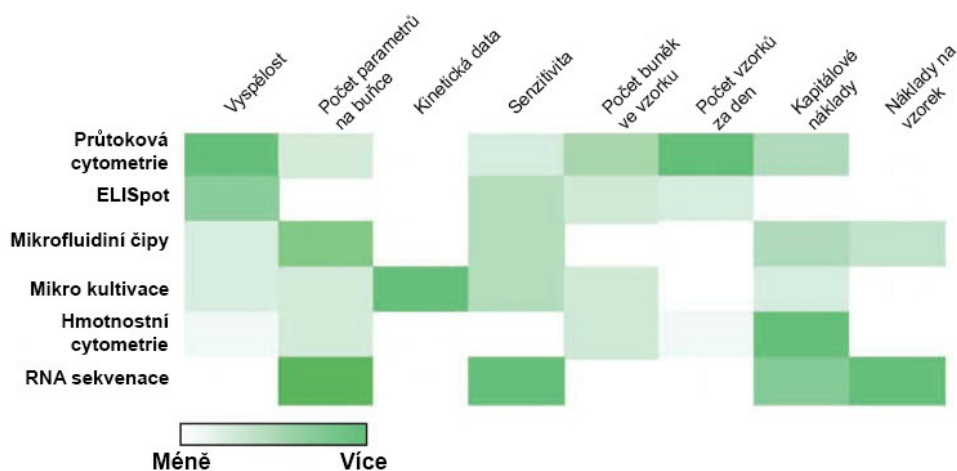
V následujících kapitolách se věnuji třem základním analytickým metodám (fluorescenční a hmotnostní průtoková cytometrie a sekvenování na úrovni jednotlivých buněk), které jsou

nejčastěji používanými metodami pro zkoumání imunitního systému a zároveň umožňují analyzovat dostatečné množství parametrů najednou, tak aby splnily předpoklad pro zachycení imunitního systému v širších souvislostech.

1.5.1. Fluorescenční cytometrie

Fluorescenční průtoková cytometrie byla pravděpodobně vůbec první metodou, která dokázala odlišit rozdíly mezi buňkami na základě měření několika různých parametrů současně na jedné buňce. Nejzásadnějším přístrojem, který následně ovlivnil podobu fluorescenčních cytometrů, byl přístroj fluorescence-activated cell sorter (FACS) vynalezený Leonardem a Leonorou Herzenbergovými na Stanfordské univerzitě (86, 87). Přibližně ve stejné době německý vědec Wolfgang Göhde vyvinul první fluorescenční průtokový cytometr. FACS se tak stal první „-omickou“ metodou, která je schopná zpracovávat velké datové soubory, které mohou obsahovat informace až o několika desítkách parametrů na milionech buňkách. Až do nedávna tato metoda, jako jediná, umožňovala v jedné chvíli získat ty nejpodrobnější datové soubory o tolika buněčných populacích, kolik bylo potřeba. Teprve v posledních letech se začaly objevovat výpočetní nástroje, které umožňují automatizované analýzy těchto dat (88).

Již od svého počátku byla fluorescenční průtoková cytometrie zaměřena na současné měření několika parametrů na jedné buňce. Následně docházelo ke korelaci těchto dat s biologickými mechanismy nebo s průběhem různých nemocí, ať už na zvířecích modelech nebo přímo u lidí. Tato metoda nastavila poměrně vysokou laťku pro vysoce kvantitativní mnohparametrické měření vlastností jednotlivých buněk. Díky svým přednostem je fluorescenční průtoková cytometrie pilířem imunologie a výzkumu hematologických malignit již více než 40 let (Obr. 3).



Obrázek 3: Srovnávací analýza různých technologií umožňující rozlišení na úrovni jednotlivých buněk. Upraveno podle Chattopadhyay et al. (45).

Mnohparametrická fluorescenční průtoková cytometrie byla poprvé použita v klinické praxi u studií zaměřených na leukémie a lymfomy. Díky panelům, které se zaměřovaly na znaky na povrchu buněk, bylo možné identifikovat základní buněčné populace v lidské periferní krvi a kostní dřeni. Tyto panely pak umožnily, díky porovnání vzorků od pacientů s hematologickými malignitami se vzorky od zdravých dárců, odhalení výskytu neobvyklých proteinů u těchto maligních buněk (89). Díky průtokové fluorescenční cytometrii byla také na leukemických buňkách prokázána ko-exprese proteinů, které se u zdravých jedinců na jedné buňce nevyskytují, což nasvědčuje nabourání celého standardního expresního programu vedoucího k rozdílné diferenciaci a signalizaci. U solidních nádorů byla fluorescenční průtoková cytometrie použita k vykreslení heterogenity, kdy například u rakoviny prostaty bylo takto identifikováno 15 individuálních znaků (90).

U leukémií a lymfomů je analýza dat získaných z fluorescenční cytometrie založena na identifikaci neobvyklých expresních vzorců proteinů na jednotlivých buňkách. Tento přístup je obdobným tomu, jak se na vzorky dívají patologové. Ti identifikují maligní buňky a klasifikují je na základě jejich sousedských a morfologických vlastností.

Fluorescenční průtoková cytometrie se také často používá pro detekci nádorových kmenových buněk jak u solidních nádorů, tak u leukémií pomocí sortování těchto subpopulací (91–93). Bonnet a Dick (94) ukázali, že po izolaci minoritní populace (lin negativní, CD38-, CD34-) buněk z lidské akutní myeloidní leukémie (AML) jsou výhradně tyto buňky schopné iniciovat stejné onemocnění u imunodeficitních zvířecích modelů. Toto paradigma buněk iniciujících leukémii (také známé pod širším označením jako nádorová kmenová buňka) bylo popsáno také u různých lidských solidních nádorů (95, 96). Díky možnosti cílit na neoplastické buněčné populace na základě jedinečného vzoru proteinů exprimovaných na jejich buněčném povrchu jsme nyní schopni studovat přímo ty buňky, které jsou nejspíše hlavní příčinou nádorových onemocnění. Fluorescenční průtoková cytometrie nabízí ideální nástroje jak pro analýzu a izolaci těchto buněk, tak pro zkoumání jejich vlastností. Podle posledních studií je zřejmé, že význam nádorových kmenových buněk, znaků, které je jednoznačně definují, jejich rozdílná vzácnost u různých nádorových onemocnění a mnoho léčebných protokolů, které se na ně zaměřují, jsou stále intenzivně zkoumaná témata (97, 98).

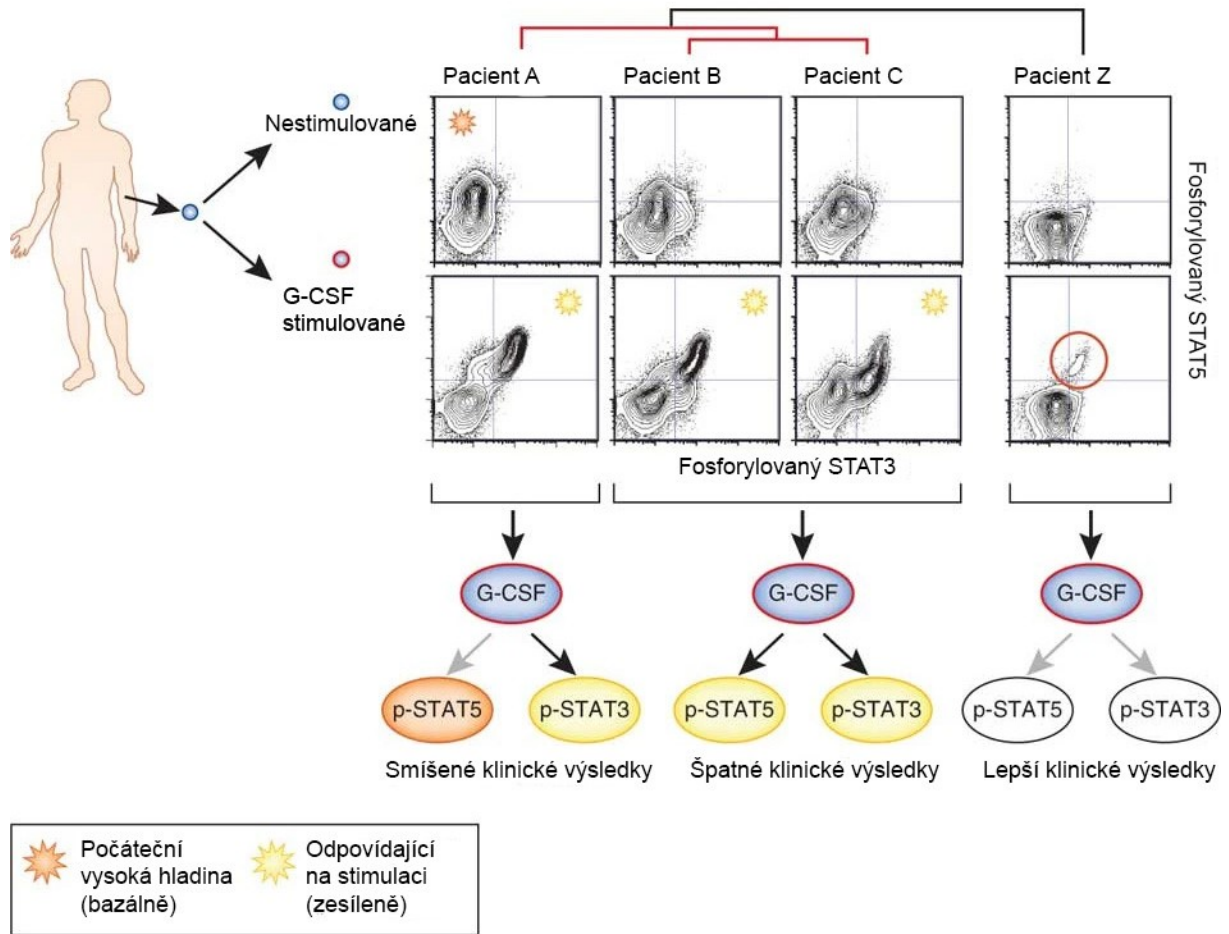
Další využití fluorescenční průtokové cytometrie ve zkoumání nádorové heterogenity je například při sledování signalizačních funkcí a toho, jak souvisejí s výsledným typem onemocnění. Tento přístup se méně zaměřuje na definici povrchového fenotypu nádorových buněk a s tím související genetické mutace, ale hlavně se věnuje studiu signalizačních (fosforylačních) drah uvnitř buněk, které často slouží jako cíle při chemoterapii. Vůbec prvním

případem, kdy byly využity výsledky zkoumání signalizačních drah, je lidská AML. Díky různým vzorům fosforylace po stimulaci extracelulárními faktory byly nejenom objeveny nové signalizační dráhy, které umožnily přesnější stratifikaci pacientů, ale zároveň bylo možné podle těchto vzorů předpovědět i výsledek pacientovy léčby a typ mutace způsobující dané onemocnění (99). V nedávné době se podařilo podobným studiím klasifikovat pacienty s podezřením na juvenilní myelomonocytární leukémii (100) nebo předpovědět výsledek léčby u pacientů s B buněčným lymfomem (101) a také stanovit míru odpovědi na léčbu u chronické lymfocytární leukémie (102). Tyto studie byly založeny na analýze fosforylace jednotlivých buněk.

Díky metodě profilování kinázových aktivit a jejich sítí na úrovni jednotlivých buněk můžeme rozlišit různé signalizační vzory (99, 103, 104). Tato metoda se nazývá „phospho-flow“ a umožnila využití fluorescenční průtokové cytometrie v proteomických aplikacích zkoumajících nitrobuněčné soustavy signalizačních drah (105) na zafixovaných buňkách. Bohužel je tato technika primárně zaměřena na analýzu fixovaných buněk, a tudíž tím přichází o hlavní výhodu fluorescenční průtokové cytometrie, kterou je možnost sortování cílových živých buněk.

Obecné předpoklady, které vedly k využívání phospho-flow (a dalších metod založených na principu reakce na perturbace), jsou založeny na představě, že buněčný systém je v bazálním homeostatickém klidovém stavu, který je ovšem velice flexibilní (99). Buňka v homeostatickém stavu odráží svou genetickou historii a historii prostředí, ve kterém se pohybovala. Taková buňka je sice v klidovém stavu, ale je zároveň připravena reagovat na nové signály. U buňky nacházející se ve stavu homeostáze se nedá jednoduše poznat jaký je její funkční potenciál, jelikož je maskován stochastickým biochemickým šumem, který probíhá na pozadí jednotlivých funkčních drah. Řešením, jak takový stochastický šum překonat, je v celkové široké aktivaci buněčného systému vnějším stimulem. Zároveň tím tak dojde i k využití vnitřních amplifikačních procesů signálních drah a buňky jsou tak nuceny odkrýt hlavní kanály kudy a jak jsou vedeny dané signály uvnitř buňky i mezi nimi. Ukazuje se, že tyto informace mohou být katalogizovány (Obr. 4) a použity jako prediktivní diagnostické znaky na úrovni jednotlivých buněk nebo v predikci odpovědi na konkrétní léčbu (99–101, 106, 107).

Testování nitrobuněčných a mezibuněčných interakcí na takovéto úrovni by se dalo přirovnat ke klasickým klinickým zátěžovým testům na pacientech (např. test srdečních funkcí), ale s tím rozdílem, že testování probíhá na úrovni jednotlivých buněk. I když konečná příčina nemusí být vždy přímo spojená s odpovědí na testovaný široký stimulus, lze díky výsledkům takovýchto testů zacílit na konkrétnější dráhu a tu dále podrobněji zkoumat. Například buněčná



Obrázek 4: Heterogenita schopnosti reakce na stimulaci koreluje s klinickými výsledky. *Nádorové buňky, které mají relativně homogenní expresi povrchových a intracelulárních molekul v klidovém stavu (nestimulované), vykazují po stimulaci (G-CSF) různou schopnost odpovídat. Můžeme tak dále přesněji identifikovat vlastnosti jednotlivých nádorových buněk, což může korelovat s klinickými výsledky jednotlivých pacientů. Upraveno podle Irish et al. (108).*

odpověď na stimulaci virovými antigeny nám poskytuje informace o schopnosti buněk adaptivního imunitního systému odpovídat na případnou infekci tímto virem a dále pacienty rozřazovat do rizikových skupin. Toho jsme schopni díky porovnání výsledků u pacientů bez závažných klinických příznaků virové reaktivace s pacienty, kteří měli horší průběh virové reaktivace (34, 109).

Nedostatkem metody průtokové cytometrie a obecně všech metod, které v průběhu zkoumání funkcí jednotlivých buněk narušují původní tkáňovou strukturu, je ztráta kontaktu mezi jednotlivými buňkami. Následkem může být ztráta přístupu k nutrientům nebo vystavení mechanickým střižným silám, což může vést k inicializaci nebo změně nitrobuněčné signalizace. U většiny testů, které využívají plnou krev, se ukazuje, že touto chybou nejspíš

nejsou zatíženy, ale některé konkrétní dráhy (např. dráhy odpovědi na stres) mohou být citlivé na změnu, pokud je daná buňka vyjmuta ze svého přirozeného prostředí. I díky mnoha létům úspěšného výzkumu, navzdory tomuto potenciálnímu problému, se zdá, že nedochází k významnému zkreslování výsledků. Přesto je důležité mít tuto skutečnost neustále na paměti. Důležitou otázkou zůstává, jak efektivně spojovat výsledky z určení fenotypové diverzity a heterogenity signalizace na úrovni jednotlivých buněk s výsledky dalších metod tak, abychom dosáhli vývoje efektivnějších léčebných postupů a zároveň odhalili dostatečně robustní prediktivní znaky, kdy a za jakých okolností tyto léčebné postupy použít. V této práci popisují jeden konkrétní případ takového postupu, kdy jsme nejen na základě fenotypových a funkčních znalostí jednotlivých buněk adaptivního imunitního systému u konkrétních pacientů schopni identifikovat ohrožené pacienty a indikovat je v případě dalších komplikací k buněčné terapii.

1.5.2. Hmotnostní cytometrie

Silná stránka tradiční fluorescenční průtokové cytometrie (fluorescence) se ovšem ukazuje být zároveň její Achillovou patou. Protilátky konjugované s fluorochromy spolu s lasery, které hrají klíčovou roli při jejich excitaci, umožňují získávat cenné informace o buněčné aktivitě na úrovni jednotlivých buněk. Ovšem za situace, kdy jednotlivé buňky prochází až pěti laserovými paprsky v řádech milisekund, nemohou být všechny dostupné fluorochromy použity současně. Díky překryvům excitačních a emisních spekter fluorochromů, které jsou používány současně, může docházet k takzvaným „přesvitům“ v jednotlivých detekčních kanálech, což ve výsledku znesnadňuje měření. Je proto bohužel nutný pečlivý výběr a design reagensů v jednotlivých panelech, optimalizace laserů a filtrů pro excitaci a detekci emitovaných fotonů a v neposlední řadě také přesná kompenzace spektrálních překryvů. Všechny tyto nutné podmínky jsou někdy těžko splnitelné pro vědce, kteří na jedné buňce potřebují měřit více než 15 základních znaků. To je významný kontrast k metodám, které měří desítky tisíc různých mRNA molekul v jednom experimentu. A právě metoda hmotnostní cytometrie má do jisté míry schopnost tento kontrast mírně snížit.

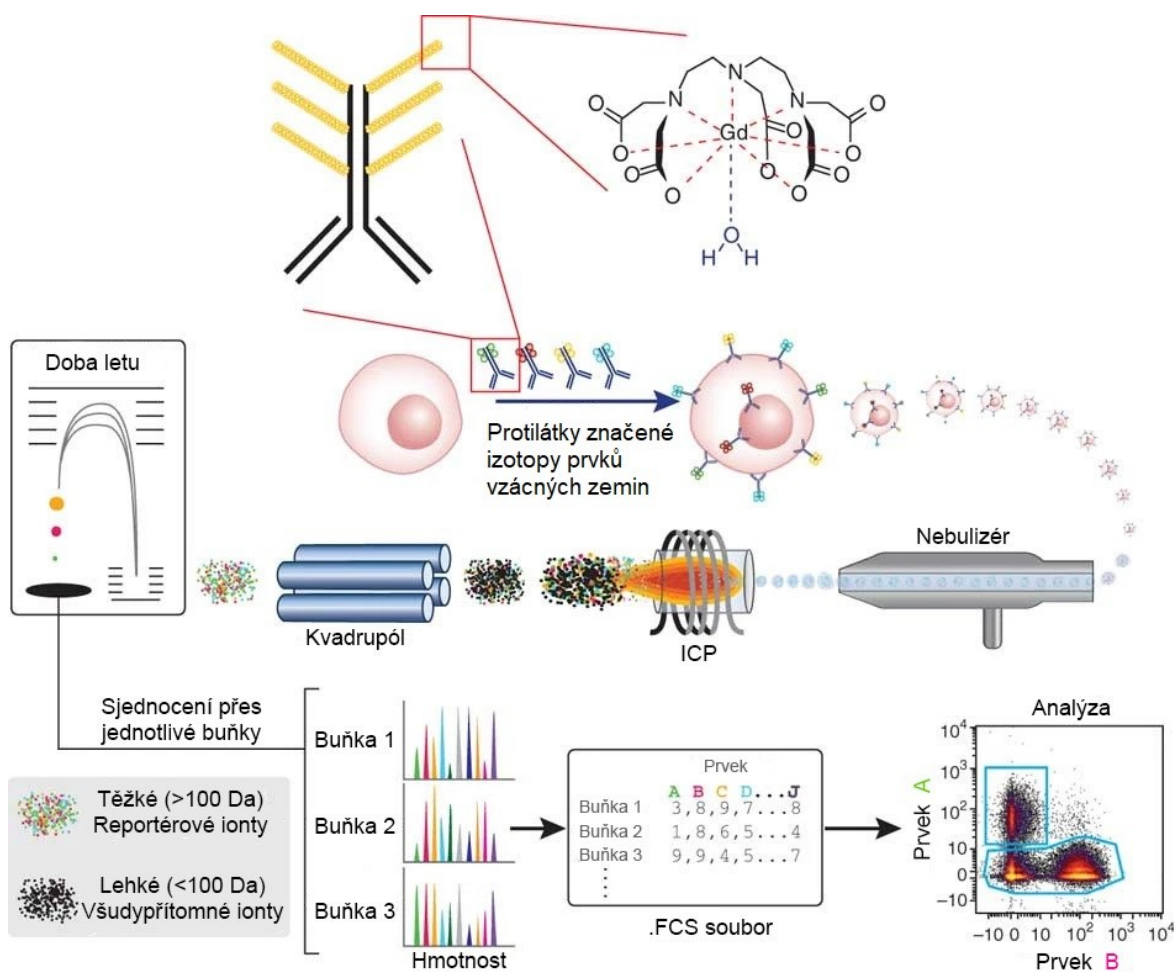
Hmotnostní spektrometrie byla v posledních deseti letech hojně využívanou „proteomickou“ metodou (110). V současné době má široké využití v různých biochemických analýzách díky kvantitativnosti, robustnosti, všestrannosti a citlivosti (při počítání iontů). Hmotnostní spektrometrie ovšem nedosahuje takové citlivosti, aby bylo možné měřit vzácné proteiny nebo jejich izoformy v takovém množství, v jakém se vyskytují v jednotlivých buňkách. A právě Scott Tanner z univerzity v Torontu použil hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) pro měření událostí na povrchu a uvnitř buněk (111). Principem této

metody je detekce antigenů protilátkami značenými prvky vzácných zemin, které se přirozeně v buňkách nevyskytují. Naznačené buňky po jedné procházejí argonovým plazmatem o teplotě 7 500 K a následkem toho dochází k tvorbě příslušných iontů z jednotlivých buněk. Tyto ionty dále prochází hmotnostním spektrometrem měřícím dobu letu nastaveným tak, aby detekoval právě izotopy o atomové hmotnosti prvků vzácných zemin, které byly použity pro značení protilátek. Každá molekula, která se nachází v každé jednotlivé buňce, je kompletně atomizována a ionizována a ty ionty, které mají příslušnou atomovou hmotnost, jsou následně detekovány na přístroji CyTOF, který vyvinul právě Tanner (111). Souhrnné úrovně výskytu jednotlivých izotopů z každé jednotlivé buňky jsou následně digitalizovány, uloženy a asociovány s jednotlivými buňkami na stejném principu jako data z fluorescenční průtokové cytometrie (Obr. 5).

Za použití hmotnostní cytometrie Bendall et al. (112) určili fenotyp a funkční profil u komplexních buněčných populací získaných z primárních vzorků kostní dřeně. Využili kombinaci značení povrchových molekul, fosforylačních epitopů a nukleových kyselin z různých 35 současně značených cílů na milionech buněk v jednom vzorku. Míra hloubky a spojitosti těchto dat umožnila objevit některé principy organizace systému kostní dřeně. Díky možnosti změřit dostatečné množství povrchových znaků v postupném vývojovém systému, jako je například vývoj hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni, bylo dále možné velice přesně rekonstruovat vývojové schéma a liniovou příbuznost mezi jednotlivými buněčnými typy (112, 113). Současným měřením několika různých intracelulárních odpovědí na buněčnou stimulaci bylo dále možné definovat profily, které odrážejí fenotypy různých buněčných funkcí na úrovni jednotlivých buněk a buněčných subpopulací (112, 114).

V současnosti nachází hmotnostní cytometrie využití v širokém profilování buněk imunitního systému, zánětlivých buněčných stavů nebo nádorových buněk. Zde se využívá stejných principů, které byly popsány v kapitole průtokové cytometrie. Nejčastěji se uplatňují panely zaměřené na pluripotenci (např. Nanog, c-myc, SOX2), buněčný cyklus (115) (obdobně jako s IdU, cyklin B1, cyklin A, fosforylace histonu H3, Rb, p21 a p27), apoptózu, poškození DNA (116), kinázy a povrchové CD znaky na většině hlavních subpopulací imunitního systému u myši a lidí, transkripční faktory a epigenetické modifikace, které dosahují až 50 detekovaných parametrů na jedné buňce. Hmotnostní cytometrie tak staví na základech, které se po tři dekády budovaly pro použití ve fluorescenční cytometrii.

Nedostatky hmotnostní cytometrie oproti fluorescenční průtokové cytometrii jsou zejména v rychlosti akvizice (v současné době lze nahrát 500–1000 událostí za vteřinu, což je přibližně



Obrázek 5: Princip analýzy vzorků pomocí metody hmotnostní cytometrie. Upraveno podle Bendall et al. (112).

20krát pomalejší než u fluorescenční průtokové cytometrie) a v nemožnosti zachytit optické vlastnosti buněk (přímý a boční rozptyl) (117). Tyto nedostatky tak na jedné straně vedou k dlouhým akvizičním časům a na druhé straně znesnadňují jednoduchou základní identifikaci buněk pomocí optických vlastností. V důsledku toho je i pro potřeby rozlišení buněk od nebuněčných příměsí nutné používat interkalační značení a buňky identifikovat až po akvizici celého vzorku, čímž se zvyšují datové nároky a opět dochází k prodlužování doby akvizice o nechtěné události. V této práci ukazují přístup, kdy se limity týkající se dlouhého času akvizice snažíme zmírnit použitím nových technik pro lepší přípravu vzorků, čímž dochází k celkovému urychlení nahrávání eliminací nechtěných eventů a minimalizaci tvorby dubletů (118).

Je důležité si uvědomit, že obě metody (jak fluorescenční, tak hmotnostní cytometrie) budou i nadále nejspíše fungovat paralelně a budou dále sloužit jako stěžejní metody pro zkoumání buněčné biologie. Jejich největší potenciál do budoucna je v jejich kombinaci s dalšími metodami umožňující rozlišení na úrovni jednotlivých buněk.

1.5.3. Sekvenování na úrovni jednotlivých buněk

V posledních letech dochází k hojnému využívání sekvenování na úrovni jednotlivých buněk (scRNA/DNA-seq) v různých oblastech imunologie. Jak bylo již řečeno, imunitní systém se skládá z mnoha součástí, bohužel ne všechny tyto součásti mohou být jednoduše roztrženy do jednotlivých „typů“ čistě na základě přítomnosti specifických fenotypových znaků. To je způsobeno tím, že mnoho těchto znaků je exprimováno vícero buněčnými liniemi nebo je jejich exprese různě regulována během zánětlivé odpovědi (119–121). Do nedávna byla většina studií zabývajících se genovou expresí omezena na analýzu celých populací s podobným povrchovým fenotypem, které byly získány různými způsoby obohacování buněk imunitního systému. Díky těmto analýzám transkriptomů byly objeveny nové a jedinečné znaky, které tyto populace dále rozdělují do dalších subpopulací. Bohužel takovýto typ analýzy nebere do úvahy rozdíly v genové expresi jednotlivých buněk nebo možnost kontaminace nepřibuznými buňkami, které ale mají podobný fenotyp. Výsledkem toho je, že významná biologická heterogenita uvnitř jedné populace může být maskována a průměrována irelevantními signály právě díky těmto buněčným kontaminacím (122). Průměrování výsledků je zavádějící zejména pokud studujeme dočasně dynamické procesy, jako je například vývoj z progenitorové buňky do terminálně diferenciované buněčné populace přes několik přechodových stádií. Právě analýza celých populací, které se nacházejí v nepřetržitém sledu diferenciacních a aktivačních stavů vede, na rozdíl od analýzy jednotlivých buněk, k průměrování jednotlivých specifických charakteristik a tím dochází ke ztrátě biologicky důležitých informací.

Pokroky na poli sekvenování nové generace teprve nedávno umožnily zkoumat imunitní systém na úrovni jednotlivých buněk. Nyní existují tři hlavní skupiny sekvenování na úrovni jednotlivých buněk: a) sekvenování celého genomu (WGS), b) sekvenování celého mRNA transkriptomu a c) cílené sekvenování specifických oblastí DNA (exomové sekvenování) nebo mRNA transkriptů. V současné době dochází k hojnému využití scRNA-seq zejména za účelem podrobnějšího rozdělení buněčných populací, které pomocí dřívějších metod nemusely být dostatečně rozpoznány (123, 124), k definici klíčových procesů ve vývoji a diferenciaci buněk (125, 126), k dohledání kritických vývojových větví v hematopoéze (127–129) a ke studiu genových regulačních drah, které mohou predikovat buněčnou funkci v imunitním systému (130–132). Statický pohled do transkriptomů na úrovni jednotlivých buněk tak může ukázat různá buněčná stadia diferenciaci a aktivace, která jsou jen velmi zřídka synchronizována mezi jednotlivými buňkami.

Variantou sekvenování DNA nebo RNA na úrovni jednotlivých buněk je stanovení „klonality“ u nádorových onemocnění nebo při studiu repertoárů T a B lymfocytů. V tomto případě se

využívá předpokladu, že jednotlivé klony by se měly chovat stejně. Nejedná se o analýzu na úrovni jednotlivých buněk jako takovou, jelikož vychází z analýzy různých populací buněk, které byly předem cíleně obohaceny o buňky zájmu. Výsledky klonálních analýz pak dedukují zastoupení jednotlivých klonů podle četnosti jejich zastoupení v celém datovém souboru sekvenačních dat. Jelikož jsme metodu analýzy přítomnosti jednotlivých klonů využili při zkoumání T buněčných subpopulací u pacientů po transplantaci ledvin (36), jsou další podrobnosti uvedeny v následující kapitole.

Současná omezení pro sekvenační analýzy na úrovni jednotlivých buněk jsou hlavně jejich cena a časová náročnost. Tím dochází k omezení absolutního množství buněk, které lze sekvenovat, na několik málo stovek z každého vzorku, kdy zpracování jednoho vzorku může trvat týden i déle. Tyto hodnoty jsou neporovnatelně nižší oproti průtokové cytometrii, která dokáže zpracovat miliony buněk během několika minut. V budoucnu lze očekávat, že metody scRNA-seq budou konkurovat tradičním metodám. Do té doby se ale většina scRNA-seq aplikací bude muset spoléhat na průtokovou cytometrii, která umožňuje izolaci pouze omezeného množství nejzajímavějších buněk pro následnou sekvenační analýzu.

1.5.3.1. Analýza repertoáru B a T buněk

Analýzu antigenních receptorů B a T lymfocytů lze využít k charakterizaci klíčových vlastností adaptivní složky imunitního systému, jako jsou diverzita celkového repertoáru, klonální expanze a vlastnosti jednotlivých receptorů. Tyto B a T repertoárové znalosti nám pak umožňují studovat stav adaptivního imunitního systému v kontextu například klidového stavu, infekce, vakcinace, vývoje lymfocytů a autoimunitních onemocnění. V současné době se analýza repertoáru B a T buněk používá hlavně ke sledování konkrétního klonu v organismu, ke studování repertoárových vlastností a k identifikaci veřejných klonů (133).

Sledování jednotlivých klonů je založeno na předpokladu, že jsou B a T buněčné repertoáry odlišné s pouze nepatrnou šancí, že dva různé klony B a T buněk mají shodnou sekvenci TCR β nebo IGH. Proto lze sekvenci nukleotidů tvořící TCR nebo B buněčný receptor (BCR) považovat za téměř unikátní molekulární značku, která definuje jednotlivé klony. Díky tomu můžeme pak tyto klony sledovat napříč tkáněmi nebo buněčnými populacemi. Hlavní použití sledování klonů je ve sledování minimální reziduální nemoci u leukémií (134). To nám umožňuje sledovat reziduální leukemické buňky po léčbě s vysokou senzitivitou (až 10^{-6}) a přesností. Dále je možné například sledovat klony B a T lymfocytů přes různá maturační stádia při analýze odpovědi na vakcinaci. Můžeme tak přímo zjistit, kolik různých klonů dospěje po vakcinaci do stádia centrálních paměťových buněk, a tím stanovit úspěšnost vakcinace (135).

Součástí této práce je studie, ve které jsme použili sledování CMV specifických klonů u pacientů po transplantaci ledviny ke zmapování jejich výskytu v bioptických vzorcích (36).

Analýzy repertoáru B a T lymfocytů se používají například při určování dostatečné protekce proti cizím patogenům, kdy se předpokládá, že rozmanitý BCR a TCR repertoár je pro zajišťování této protekce zásadní. Například u pacientů se SCID nebo u pacientů po HSCT, kteří mají velmi redukovanou klonální diverzitu, dochází k častým infekcím ve srovnání se zdravými jedinci (136, 137). Zdá se, že omezená rozmanitost BCR a TCR repertoáru hraje také roli při zhoršení funkcí imunitního systému během stárnutí (138).

Identifikace veřejných klonů je vhodný nástroj pro diagnostiku expozice některému patogenu. Seznam veřejných klonů je obzvlášť dobře znám u CMV a EBV specifických T lymfocytů (139, 140). V budoucnu by mohla identifikace veřejných klonů při autoimunitních onemocněních nebo identifikace specifických klonů proti konkrétnímu nádoru sloužit jako časný biomarker těchto onemocnění.

1.6. Analýza dat

Data z fluorescenční i hmotnostní cytometrie stejně jako sekvenční data postupně plní vědecké databáze a s tím, jak roste množství jejich dimenzí a množství událostí, začíná být nemožné tato data plně využít bez použití nových analytických nástrojů. Hlavním požadavkem je, aby takové nástroje dokázaly odhalit proteomické a/nebo transkriptomické kombinace znaků, které dokážou identifikovat komplexní a rozmanité buněčné fenotypy ve smíšených buněčných populacích. Zatímco tradiční biaxiální zobrazení dat spolu se supervidovanou expertní analýzou jsou stále považovány za zlatý standard při analýze cytometrických dat, je zřejmé, že s nástupem moderní mnohparametrické éry je nutné začít využívat nástroje, které tato data dokážou přesně a souhrnně zobrazit (141). V následující pasáži se věnuji hlavním rozdílům mezi expertní (supervidovanou) a nesupervidovanou analýzou cytometrických dat.

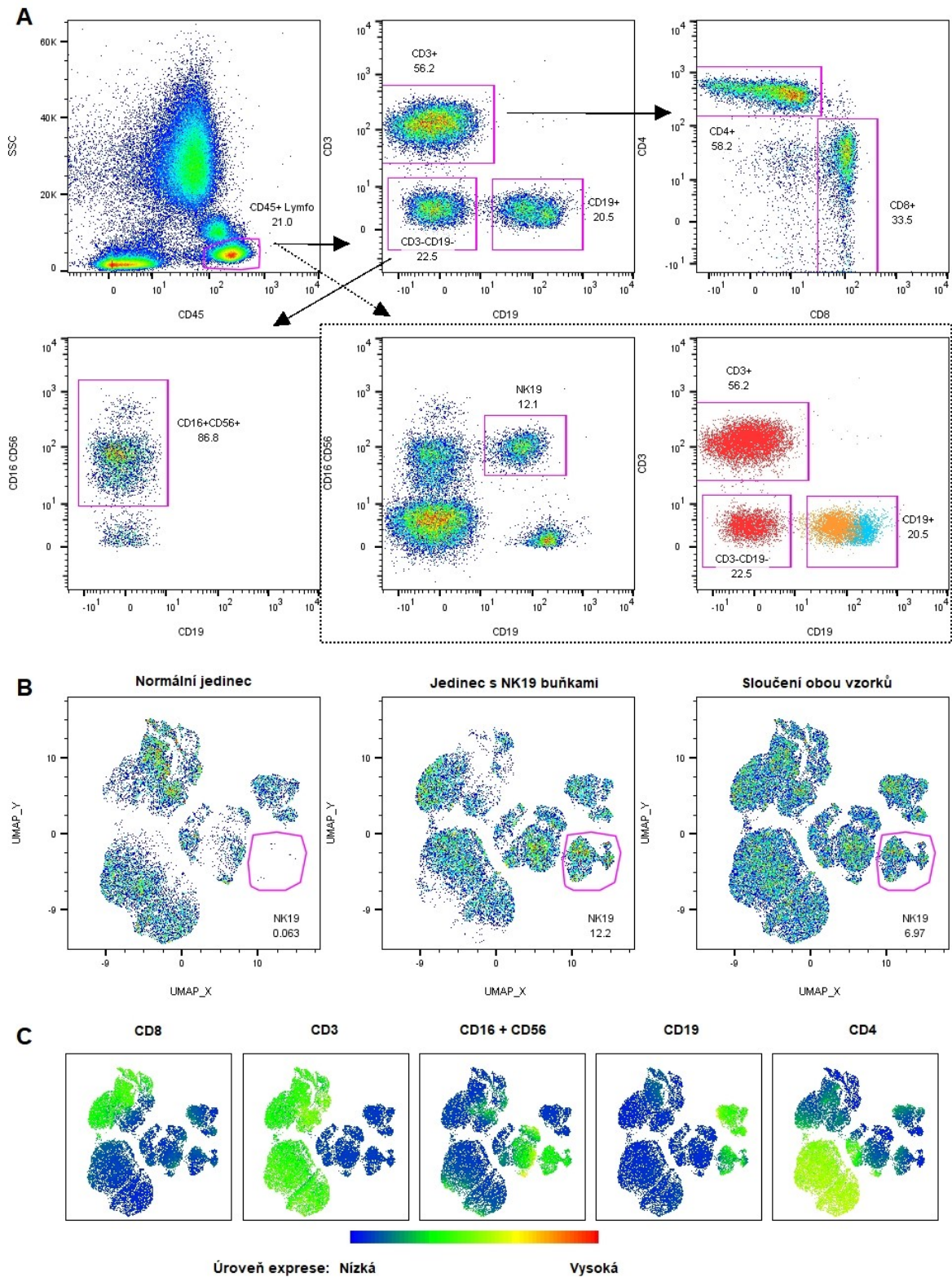
Jak již bylo řečeno, historicky se pro analýzu cytometrických dat používají série 2D grafů a manuální ohraničování (gating) populací zájmu. Takto identifikované populace jsou buď opětovně rozděleny na dalším 2D grafu za použití jiných parametrů nebo jsou stanovovány jejich kvalitativní a kvantitativní vlastnosti (populace je přítomna nebo nikoli, v jaké míře je zastoupena, atd.). I když je tento postup stále vhodnou analyzační metodou v řadě případů, trpí několika vážnými nedostatky. Za prvé, s množstvím přibývajících parametrů stoupá množství 2D grafů potřebných pro zobrazení všech kombinací exponenciálně (pro analýzu 18ti parametrického experimentu by bylo potřeba projít 153 2D grafů). Za druhé, jak bylo několikrát

dokázáno v multicentrických studiích, manuální gating je jednou z největších proměnných ve výstupu z experimentu, který je založen na cytometrických metodách (142). Za třetí, každá manuální analýza dat spoléhá na předchozí znalost, čímž částečně tíhne k „očekávaným“ výsledkům. Díky tomuto tunelovému vidění, může dojít k přehlédnutí nebo pomnutí mnoha potenciálně relevantních a nových informací, které zkoumaný datový soubor může obsahovat. Tyto nevýhody se nutně nemusí uplatňovat jen u dat s vyšším počtem parametrů (12+), ale mohou být patrné už při analýzách dat s nižším počtem parametrů. To lze vidět na příkladu šesti parametrických dat (Obr. 6), kdy se nám podařilo u čtyř jedinců identifikovat novou populaci NK buněk (NK19), která na svém povrchu nese molekulu specifickou pro B lymfocyty (CD19) a zároveň má neproduktivně přestavěné imunoglobulinové řetězce. Tyto buňky tak naznačují existenci alternativního osudu pro B lymfocyty, jejichž B buněčný receptor není produktivně přestaven (dosud nepublikovaná data).

Právě pro překonání výše zmíněných problémů začalo hned několik vědeckých skupin s vývojem komputačních metod, které automaticky identifikují populace v mnohadimenzionálních cytometrických datech. První studie se objevily už v roce 2007 a vytvořily tak celé nové odvětví způsobu analýzy dat (143–145). Od té doby se objevila celá řada algoritmů, které dokážou analyzovat, klasifikovat a identifikovat buněčné populace v cytometrických datech (141, 146–155). I přes velkou snahu bohužel nejsou tyto metody stále využívány širší imunologickou komunitou, nejspíš díky složitějšímu osvojování si nových technologií nebo díky tomu, že většina těchto metod byla publikována v bioinformatických časopisech. V neposlední řadě má mnoho těchto komputačních analýz poměrně vysoké hardwarové nároky, a ne všechny algoritmy je možné používat alespoň bez základních znalostí některého z programovacích jazyků jako je R, Python, Java nebo Matlab.

1.7. Mnohparametrické metody umožňující rozlišení na úrovni jednotlivých buněk v klinické praxi

Abychom mohli lépe pochopit lidské biologické procesy a patologické stavy imunitního systému, je nejprve nutné pochopit biologickou komplexitu lidského imunitního systému. Tento nelehký úkol je možný díky novým a stále zdokonalovaným metodám, které identifikují klinicky relevantní populace buněk imunitního systému, tak jak bylo popsáno v předchozích kapitolách této práce. Schopnost porozumění způsobu imunitní odpovědi nás nejen vybavuje znalostmi pro použití různých buněčných terapií, ale umožňuje i „běžnou“ léčbu pomocí různých léčiv, které mají za cíl manipulaci s imunitním systémem (156). Nejsložitější je ovšem



Obrázek 6: Výhody nesupervidovaných analýz. (A) Možné strategie analýzy 6-ti parametrického panelu pro stanovení populací T, B a NK buněk. Plné šipky ukazují konvenční analytický přístup. Tečkovaně je znázorněna populace NK19 buněk, která je opomenuta konvenčním přístupem. Překryvný graf ukazuje příčinu opomenutí (modře B lymfocyty, oranžově NK19 buňky, červeně ostatní lymfocyty). (B) Nesupervidovaná analýza dat jasně identifikuje populaci NK19 buněk, která se běžně téměř nevyskytuje. (C) Míra exprese korespondujících znaků na daných klastrech.

odhalovat klinicky relevantní profily imunitního systému tak, aby došlo ke snížení množství informací a zjednodušení do biologicky a klinicky relevantních postupů, které by umožnily určit specifický postup léčby u jednotlivých pacientů. Zde se právě nejvíce uplatňují kombinace mnohparametrických metod na úrovni jednotlivých buněk spolu s novými postupy statistické analýzy dat. Tyto přístupy umožnily vytvořit globální modely biologických procesů u zdravých a nemocných jedinců (157). U některých onemocnění již dokonce byly identifikovány takové molekulární profily, které snad povedou k lepšímu pochopení asociovaných patofyziologických projevů a možná i k vývoji specifických terapeutických přístupů (158, 159). Jedním z úspěšných příkladů léčby specificky podle typu onemocnění je použití tyrosin kinázových inhibitorů u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (160). Jiným příkladem je použití přípravků, které modulují imunitní funkce, jako anti-CTLA-4 protilátky, které cílí na protein CTLA-4 (161), jenž je zodpovědný za udržování tolerance u zvířecích modelů (162). Při hledání klinicky významných znaků, které by mohly pacienta zařadit do určité rizikové skupiny nebo predikovat úspěšnost dané léčby, je důležité posuzovat výsledky mnohparametrických metod v širším kontextu. Reakce imunitního systému jsou totiž řízeny mnoha faktory, a právě vyvážená souhra těchto faktorů vede k regulaci odpovědi imunitního systému. Například, IL-2 je spojován s autoimunitními onemocněními i přesto, že podporuje expanzi Treg buněk. Nedávno bylo dokonce zjištěno, že IL-2 inhibuje produkci IL-17 nezávisle na Foxp3 a ROR γ t, jelikož rovnováha mezi relativním množstvím aktivace STAT3 a STAT5 směřuje CD4⁺ T buňky do Th17 linie (163). Z toho jasně vyplývá, že právě vyváženost jednotlivých molekul, spíše než jejich absolutní množství, je klíčová pro vývoj Th17 buněk. Pomocí standardních esejí používaných pro monitoring imunitního systému nejsme schopni zachytit takové drobné rozdíly, které nakonec vyústí v naprosto odlišné funkce imunitního systému. Proto jsme v této práci při evaluaci účinnosti nových inhibitorů Th17 buněk využili komplexního testování *ex vivo* buněčných vzorků tak, abychom získali celkový obraz vlivu těchto inhibitorů i v kontextu ostatních buněčných populací. I díky tomu jsme mohli prokázat inhibiční vliv nových vysoce afinitních binderů na Th17 buňky (164, 165). Dalším příkladem užitečnosti měření vysokého množství parametrů na jedné buňce pro klinické využití je rozdílnost vývoje T lymfocytů, pokud pochází z fetálních nebo dospělých hematopoetických kmenových buněk (HSC). Nedávné modely totiž poukazují na vývojovou závislost při tvorbě T lymfocytů. Fetální T lymfocyty a T lymfocyty u dospělých lidí pochází z rozdílných HSC populací. Fetální T lymfocyty jsou spíše imunotolerantní, kdežto T lymfocyty u dospělých lidí odpovídají spíše prozánětlivě (166). Analýza genové exprese fetálních T lymfocytů a těch, které byly izolovány od dospělých lidí, jasně ukazuje klinicky relevantní rozdíly. Prekurzorové CD4⁺

T lymfocyty se zdají být fenotypově identické, ale mají odlišnou funkci, kterou určuje odlišná vrstva prekurzorové HSC buňky (166). Tento jev může mít například důsledek pro transplantace hematopoetických kmenových buněk, kde se používá jako zdroj HSC buňky pupečnicková krev nebo mobilizované CD34+ buňky z periferní krve dospělého dárce. Na těchto příkladech se ukazuje, že zejména analýzy dat s vysokým počtem parametrů mohou odhalit nepatrné, ale biologicky důležité rozdíly v aktivaci, diferenciaci nebo maturaci imunitních buněk, které mají vysokou míru plasticity s odpovídajícími imunologickými významy (167).

V dnešní době je již mnoho pacientů léčeno způsobem, kdy se cíleně míří na ovlivnění nebo omezení účinků imunitního systému tak, aby došlo k vyléčení určitého onemocnění. Asi nejvíce zavedeným přístupem je transplantace hematopoetických kmenových buněk pacientům s leukémií nebo jinými malignitami. Takováto léčba je v podstatě empiricky vyvinutá a vysoce efektivní u vybraných pacientů, ale vlastní imunitní procesy, které ovlivňují výsledek, jsou známy jen velice povrchně a pomocí současných běžných způsobů sledování nemohou být ani dostatečně přesně vyhodnoceny. Dokonce i různé klinické komplikace, které mohou nastat po HSCT, jsou spojeny s funkcemi imunitního systému, ale je poměrně obtížné tyto komplikace předpovídat bez použití mnohparametrických přístupů. V této práci ukazují konkrétní příklad, kdy se nám díky mnohparametrické průtokové cytometrii podařilo definovat specifické T buněčné populace, jejichž přítomnost spolu s dalšími faktory predikuje úspěšnou kontrolu CMV reaktivace (34). U jiných onemocnění, například u chronických infekcí, může imunitní systém dojít až do stavu imunitní senescence nebo imunitního vyčerpání, pro které je typické celkové snížení imunitních funkcí. Podobný stav můžeme také sledovat u zdravých lidí v pokročilém věku. V současné době se zdá, že oba tyto stavy jsou regulovány nezávisle na sobě (168). Stále nám ale chybí přesnější molekulární a funkční data, abychom pochopili, jak dochází k těmto projevům v různých klinických situacích. Až teprve mnohparametrická data na úrovni jednotlivých buněk nám mohou odhalit jemné rozdíly mezi pacienty a zdravými jedinci, nebo rozdíly mezi pacienty, kteří reagují na léčbu modulace funkce imunitního systému a těmi, u kterých je léčba neúčinná.

Pro správné využití mnohparametrických dat na úrovni jednotlivých buněk je potřeba zajistit několik předpokladů: a) je potřeba mít dobře dokumentované kohorty pacientů spolu s velmi přesnými klinickými údaji, b) je důležité pacienty sledovat v longitudinálních studiích, aby bylo možné zachytit dynamiku imunitní odpovědi po dobu trvání nemoci nebo léčby (s tím souvisí i nároky na dobrou laboratorní praxi a jednotnost získávaných dat), c) je potřeba využívat zevrubné a nesupervidované algoritmy pro analýzu dat tak, aby jednak bylo možné integrovat všechny získané informace do jednoho souboru dat a zároveň aby nedocházelo k přehlédnutí

některých méně zřetelných, leč důležitých rozdílů. Studie Newell et al. (114), Mold et al. (166) a Bendall et al. (112) jsou toho dobrým příkladem.

1.7.1. Potřeba personalizované medicíny

Lze očekávat, že budoucí přístupy v léčbě různých onemocnění budou založeny na individualizovaných přístupech šitých na míru konkrétnímu pacientovi. Individualizovaná neboli personalizovaná medicína by tak měla být založena na datech, jež popisují rozdíly mezi jednotlivci a podle toho by měla být následně volena léčba pro konkrétního pacienta. Současná klinická měřítka mnohdy nedostatečně zachycují komplexní souhru mezi buňkami a molekulami, které hrají roli v rozmanitých imunitních procesech, jenž se mohou odehrávat odlišně u jednotlivých pacientů. V roce 2010 popsala Společnost pro imunoterapii rakoviny hlavní problémy při implementaci imunoterapií do klinické praxe. Jedná se hlavně o nedostatek spolehlivých biomarkerů při hodnocení efektivity léčby a o nedostatek jednoznačných identifikátorů konkrétní nemoci, na jejichž základě by mohla být léčba přizpůsobena konkrétnímu pacientovi (169). Navzdory těmto problémům existuje několik nedávných příkladů, kdy se podařilo zavést do klinické praxe několik imuno-modulačních léků a přístupů. Pro léčbu rakoviny byly vyvinuty různé monoklonální protilátky včetně PD-1/PD-L1 a CTLA-4 cílených protilátek jako jsou nivolumab (Bristol-Myers Squibb, NY, USA), pembrolizumab (Merck, NJ, USA), tremelimumab (Pfizer, NY, USA) nebo ipilimumab (Bristol-Myers Squibb, NY, USA), které ukazují reálnou odpověď zhruba u 10 – 25 % případů. Působením těchto léků dochází k blokaci ko-inhibičních molekul na cytotoxických T lymfocytech a jejich následné plně funkční protirakovinné odpovědi (170, 171). Nejúčinnější se zdá dokonce kombinace léčby oběma inhibičními protilátkami, kdy dochází k odhojení nádoru zhruba u 50 – 65 % případů (43). V současné době není známo, jaké imunologické pozadí je nezbytné pro úspěšnou terapii inhibitory CTLA-4 a PD-1. Pravdou je, že tato léčba je úspěšná pouze u části pacientů. Pokud tyto pacienty budeme dále systematicky vyšetřovat pomocí mnohparametrických esejí, které budou zaměřeny na funkčnost imunitního systému, měli bychom být schopni najít klíčové biologické markery a predikovat úspěšnost léčby u každého jednotlivého pacienta.

1.7.1.1. Antivirová adoptivní imunoterapie

Specifickým příkladem personalizované medicíny jsou postupy adoptivních transferů specifických T buněk (ACT). Toto odvětví transfúzní medicíny se v posledních letech rychle rozvíjí a zahrnuje podání lymfocytů, které zprostředkovávají protinádorové, protivirové nebo protizánětlivé účinky. Obzvláště na poli protinádorové léčby došlo k velkým pokrokům, kdy

bylo schváleno americkou FDA použití T lymfocytů nesoucích chimérický anti-CD19 T buněčný receptor pro léčbu refrakterních pre-B akutních leukémií a difuzního velkobuněčného B-lymfomu. Vzhledem k zaměření této práce se dále podrobněji věnuji pouze anti-virovým adoptivním transferům T lymfocytů.

Antivirové adoptivní imunoterapie byly vyvinuty hlavně pro léčbu virových komplikací po HSCT. Pacienti po HSCT se nacházejí v přechodném stavu imunosuprese, kdy jsou velmi náchylní k virovým infekcím, jak bylo popsáno v kapitole 1.2. Současné přístupy farmakologické léčby virových komplikací nejsou dostačující, mají vedlejší toxické efekty a hlavně necílí na příčinu těchto patofyziologických projevů, již je nedostatečná funkce virus specifické T buněčné složky imunitního systému (172–174). Tato protektivní odpověď imunitního systému byla popsána jako detekce specifické T buněčné odpovědi v periferní krvi (109).

Novým přístupem, jak zvýšit odpověď imunitního systému na virové patogeny po HSCT, je adoptivní přenos virus specifických T lymfocytů (175). Takovou buněčnou terapii je ovšem nutné připravit individuálně pro každého pacienta, čímž je její široké použití významně limitováno. Ukazuje se také, že pro účinný adoptivní přenos virus specifických buněk je důležitá nízká hladina imunosuprese, jelikož vysoké dávky podávaných steroidů by jinak potlačovaly protivirové účinky. Toto je i v souladu s naším pozorováním, kdy jsme právě díky kombinaci klinických dat a mnohparametrické detekci specifické virové odpovědi byli schopni jednak vytipovat pacienty, kteří mají vysoké riziko reaktivace CMV (34) a zároveň sledovat kinetiku protektivních CMV specifických T buněk po adoptivním přenosu. Zdá se, že v těchto případech může jako dárce virus specifických T lymfocytů sloužit nejen původní dárce použitý pro HSCT, ale i jiný příbuzný dárce. Hlavním limitujícím faktorem při přípravě protivirových adoptivních přenosů je včasná identifikace vhodných dárců, která by v ideálním případě měla probíhat ve stejnou chvíli, kdy se hledá dárce pro HSCT.

V současné době probíhá třetí fáze mezinárodní klinické studie, která by měla umožnit budoucí zahrnutí virus-specifických adoptivních přenosů T buněk do léčebných protokolů, jako standartní léčbu refrakterních virových infekcí po HSCT. Adoptivní transfery jsou nyní vlastně vrcholem využití všech znalostí imunitního systému, které byly získány léty výzkumu a zejména mnohparametrické metody umožnily přesnou identifikaci vhodných buněk pro léčbu a jejich následné sledování v příjemci.

2. CÍLE PRÁCE

- a) Identifikovat takovou populaci T lymfocytů, která je zodpovědná za kontrolu CMV reaktivace u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk a zároveň určit její funkční profil.
- b) Najít takové funkční znaky T lymfocytů, které by mohly být použity při klinickém rozhodování u pacientů s CMV reaktivacemi.
- c) Určit fenotypové a funkční charakteristiky buněk vhodných pro adoptivní přenos u pacientů s častými CMV reaktivacemi.
- d) Rozpoznat klony T lymfocytů, které jsou zodpovědné za odhojení transplantovaných ledvin a které zprostředkovávají ochranu proti CMV.
- e) Zmapovat výskyt zkříženě-reaktivních T lymfocytů u pacientů po transplantaci ledvin.
- f) Zavést metodu hmotnostní cytometrie s ohledem na získání co největšího množství informace o buněčném a funkčním složení periferní krve.
- g) *Ex vivo* otestovat funkci a vliv vysoce afinitních binderů IL-23p19 a IL-23R na Th17 lymfocytech.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

Pro tuto práci byly použity primární vzorky periferní krve od pacientů (n=230) v různých časových bodech po transplantaci hematopoetických kmenových buněk, od pacientů (n=11) před transplantací ledviny a vzorky od zdravých dárců (n=20). Z těchto vzorků byly vyizolovány periferní mononukleární buňky (PBMC) přes hustotní gradient pomocí Ficoll-Paque™ (detailně popsáno v přílohách 9.1, 9.2, 9.3, 9.4 a 9.5) nebo také pomocí námi navržené CD81+ afinitní chromatografie (tzv. CD81+ T-Catch™) (n=7), což je detailně popsáno v příloze 9.3. Takto vyizolované buňky byly dále použity do dalších esejí, případně u pacientů před transplantací ledviny byly jejich vyizolované PBMC zamrazeny do tekutého dusíku pro pozdější použití. Dále byly použity vzorky tkáňových biopsií ledvin (n=7) u pacientů po transplantaci ledviny (popsáno v příloze 9.2).

3.2. Detekce fenotypových a funkčních profilů lymfocytů

Pro detekci fenotypových profilů různých lymfocytů byla použita jednak metoda průtokové fluorescenční cytometrie (detailní popis v přílohách 9.1, 9.2, 9.4 a 9.5) nebo metoda hmotnostní cytometrie (popsáno v příloze 9.3). Pro stanovení různých funkčních profilů T lymfocytů po stimulaci antigenem nebo nespecifické stimulaci anti-CD3 protilátkou byla použita metoda intracelulárního značení cytokinů (ICS) pomocí průtokové fluorescenční cytometrie (pracovní postup je podrobně uveden v přílohách 9.1, 9.4 a 9.5).

3.3. Přímá a proliferační detekce CMV a alo specifických T lymfocytů

Pro přímou detekci CMV specifických T lymfocytů, které rozpoznávají konkrétní CMV peptidový fragment, bylo použito značení pomocí multimerů, které obsahují pět molekul komplexu MHC – peptid (Pro5® MHC Class I Pentamers, ProImmune Ltd., Oxford, Velká Británie) a umožňují tak přímou senzitivní detekci CMV specifických CD8+ T lymfocytů. Podrobný protokol značení je popsán v příloze 9.2.

Pro proliferační detekci CMV a alo specifických T lymfocytů byla použita metoda ředícího značení, kdy jsou všechny buňky nejprve označeny fluorescenční značkou, jejíž intenzita během buněčného dělení v reakci na stimulaci antigenem postupně klesá. Abychom mohli identifikovat všechny proliferující buňky, bylo nutné nechat buňky v esejí po dobu šesti dnů a následně přistoupit k povrchovému značení (postup detailně popsán v příloze 9.2).

3.4. Izolace virus a alo specifických T lymfocytů

Antigen specifické T lymfocyty byly izolovány pomocí tří metod:

1. Za účelem zkoumání klonality antigen specifických T lymfocytů, které proliferovaly v reakci na přítomnost antigenu, byla pro jejich izolaci použita metoda buněčného sortování pomocí buněčného sorteru. Postup značení a separace je popsán v příloze 9.2.
2. Pro separaci virus specifických T lymfocytů pro klinické použití (buněčná terapie) u pacientů s protražovanou CMV DNAemií byly použity dvě různé metody:
 - a. Metoda přímé izolace pomocí značení MHC streptamery, které obsahovaly konkrétní CMV specifický peptid, a magnetickými kuličkami (Stage Cell Therapeutics, Göttingen, Německo). Tato izolace probíhala v GMP prostředí na oddělení buněčných terapií Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze z mononukleární frakce aferetického produktu předem vybraného dárce na přístroji CliniMACS (Milteneý Biotec, Bergish Gladbach, Německo). Pro každou separaci bylo nutné aferetický produkt nejprve naředit na finální objem 500 ml pomocí CliniMACS pufru (Milteneý Biotec, Bergish Gladbach, Německo) a dvakrát promýt (210 g, 20 min, 4°C) pro odstranění trombocytů. Následně byla koncentrace buněčné suspenze upravena na 2×10^7 buněk/ml a inkubována s odpovídajícími magneticky označenými MHC streptamery (20 min, 4°C). Nenavázané MHC streptamery byly následně dvakrát odmyty (340 g, 20 min, 4°C) pomocí CliniMACS pufru suplementovaného na 20 % lidským sérovým albuminem (HSA) (Baxter, Unterschleißheim, Německo). Následně byly buňky resuspendovány ve 200 ml CliniMACS pufru a magneticky označené virus specifické T lymfocyty izolovány na přístroji CliniMACS za použití CliniMACS Tubing set LS a CD34 selekčního programu II (vše Milteneý Biotec, Bergish Gladbach, Německo). Výsledná frakce byla doplněna do 100 ml pomocí CliniMACS pufru a pro získání nativních antigen specifických T lymfocytů byl přidán roztok d-biotinu (Stage Cell Therapeutics, Göttingen, Německo) ve finální koncentraci 1 mmol/l po dobu 20 minut při 4°C. Uvolněné MHC streptamery byly dále odstraněny dvojitým odmytím pomocí 500 ml CliniMACS pufru (340 g, 20 min, 4°C). Výsledné vyseparované CMV specifické T buňky byly naředěny 10 ml HSA a připraveny pro podání pacientovi. Celý proces probíhal v laminárním boxu (třídy A) a v superčistých prostorách (třídy B).
 - b. Metoda izolace virus specifických buněk na základě produkce IFN γ po stimulaci daným antigenem. Celý proces stimulace a izolace CMV specifických T lymfocytů probíhal pomocí automatizovaného systému CliniMACS Prodigy® (Milteneý Biotec, Bergish Gladbach, Německo). Tato metoda je založena na zachytávání uvolněného IFN γ

buňkami, které specificky reagují na přítomnost daného peptidu, na jejich povrchu a následném značení takto zachyceného IFN γ magnetickými partikulami. Takto označené buňky jsou následně magneticky separovány od ostatních. Celý pracovní postup je popsán v publikaci Kumaresan et al. (176).

3.5. Extrakce DNA a sekvenování nové generace

Extrakce DNA, příprava sekvenačních knihoven a samotné sekvenování nové generace z vysortovaných buněk a z buněk získaných po biopsii ledvin pro klonální analýzu antigen specifických T buněčných receptorů probíhala podle postupu popsaného v příloze 9.2.

3.6. Vliv binderů na proliferaci Th17 buněk

Pro zkoumání vlivu nových vysoce afinitních binderů vážících se na IL-23R a IL-23p19 jsme nechali vyizolované PBMC buňky od dobrovolných dárců proliferovat po nespecifické anti-CD3 stimulaci v přítomnosti IL-23, IL-2 a těchto různých binderů, jak je podrobněji popsáno v přílohách 9.4 a 9.5.

3.7. Protilátky pro průtokovou a hmotnostní cytometrii

Protilátky použité pro průtokovou fluorescenční cytometrii jsou uvedeny v přílohách 9.1, 9.2, 9.4 a 9.5. Protilátky použité pro hmotnostní cytometrii jsou uvedeny v příloze 9.3.

3.8. Statistické a nesupervidované analýzy dat

Jednotlivé analýzy a použité statistické metody jsou popsány v přílohách 9.1, 9.2, 9.3, 9.4 a 9.5.

4. VÝSLEDKY

Následující kapitola je členěna tak, aby odpovídala jednotlivým cílům práce, které byly definovány v kapitole 2.

4.1. Identifikovat takovou populaci T lymfocytů, která je zodpovědná za kontrolu CMV reaktivace u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk a zároveň určit její funkční profil.

Pelák, O. *et al.* Appearance of cytomegalovirus-specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic stem cell transplantation. (2017). Viz příloha 9.1.

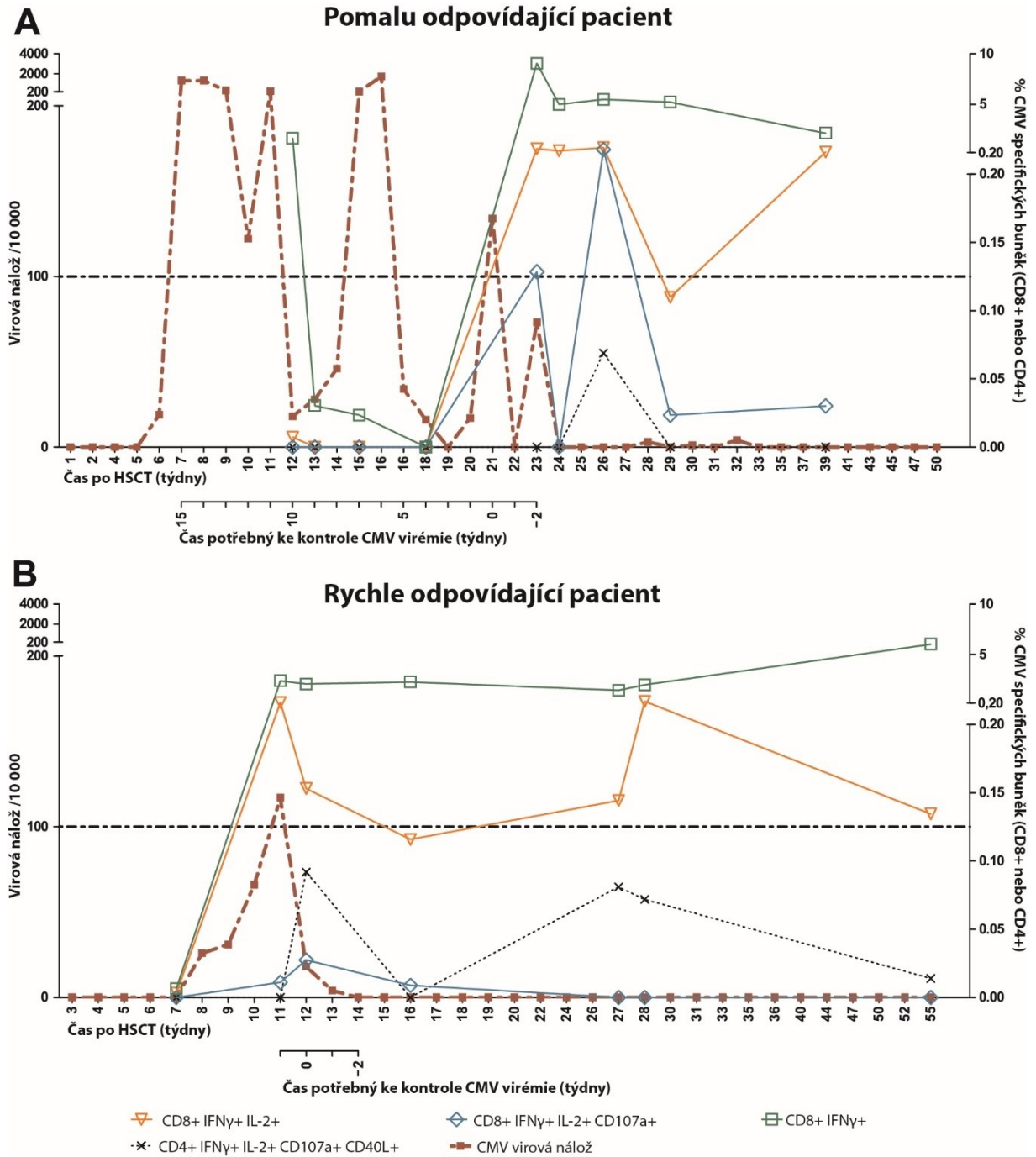
Po transplantaci hematopoetických kmenových buněk dochází k častým reaktivacím cytomegaloviru, což je způsobeno posttransplantačním deficitem CMV specifické T-buněčné imunitní odpovědi. V závislosti na délce trvání CMV reaktivace (stanovené na základě počtu DNA kopií viru) jsme byli schopni rozdělit pacienty na „pomalu-reagující“ (délka CMV reaktivace delší než dva týdny) (Obr. 7 A) a na „rychle-reagující“ (délka CMV reaktivace maximálně 2 týdny) (Obr. 7 B).

U těchto dvou skupin pacientů jsme hledali takové funkční profily, které by mohly odlišit rychle/pomalu reagující pacienty. Porovnávali jsme populace T lymfocytů, které *ex vivo* po stimulaci CMV antigeny sekretují IFN γ a IL-2, degranulují (exprese molekuly CD107a na povrchu buněk) nebo exprimují na svém povrchu molekulu CD40L (CD154) a to jak na CD4+ tak na CD8+ T lymfocytech. V naší kohortě jsme dosáhli nejvyšší přesnosti 65,6 % stanovení rychlé kontroly CMV reaktivace se specifitou 86,7 % u CD8+ subpopulace buněk, která po stimulaci CMV antigeny produkovala jak IFN γ , tak IL-2. Druhou nejpresnější populací byla populace CD8+ buněk produkujících jak IFN γ , tak IL-2 a zároveň byla pozitivní na degranulační znak CD107a (přesnost 60,3 % a specificita 80 %).

Všechny populace, které měly přesnost ≥ 50 % a specificitu ≥ 80 % jsou uvedeny v Tabulce 1. Pokud bychom se dívali na CD8+ buňky produkující IFN γ v jakékoliv další kombinaci ostatních znaků, což je často používáno v jiných studiích, dojdeme k přesnosti stanovení rychlé kontroly CMV reaktivace pouze s přesností 48,3 % s poměrně vysokým prahem 1,75 %, který je o tři řády vyšší než u populace dvojitě pozitivních CD8+ T lymfocytů na IFN γ a IL-2.

Z těchto výsledků je patrné, že odpověď na *ex vivo* stimulaci CMV antigeny nám může identifikovat pacienty, kteří jsou schopni rychle potlačit reaktivaci CMV. Zároveň také

ukazujeme, že CD8+ T lymfocyty, které produkují IFN γ a zároveň IL-2, jsou nejpřesnějším indikátorem těchto rychle-reagujících pacientů.



Obrázek 7: Příklady průběhu CMV reaktivace u pacientů po HSCT. Časový průběh CMV DNAémie a vybraných CD8+ a CD4+ populací T lymfocytů u pomalu (A) a rychle (B) odpovídajícího pacienta. Levá osa zobrazuje normalizovanou virovou nálož. Tečkovaně je znázorněn práh zahájení preemptivní virové terapie při 100 virových kopiích. Pravá osa ukazuje procenta jednotlivých T lymfocytárních populací z celkových CD4+ nebo CD8+ T buněk. Na ose X je zobrazen čas po HSCT a čas potřebný k celkové kontrole virémie.

Tabulka 1: Přesnost a specifita funkčních T buněčných populací, které definují rychle-reagující pacienty. Zobrazeny jsou pouze T buněčné populace s přesností nad 50 % a se specifitou nad 80 % spolu s CD8+ produkující IFN γ v jakékoliv další kombinaci.

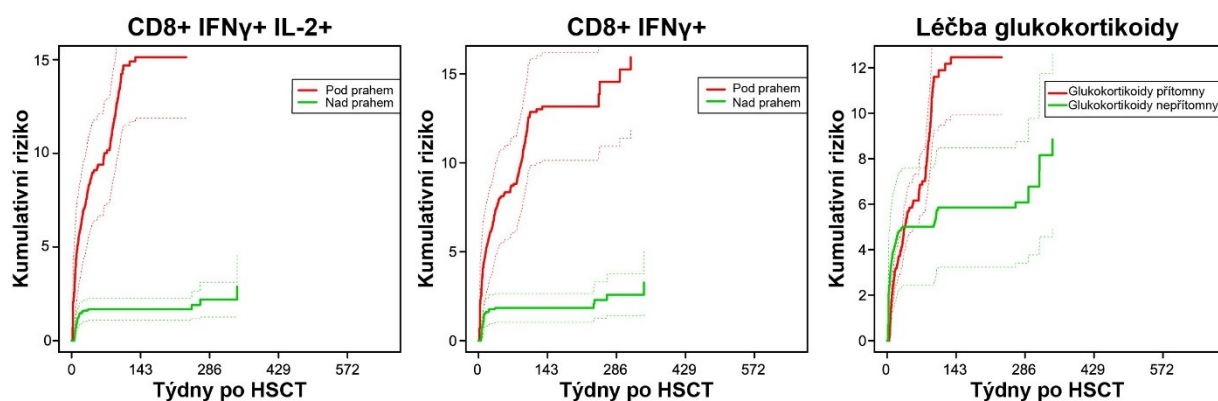
Parametr	Prahová hodnota	Pomalu-reagující (případy)	Rychle-reagující (případy)	Přesnost	Specifita
CD8+ IFNγ+ IL-2+				65,5 %	86,7 %
	$\leq 0,004$ %	13	18		
	$> 0,004$ %	2	25		
CD8+ IFNγ+ IL-2+ CD107a+				60,3 %	80 %
	= 0 %	12	20		
	> 0 %	3	23		
CD8+ IFNγ+ IL-2+ CD107a+ CD40L+				55,2 %	80 %
	$\leq 0,0005$ %	12	23		
	$> 0,0005$ %	3	20		
CD8+ IL-2+ CD107a+				53,4 %	80 %
	= 0 %	12	24		
	> 0 %	3	19		
CD8+ IFNγ+ (jakákoliv další funkcionálna)				48,3 %	80 %
	$\leq 1,75$ %	12	27		
	$> 1,75$ %	3	16		
CD4+ IFNγ+ IL-2+ CD107a+ CD40L+				56,9 %	80 %
	$\leq 0,007$ %	12	22		
	$> 0,007$ %	3	21		
CD4+ IFNγ+ IL-2+ CD107a+				56,9 %	86,7 %
	$\leq 0,06$ %	13	23		
	$> 0,06$ %	2	20		
CD4+ IFNγ+ (jakákoliv další funkcionálna)				51,7 %	80 %
	$\leq 0,595$ %	12	25		
	$> 0,595$ %	3	18		

4.2. Najít takové funkční znaky T lymfocytů, které by mohly být použity při klinickém rozhodování u pacientů s CMV reaktivacemi.

Pelák, O. *et al.* Appearance of cytomegalovirus-specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic stem cell transplantation. (2017). Viz příloha 9.1.

Zajímalo nás, zda by nemohly být stejné funkční populace T lymfocytů, jako ty, které určují délku trvání CMV viremie, použity pro celkovou předpověď incidence CMV viremie a dále jakou roli v tom hraje podávání kortikoidů při léčbě GvHD. K tomu, abychom mohli stanovit podíl jednotlivých CMV specifických T lymfocytů a léčby kortikoidy na vývoji CMV

reaktivace, jsme použili Coxův proporcionální hazardní model s časově závislou vysvětlující proměnnou podle Andersena et al. (177). Jelikož se nám nepodařilo prokázat korelaci mezi jednotlivými funkčními populacemi, které jsme vyšetřovali, CMV viremii a dobou od poslední transplantace, použili jsme dále metodu částečně konstantní interpolace mezi jednotlivými body měření. Z předchozích výsledků jsme předvybrali jako parametry takové funkční populace T lymfocytů, které nejlépe předpovídaly dobrou odpověď v reakci na viremii nebo jsou obecně používané v jiných studiích (CD8+: IFN γ + a IL-2+; IFN γ +, IL-2+ a CD107a+; IFN γ + a jakákoliv další kombinace; CD4+: IFN γ +, IL-2+, CD107a+ a CD154+; IFN γ + a jakákoliv další kombinace) společně s léčbou kortikoidy. Všechny vstupní parametry byly použity jako kategorické proměnné s odpovídajícím prahem uvedeným v Tabulce 1. Abychom mohli takový model použít, bylo nutné vytvořit časový průběh, který vznikl tak, že jsme porovnávali odděleně časové body od jednoho měření k následujícímu. Tímto způsobem jsme byli schopni zahrnout všech 1 850 výsledků z analýz funkčních testů u našich pacientů a zahrnout tak do modelu 1 850 jednotlivých časových úseků. Coxův proporcionální hazardní model odhalil, že pouze parametry přítomnosti CD8+ T lymfocytů produkujících IFN γ a IL-2 a dále IFN γ v jakékoli další kombinaci spolu s nepodáváním kortikoidů signifikantně a neredundantně přispívají ke sníženému riziku výskytu CMV reaktivace (Obr. 8, Tabulka 2).



Obrázek 8: Grafy kumulativního rizika. Každý týden s virovou náloží vyšší než 100 je považován za událost. Je ukázáno kumulativní riziko pro dichotomické proměnné (procento dané buněčné populace vyšší než dříve stanovený práh – viz Tabulka 1) a léčbu kortikoidy. Tečkované čáry zobrazují 95 % konfidenční intervaly.

Tabulka 2: Rizikové příspěvky jednotlivých parametrů k rozvoji CMV viremie po HSCT. Poměr rizik menší než 1 udává protektivní faktor, poměr rizik větší než 1 udává rizikový faktor

Faktor	Poměr rizik	Dolní CI	Horní CI	p hodnota
Přítomnost CD8+ IFN γ + IL-2+	0,28	0,18	0,43	<1 e-05
Přítomnost CD8+ IFN γ + (jakákoliv další funkcionality)	0,45	0,27	0,75	0,002
Léčba kortikoidy	2,47	1,82	3,36	<1 e-05

4.3. Určit fenotypové a funkční charakteristiky buněk vhodných pro adoptivní přenos u pacientů s častými CMV reaktivacemi.

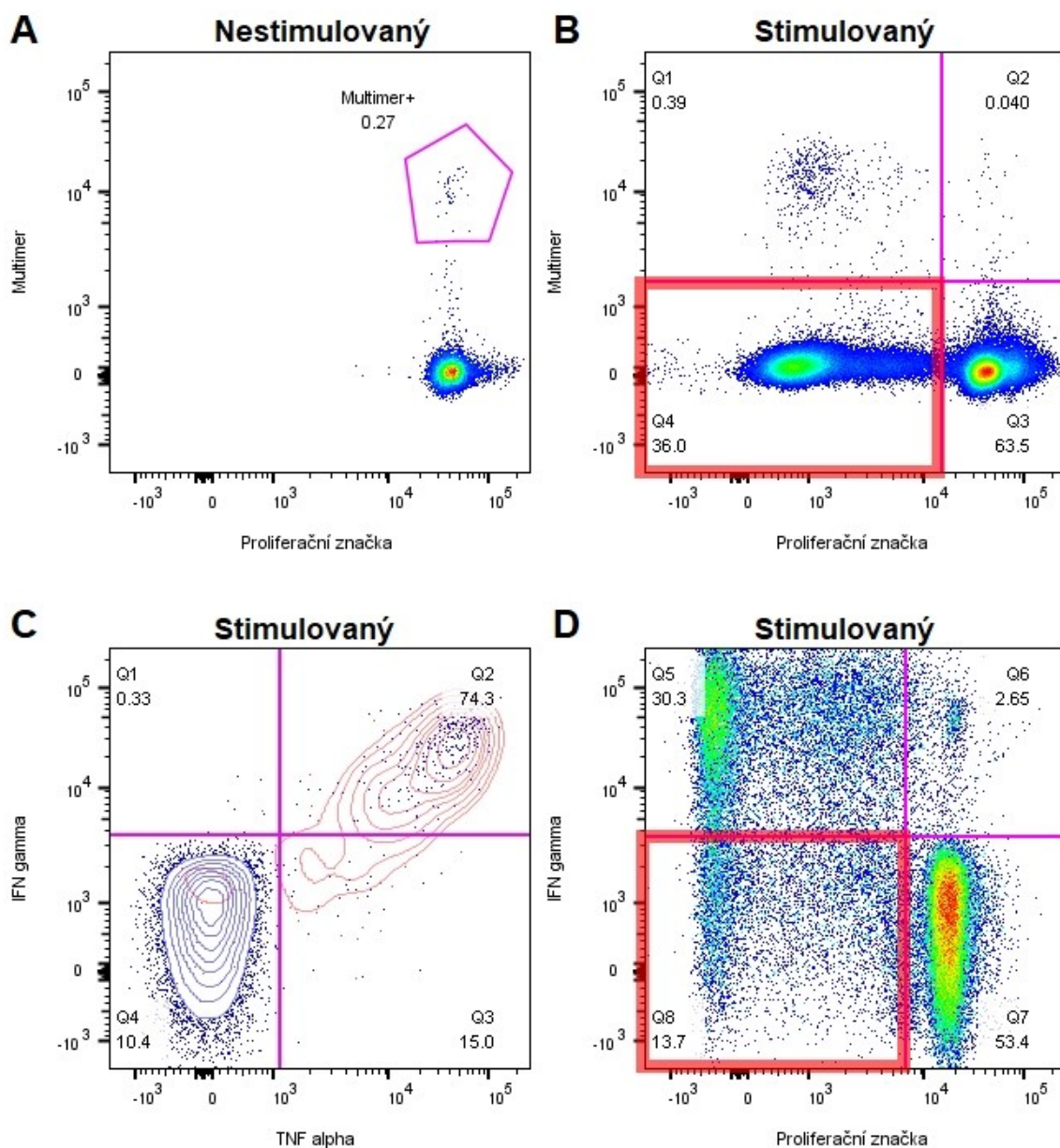
U pacientů po HSCT, kteří trpí opakovanými CMV reaktivacemi a nemají detekovatelné protektivní hladiny CMV specifických T lymfocytů (pomalu-reagující skupina), je možné pro léčbu CMV reaktivací využít metody adoptivní buněčné terapie. Vzhledem k tomu, že se nám podařilo vyvinout poměrně úspěšný způsob detekce takových problematických pacientů, snažili jsme se i my o zprostředkování takové terapie.

Abychom mohli tento přístup využít, bylo nezbytné provést vyšetření potenciálních dárců na přítomnost vhodných CMV specifických T lymfocytů. Jelikož v době vzniku této práce byly k dispozici dvě metody pro separaci CMV specifických buněk pro klinické použití, a to buď přímá metoda pomocí streptamerů anebo nepřímá metoda pomocí produkce cytokinu IFN γ (blíže popsáno v kapitole 3.4.), používali jsme pro identifikaci vhodných dárců obě metody. Jako dárce jsme použili rodiče našich pacientů, jelikož zde byl předpoklad snadné dostupnosti materiálu a zaručena minimálně haploidentická shoda mezi pacientem a dárce.

Souběžné vyšetření oběma metodami se nám podařilo provést celkem u 35 rodičů, kdy jsme identifikovali 29 rodičů vhodných pro separaci pomocí izolace přes IFN γ a 26 rodičů pro přímou separaci pomocí streptamerů. Zároveň jsme celkově detekovali více CMV specifických buněk produkujících IFN γ (medián 1,073 % z CD8+) než buněk, které byly označeny přímo CMV specifickým multimerem (medián 0,45 % z CD8+). Tento rozdíl je spíše způsoben použitím směsi CMV antigenů pro stimulaci při detekci produkce IFN γ , než nižší přesností detekce pomocí CMV specifických multimerů.

Abychom tuto hypotézu ověřili, provedli jsme u třech dárců šestidenní proliferační test s CMV antigenem, který odpovídal HLA shodnému multimeru. Následně jsme provedli restimulaci CMV antigeny a detekci produkce IFN γ pomocí ICS spolu s přímým značením multimery. U těchto tří dárců jsme detekovali proliferaci nejenom na buňkách pozitivních na CMV multimer, ale i na multimer negativních buňkách. Zároveň jsme ovšem také detekovali produkci IFN γ na většině (medián 74,6 %) multimer pozitivních CD8+ lymfocytů (Obr. 9 A–C). Tyto výsledky odpovídají většímu množství CMV specifických buněk detekovaných pomocí produkce IFN γ , odhalují funkční potenciál multimer pozitivních T lymfocytů a zároveň jasně ukazují, že existují klony T lymfocytů, které odpovídají na antigenní stimulaci, ale nerozeznávají imunodominantní peptid. Tímto testem jsme také odhalili populaci CD8+ proliferujících T buněk (medián 31 %), které na stimulaci CMV antigenem neodpovídají produkcí žádného

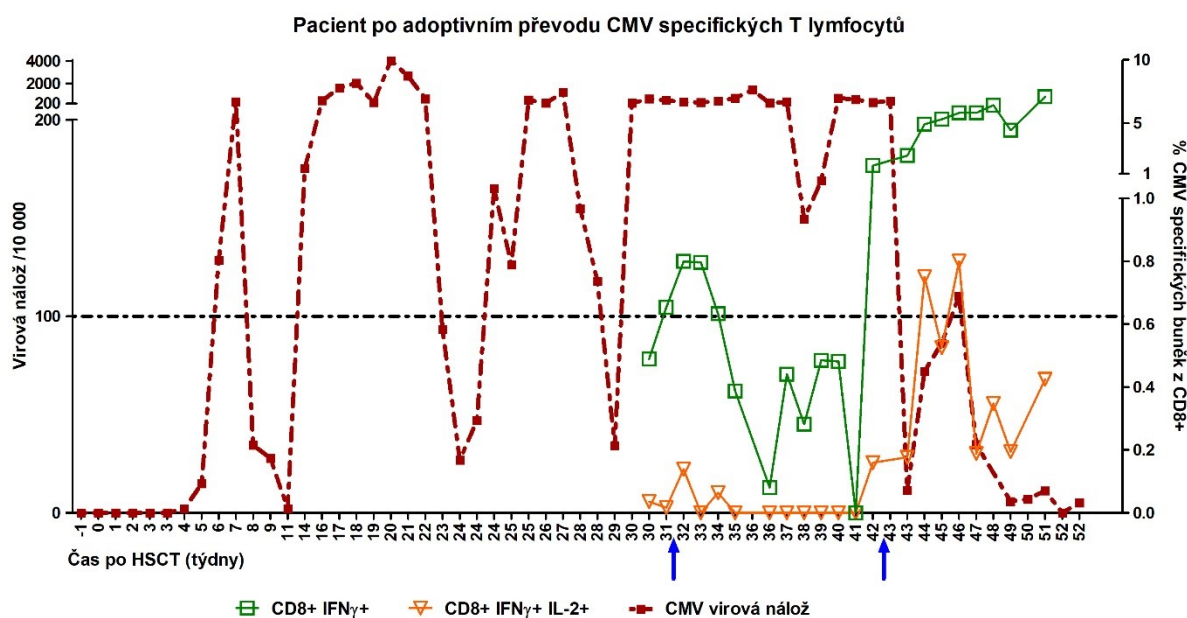
testovaného cytokinu (IFN γ , IL-2 ani TNF α) (Obr. 9 D). Otázkou tak stále zůstává, jak moc velkou roli hrají tyto buňky v kontrole CMV reaktivace a jaký funkční profil tyto buňky mají.



Obrázek 9: Příklad proliferační odpovědi CMV specifických CD8+ T lymfocytů. Kombinace značení multimery a detekce intracelulárních cytokinů spolu s proliferační historií buněk. (A) Nestimulovaný vzorek. (B) Stimulovaný vzorek stejným CMV antigenem (pp65), který byl použit pro značení multimery. V červeném rámečku jsou zvýrazněny buňky, které nejsou detekovány multimerem, ale v reakci prolifерují. (C) Překrytí multimer pozitivních buněk (červeně) a všech CD8+ T lymfocytů (modře) v reakci na stimulaci CMV antigeny. 74,6 % (Q1 + Q2) multimer pozitivních buněk reaguje produkcí IFN γ . Uvedené hodnoty odpovídají pouze procentuálnímu zastoupení multimer pozitivních buněk. (D) Prolifерující CD8+ T lymfocyty po stimulaci CMV antigeny. V červeném rámečku jsou vyznačeny buňky, které neprodukuji IFN γ , ale na přítomnost antigenů reagují prolifерací.

Detekce CMV specifických T lymfocytů pomocí produkce $IFN\gamma$ identifikuje širší spektrum buněk, nicméně obě metody se nakonec ukázaly jako vhodné. Celkem jsme byli schopni najít vhodného dárce pro 85 % (n=25) našich pacientů. Jistou výhodou selekce CMV specifických buněk pomocí produkce $IFN\gamma$ může být, že dochází k separaci jak $CD8+$ tak $CD4+$ T lymfocytů. Z našich dat se ovšem zdá, že $CD4+$ T lymfocyty nehrají v akutní kontrole CMV reaktivace významnější roli. Potvrdit toto tvrzení i pro adoptivní transfery z našich dat ovšem zatím nelze.

Během doby vzniku této dizertační práce se nám podařilo uskutečnit tři klinické selekce CMV specifických buněk pro podání dvěma dospělým pacientům. Oba pacienti trpěli opakovanými CMV reaktivacemi a detekovali jsme u nich pouze nízké hladiny $CD8+$ T lymfocytů produkujících pouze $IFN\gamma$. Z technických důvodů jsme pro jednoho pacienta použili metodu přímé selekce pomocí streptamerů a pro druhého dvakrát selekci pomocí produkce $IFN\gamma$ (první převod nebyl účinný, nejspíše díky současnému podávání glukokortikoidů pro léčbu GvHD). V konečném důsledku došlo u obou pacientů po transferu separovaných CMV specifických T lymfocytů ke zlepšení klinického stavu a k obnovení kontroly CMV reaktivace, jak je vidět na ukázce jednoho pacienta na Obr. 10.



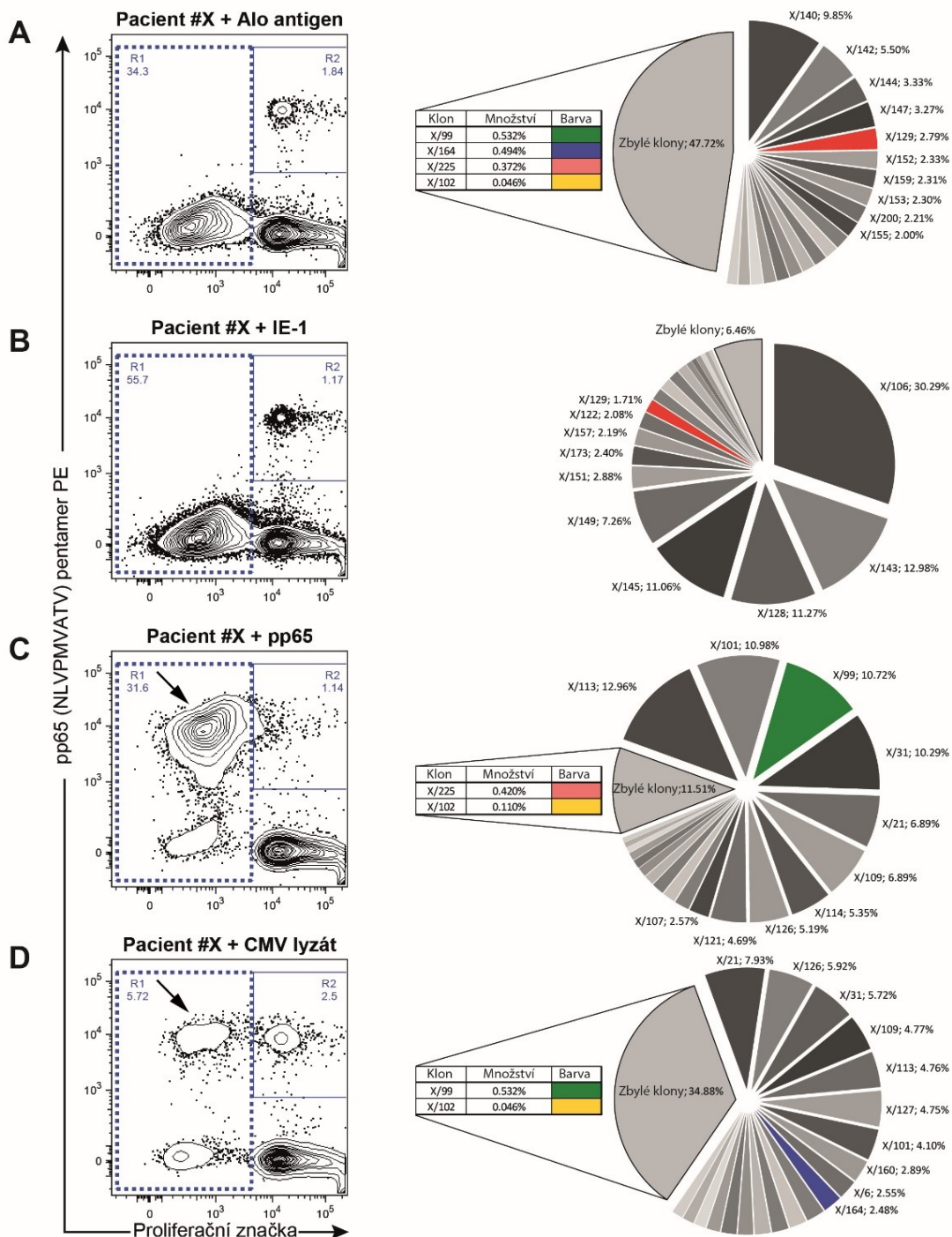
Obrázek 10: Průběh CMV virémie po adoptivním transferu CMV specifických T lymfocytů. Ukázán je jeden pacient, kterému jsme dvakrát podali CMV specifické T lymfocyty od příbuzného dárce (modré šipky znázorňují čas podání buněčné terapie). Levá osa zobrazuje normalizovanou virovou nálož. Tečkovaně je znázorněn práh zahájení preemptivní virové terapie při 100 virových kopiích. Pravá osa ukazuje procenta jednotlivých T lymfocytárních populací z celkových $CD8+$ T buněk. Na ose X je zobrazen čas po HSCT.

4.4. Rozpoznat klony T lymfocytů, které jsou zodpovědné za odhojení transplantovaných ledvin a které zprostředkovávají ochranu proti CMV.

Stranavova, L. a Pelák O. *et al.* Heterologous cytomegalovirus and allo-reactivity by shared T cell receptor repertoire in kidney transplantation. (2019). Viz příloha 9.2.

Naším úkolem bylo vyvinout takovou metodu, jež by umožnila specificky identifikovat klony T lymfocytů, které reagují na přítomnost CMV antigenu a zároveň rozpoznávají alo antigen u pacientů po transplantaci ledvin. Z dřívějších dat bylo zřejmé, že před transplantační silná anti-CMV odpověď koreluje s následným odhojením štěpu. Tato data nás přivedla na myšlenku existence zkříženě reagujících klonů T lymfocytů na CMV a alo antigeny. Pro identifikaci těchto klonů jsme použili metodu proliferační směsné lymfocytární reakce (MLR) předtransplantačních patientských vzorků PBMC s dárcovským alo antigenem (dárcovské inaktivované PBMC) v kombinaci s přímým značením CMV specifických T lymfocytů pomocí multimerů.

Díky kombinaci těchto dvou přístupů jsme byli schopni v jedné reakci identifikovat buňky, které odpovídaly na stimulaci alo antigenem proliferací a zároveň pomocí značení multimery jasně identifikovat CMV specifický klon rozpoznávající určitý imunodominantní CMV peptid. Bohužel, u žádného z jedenácti testovaných pacientů se nám nepodařilo identifikovat takové CD8⁺ lymfocyty, které by rozpoznávaly imunodominantní peptid (součástí multimerů), a zároveň by proliferovaly v odpovědi na stimulaci alo antigenem (Obr. 11 A). Zajímavé ovšem bylo, že vzorky, které byly stimulovány peptidovou sbírkou odpovídající imunodominantnímu peptidu v multimeru, identifikovaly větší množství proliferujících buněk, než jenom buňky značené multimerem (Obr. 11 C). Tyto výsledky nás vedly k domněnce, že za odhojení štěpu budou nejspíše zodpovědné minoritní klony nerozpoznávající imunodominantní CMV antigeny.

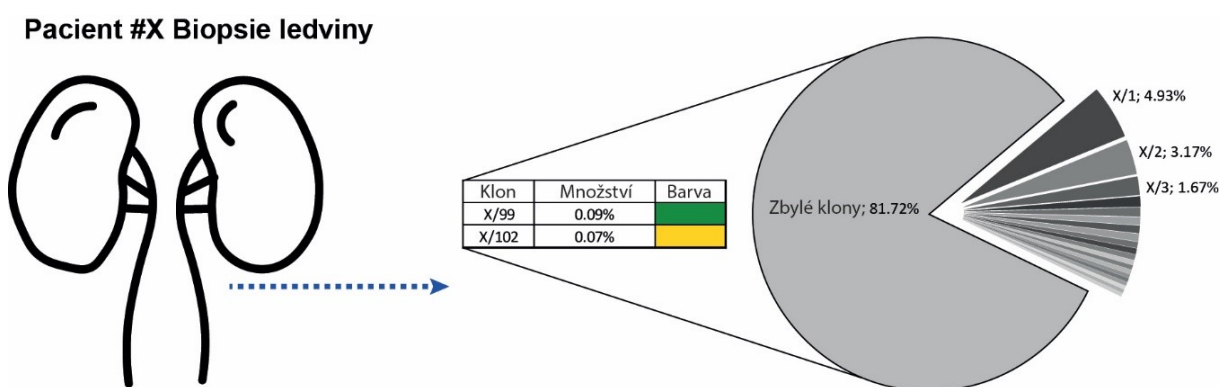


Obrázek 11: Proliferující CD8⁺ T lymfocyty obsahují zkříženě reagující TCRβ sekvence. Ukázka jednoho reprezentativního pacienta. 2D grafy ukazují proliferační odpověď CD8⁺ T lymfocytů v reakci na alo antigen (A), IE-1 (B), pp65 (C) a celkový CMV lyzát (D). Proliferující buňky v oblasti R1 byly vysortovány a následně použity pro analýzu TCRβ repertoáru pomocí sekvenování nové generace. Koláčové grafy ukazují 20 nejpočetnějších TCRβ sekvencí (pravá část), další méně abundantní klony jsou zobrazeny v postranních tabulkách. Barevně vyznačené klony ukazují společné klony identifikované po antigenní stimulaci. Černé šipky označují proliferující CD8⁺ T lymfocyty, které zároveň rozpoznávají imunodominantní pp65 peptid. Červená šipka ukazuje absenci CD8⁺ T lymfocytů, které by rozpoznávaly pp65 imunodominantní CMV antigen a zároveň proliferovaly v odpovědi na alo antigen.

4.5. Zmapovat výskyt zkříženě-reaktivních T lymfocytů u pacientů po transplantaci ledvin.

Stranavova, L. a Pelák O. *et al.* Heterologous cytomegalovirus and allo-reactivity by shared T cell receptor repertoire in kidney transplantation. (2019). Viz příloha 9.2.

Pro identifikaci všech potenciálních zkříženě reagujících klonů jsme se tak dále zaměřili na všechny T lymfocyty, které proliferovaly v odpovědi na stimulaci různými CMV antigeny a porovnávali je s T lymfocyty, které proliferovaly v odpovědi na alo antigen v MLR reakci. Tyto proliferující buňky jsme vysortovali pro izolaci DNA a následné sekvenování nové generace pro analýzu TCR β řetězců (Obr. 11 a Obr. 12).



Obrázek 12: Biopsie ledvin obsahující zkříženě reagující TCR β sekvence. Ukázka jednoho reprezentativního pacienta (identický s Obr. 11). Z bioptického vzorku ledvin byla vyizolována DNA pro následnou analýzu TCR β repertoáru pomocí sekvenování nové generace. Koláčový graf ukazuje 20 nejpočetnějších TCR β sekvencí, další méně abundantní klony jsou zobrazeny v postranní tabulce. Barevně vyznačené klony ukazují společné klony identifikované po antigenní stimulaci nebo v bioptickém vzorku ledvin.

U deseti z jedenácti pacientů se nám podařilo získat dostatečné množství dat pro analýzu TCR β repertoáru. Celkem jsme identifikovali stovky jedinečných TCR β sekvencí (medián 392; rozmezí 241–491). U všech pacientů jsme byli schopni identifikovat alespoň jeden klon, jehož sekvence TCR β řetězce byla sdílená mezi alo a CMV specifickou reakcí (Tabulka 3). Naše výsledky tak ukazují, že jak CMV, tak alo antigeny mohou aktivovat identické klony T lymfocytů k proliferaci. Tyto poznatky jsou obzvláště důležité, jelikož nejsme omezeni pouze na určité imunodominantní klony T lymfocytů a zároveň ukazujeme funkční potenciál těchto klonů.

Abychom dále prokázali souvislost mezi těmito zkříženě reagujícími klony a odhojením transplantované ledviny, porovnali jsme výskyt námi identifikovaných zkříženě reagujících klonů s klony T lymfocytů izolovaných ze vzorků bioptické tkáně transplantovaných ledvin u sedmi pacientů dříve zařazených do naší studie. U šesti bioptických vzorků jsme byli schopni získat dostatečné množství DNA pro senzitivní analýzu a u všech těchto vzorků jsme byli schopni nalézt identické alo reaktivní klony s klony z předtransplantačních MLR reakcí (medián 3, rozmezí 1–7).

Tabulka 3: Počty analyzovaných klonů u jednotlivých pacientů. Ukázány jsou počty zkříženě reagujících klonů v alo a CMV reakci spolu s procentuálním zastoupením těchto klonů ze všech analyzovaných TCR sekvencí v alo reakci.

ID pacienta	Celkem	Alo	IE-1	pp65	CMV	Biopsie ledviny	Zkříženě reagující Alo&CMV	Zkříženě reagující Alo&CMV (% z Alo)
I	491	98	84	84	92	97	15	43,35 %
II	241	82	NA	13	18	NA	1	0,08 %
III	478	100	52	114	95	99	3	4,71 %
IV	320	102	78	43	91	NA	31	43,43 %
V	344	98	33	29	35	92	3	1,14 %
VI	477	101	90	83	91	NA	4	0,96 %
VII	437	94	2	69	88	101	2	1,23 %
VIII	431	16	44	37	92	105	1	0,97 %
IX	328	101	NA	42	27	48	5	4,22 %
X	353	85	18	42	62	102	3	1,07 %
XI	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Zároveň jsme také identifikovali CMV reaktivní klony v bioptických vzorcích ledvin dokonce i ve vyšších frekvencích, než tomu bylo v předtransplantačních vzorcích (medián 3, rozmezí 1–11). U třech pacientů se nám dokonce podařilo identifikovat identické zkříženě reagující klony T lymfocytů, které jsme našli v předtransplantačních MLR a CMV specifických reakcích (Tabulka 4). U dvou z těchto tří pacientů bylo poměrné zastoupení těchto zkříženě reagujících klonů v bioptických vzorcích ledviny poměrně vysoké (6,4 % a 5,1 %). Později se ukázalo, že tito pacienti prodělávali CMV reaktivaci spolu s biopticky prokázaným buněčným odhojením štěpu. Tyto výsledky doplňují naše předchozí pozorování, že CMV reaktivní T lymfocyty jsou schopny po aktivaci expandovat a naznačují, že k jejich akumulaci může docházet právě v transplantovaných ledvinách, kde mohou hrát důležitou roli při jejich odhojování.

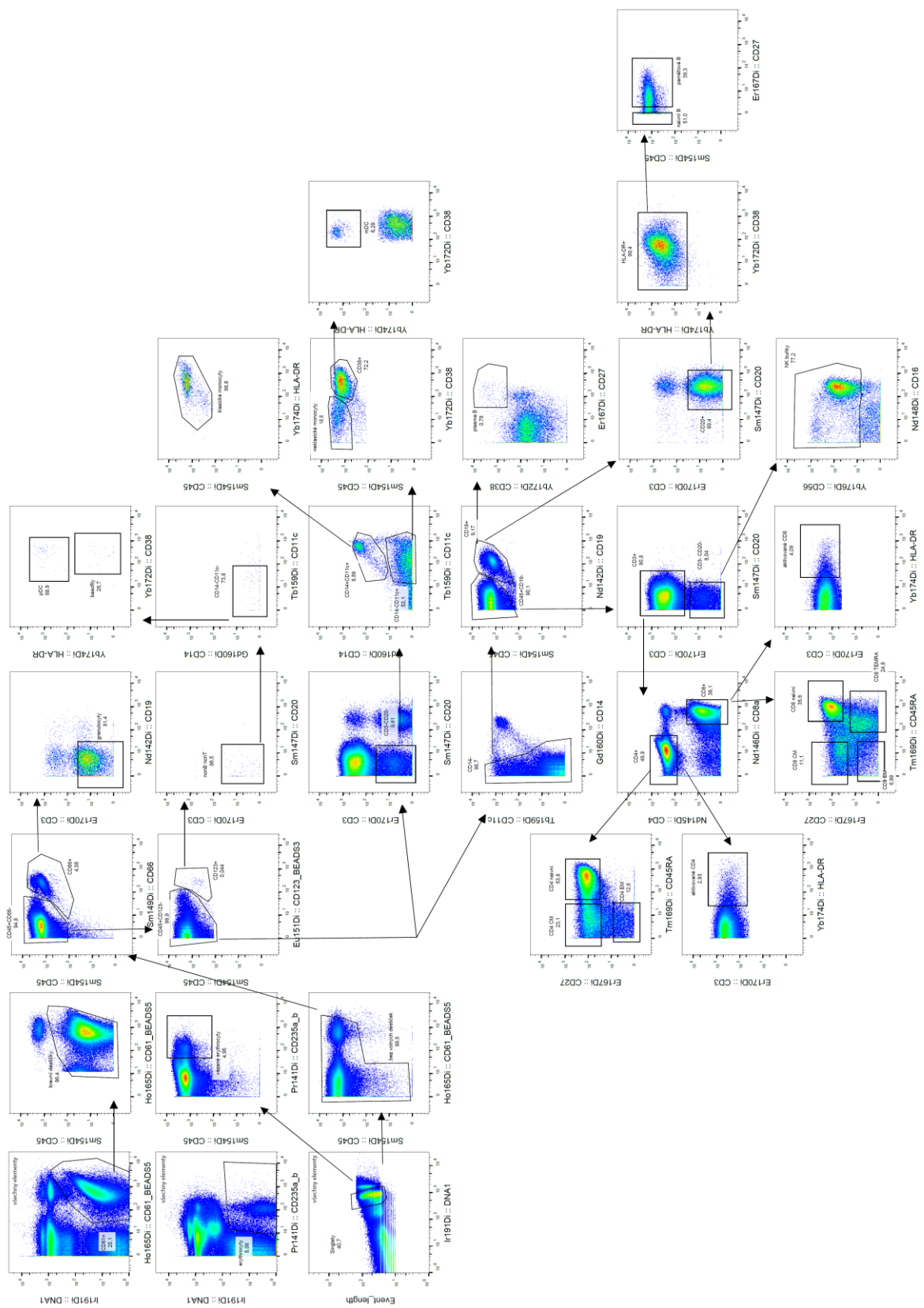
Tabulka 4: Počty sdílených klonů mezi PBMC buňkami a bioptickými vzorky ledvin. *Procentuální zastoupení klonů identifikovaných v proliferační esaji jako CMV nebo alo reaktivní nebo jako zkříženě reagující. Udávaná procenta jsou z celkového počtu všech TCRβ sekvencí identifikovaných v bioptických vzorcích ledvin.*

ID pacienta	CMV specifické (% z TCR sekvencí v bioptickém vzorku)	Alo specifické (% z TCR sekvencí v bioptickém vzorku)	Zkříženě reagující (% z TCR sekvencí v bioptickém vzorku)
I	1 (0,5 %)	1 (0,4 %)	0 %
III	1 (0,7 %)	3 (2,4 %)	2 (1,8 %)
V	3 (1,8 %)	6 (12,6 %)	2 (3 %)
VII	3 (0,5 %)	2 (0,6 %)	0 %
VIII	11 (5,1 %)	0 %	0 %
IX	0 %	2 (9,2 %)	0 %
X	1 (0,1 %)	7 (6,4 %)	1 (0,1 %)

4.6. Zavést metodu hmotnostní cytometrie s ohledem na získání co největšího množství informace o buněčném a funkčním složení periferní krve.

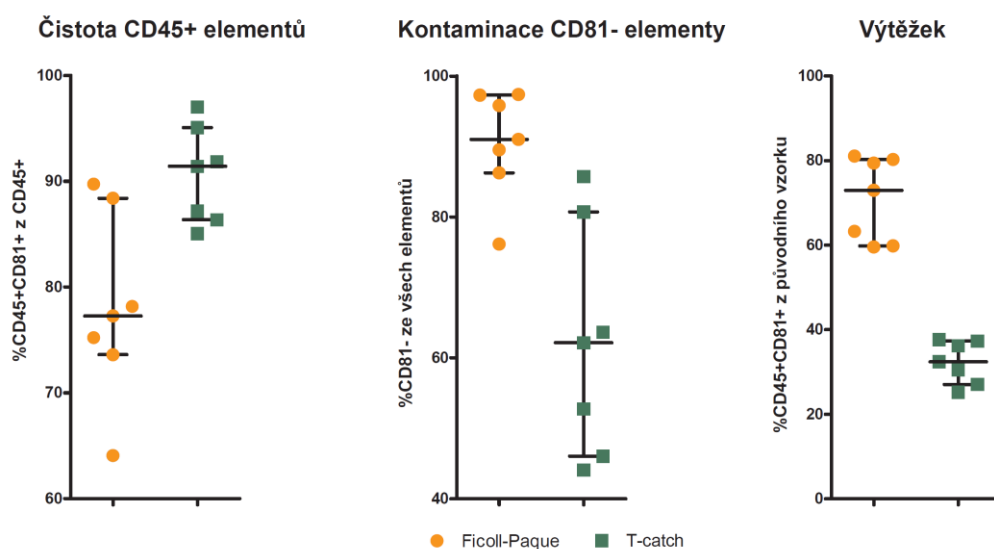
Pelák, O. *et al.* Lymphocyte enrichment using CD81-targeted immunoaffinity matrix. (2017).
Viz příloha 9.3.

Hmotnostní cytometrie je v poslední době hojně využívaná metoda při studiu komplexních imunologických systémů, jelikož umožňuje poměrně snadnou detekci velkého množství různých znaků najednou bez velkých nároků na optimalizaci daného panelu (při srovnání s fluorescenční cytometrií). Na druhou stranu je potřeba věnovat zvýšenou pozornost přípravě vzorků, hlavně kvůli nízké rychlosti nahrávání. Abychom mohli pomocí hmotnostní cytometrie sledovat rekonstrukci imunitního systému u pacientů po transplantaci HSC, bylo nejprve nutné zoptimalizovat izolaci lymfocytů před samotným značením. Z tohoto důvodu jsme srovnali dva postupy izolace PBMC zdravých dárců (n=7). Jednalo se o: a) izolaci přes hustotní gradient pomocí Ficoll-PaqueTM, což je metodika hojně používaná a lze ji označit za „zlatý standard“; b) námi navrženou CD81+ afinitní chromatografií. Sadou 19-ti komerčně dostupných protilátek konjugovaných s izotopy kovů vzácných zemin a dvou konjugovaných v naší laboratoři jsme v jedné zkumavce identifikovali všechny základní subpopulace mononukleárních buněk (viz Obr. 13) včetně kontaminujících subpopulací (červené krvinky, volné i vázané krevní destičky). Následně jsme porovnali jejich zastoupení v konečných produktech získaných oběma postupy. Zjistili jsme, že pomocí obou postupů jsme získali srovnatelné zastoupení CD81+ buněk ze všech hematopoetických (CD45+) buněk. Pomocí CD81+ T-CatchTM jsme získali produkt s



Obrázek 13: Gatovací strategie leukocytárních populací. (reprezentativní vzorek získaný izolací pomocí CD81+ T-Catch™)

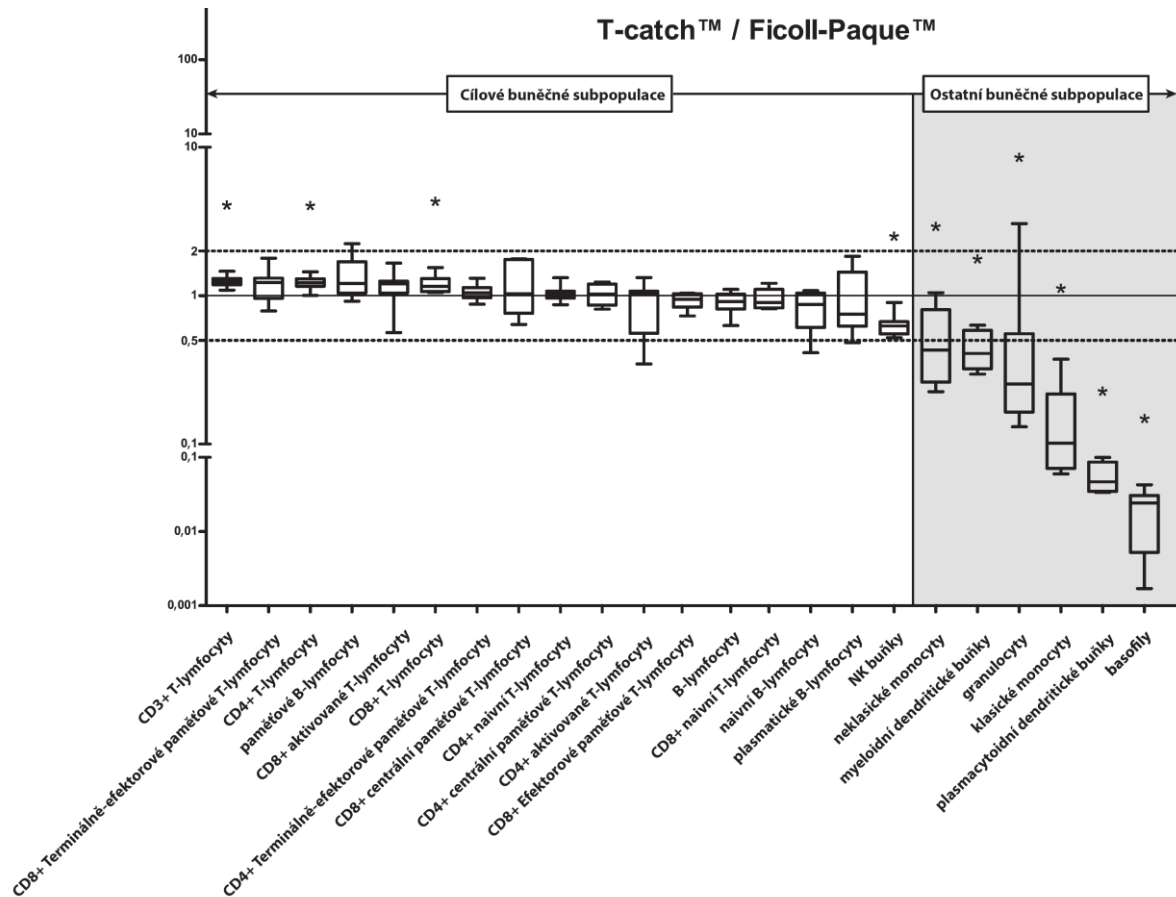
výrazně nižší kontaminaci nejaderných elementů. Naproti tomu izolace pomocí hustotního gradientu přes Ficoll-Paque™ měla výrazně vyšší výtěžky (viz Obr. 14).



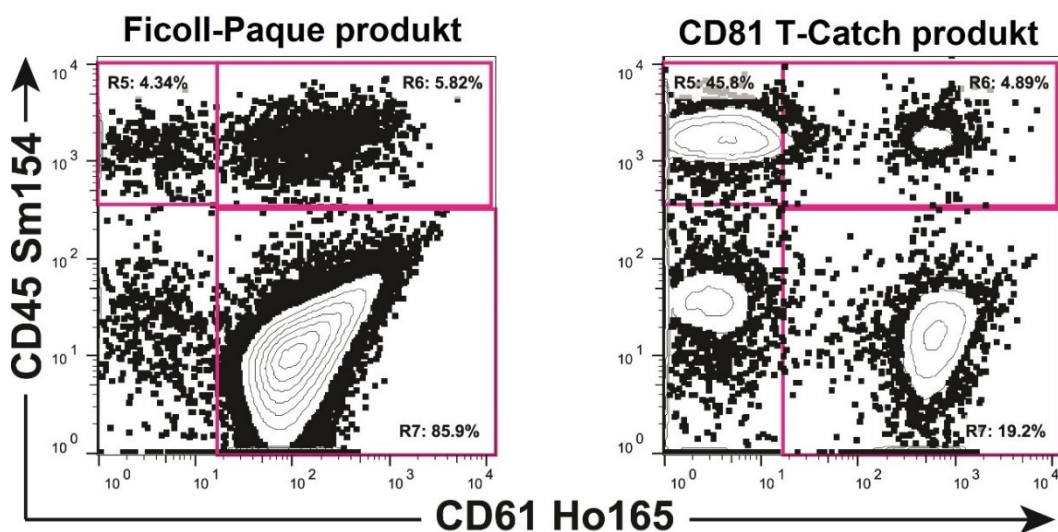
Obrázek 14: Obecné porovnání výsledků CD81+ T-catch™ a Ficoll-Paque™. Čistota CD45+ elementů (vlevo), kontaminace CD81- elementy (uprostřed) a výtěžky (vpravo) finálních produktů získaných izolací pomocí CD81+ T-Catch™ (zeleně) a přes hustotní gradient Ficoll-Paque™ (žlutě).

Dále jsme porovnali zastoupení jednotlivých leukocytárních populací v produktech získaných oběma postupy (viz Obr. 15). Všechny lymfocyty (T, B a NK buňky a jejich subpopulace) byly procentuálně podobně zastoupeny, CD3+ T lymfocyty byly signifikantně více zastoupeny v produktech získaných pomocí CD81+ T-Catch™. Naproti tomu NK buňky byly touto metodou depletovány. Také buňky vrozené imunity – neklasické a klasické monocyty, neutrofilní granulocyty, bazofily i myeloidní a plasmacytoidní dendritické buňky, byly lehce až výrazně sníženy v produktech získaných pomocí CD81+ T-Catch™.

Tyto výsledky byly v souladu s úrovní povrchové exprese molekuly CD81 u jednotlivých subpopulací. Největším rozdílem v produktech získaných oběma postupy se ukázaly být volné krevní destičky – v průměru 93,1 % ze všech elementů v produktech získaných přes hustotní gradient pomocí Ficoll-Paque™ versus 22,3 % v produktech získaných pomocí CD81+ T-Catch™ (viz Obr. 16). Ukázalo se tedy, že v porovnání se „zlatým standardem“ separace PBMC přes hustotní gradient pomocí Ficoll-Paque™ jsme pomocí naší navržené metody separace přes CD81+ T-Catch™ získali čistší produkt z hlediska kontaminujících krevních destiček a tím se výrazně snížil čas strávený vlastním nahráváním jednotlivých vzorků do hmotnostního cytometru. Naproti tomu pomocí této metody dochází ke kvantitativně větším ztrátám hematopoetických buněk a dochází k depleci NK buněk a buněk vrozené imunity.

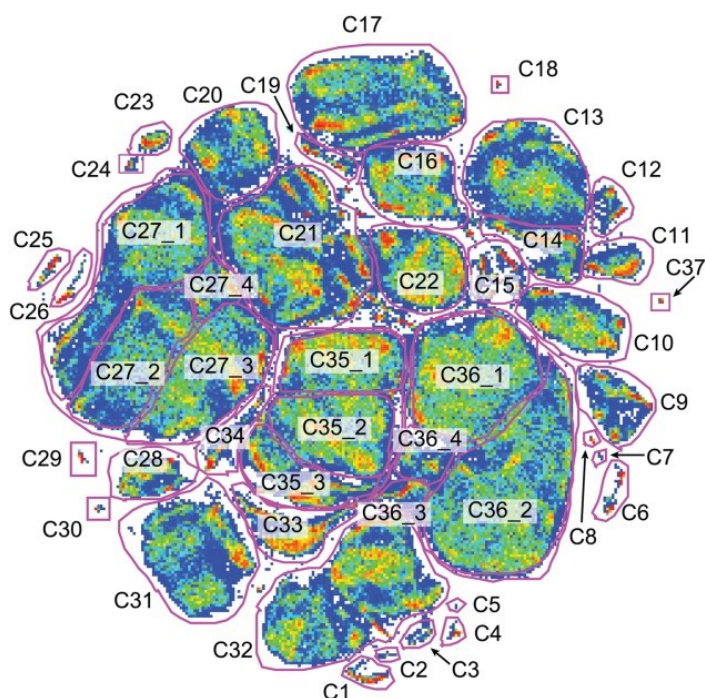


Obrázek 15: Porovnání výsledků CD81+ T-catch™ a Ficoll-Paque™ na úrovni jednotlivých buněčných populací. Obohacení (popř. deplece) cílových (vlevo) a necílových (vpravo) buněčných subpopulací získaných pomocí CD81+ T-Catch™ oproti izolaci přes hustotní gradient Ficoll-Paque™ měřená pomocí hmotnostní cytometrie. Pro každý pár finálních produktů bylo vyděleno procentuální zastoupení dané populace v celkové populaci singletů produktu CD81+ T-Catch™ proti Ficoll-Paque™. Data od všech sedmi dárců jsou zde ukázána jako boxploty.



Obrázek 16: Kontaminace krevními destičkami. Zastoupení volných krevních destiček (kontaminující populace) a hematopoetických buněk (cílová populace) ve vzorcích získaných přes hustotní gradient Ficoll-Paque™ (vlevo) a pomocí CD81+ T-Catch™ (vpravo). Ukázán je jeden reprezentativní vzorek.

Tento soubor dat se zároveň osvědčil pro testování nesupervidovaného přístupu analýzy dat s vysokým počtem parametrů. Jak je vidět na Obrázku 13, pro identifikaci všech populací expertním „gatováním“ je potřeba projít poměrně velké množství 2D grafů. V takovéto komplexní analýze je poměrně jednoduché nějaké populace vynechat, proto jsme se rozhodli celý datový soubor zanalyzovat nesupervidovaně pomocí viSNE algoritmu, který redukuje mnohadimenzionální data do dvou dimenzí (Obr. 17).



Obrázek 17: ViSNE analýza dat. Výsledek nesupervidované analýzy (viSNE) všech 14 zkoumaných vzorků. Pro vytvoření této projekce bylo použito 19 znaků. Identifikace klastrů probíhala manuálně.

Díky tomuto přístupu jsme byli schopni identifikovat celkem 37 unikátních buněčných klastrů. Ve srovnání s předešlou supervidovanou metodou jsme takto identifikovali o 18 buněčných populací více. Deset těchto nově identifikovaných klastrů obsahovalo agregáty destiček s některou známou populací, dva klastry obsahovaly dvojice nebo trojice B, T a neutrofilních buněk (CD3+, CD20+, CD66+). Dále pak dva klastry obsahovaly dvojité pozitivní nebo dvojité negativní CD4 a CD8 T lymfocyty (CD3+, CD4+, CD8+ a CD3+, CD4-, CD8-). Tyto populace byly sice známé, ale nebyly zahrnuty do supervidované analýzy. Zbývající čtyři klastry obsahovaly nízkě zastoupené buňky (0,01 – 1 %), které jsme nebyli schopni tímto panelem zařadit mezi známé populace (Obr. 18). Nesupervidovaná analýza nám tak jednak pomohla najít rozdíly v kontaminacích krevními destičkami, a navíc jsme byli schopni nalézt osm přehlížených buněčných populací, čímž jsme dokázali z těchto dat vytěžit maximum možné informace.

Klaster	Navázané destičky	Signifikantní obohacení jednou metodou	Krevní destičky	Erytrocyty	Klasické monocyty	Neklasické monocyty	Plazmacytoidní Dendritické buňky	Myeloidní Dendritické buňky	Paměťové B buňky	Naivní B buňky	Plazmatické B buňky	CD4+ Centrální paměťové	CD4+ Efektorové paměťové	CD4+ Naivní	CD4+ aktivované	CD8+ Centrální paměťové	CD8+ Efektorové paměťové	CD8+ Naivní	CD8+ Terminální efektorové paměťové	CD8+ aktivované	NK buňky	Bazofily	Granulocyty	% mimo supervidované populace
C1	+	F																						19
C2	-	F																						86
C3	+	NS																						39
C4	+	F																						32
C5	-	NS																						0
C6	+	NS																						96
C7	+	NS																						100
C8	++	T																						97
C9	-	NS																						98
C10	++	F																						16
C11	++	F																						19
C12	+	F																						4.1
C13	++	F																						3.5
C14	-	NS																						19
C15	+	T																						69
C16	++	F																						6.6
C17	-	T																						3
C18	-	F																						8.9
C19	+	F																						2.6
C20	-	T																						100
C21	++	F																						51
C22	-	T																						14
C23	++	F																						7
C24	++	NS																						40
C25	++	F																						13
C26	-	F																						6.1
C27	-	T																						23
C28	+	T																						4.7
C29	-	F																						16
C30	+	NS																						29
C31	+	F																						5.8
C32	+	NS																						20
C33	++	F																						6.9
C34	+	NS																						98
C35	++	F																						14
C36	-	T																						17
C37	++	F																						6

Obrázek 18: Překryv nesupervidovaných klastrů a expertně identifikovaných populací. Modré sloupčky ukazují shodu mezi klastry získanými z viSNE projekce a supervidovaných populací. Značky ve sloupci „Navázané destičky“ značí: -, méně než 20 %; +, 20-50 %; ++, více než 50 % navázaných krevních destiček. Signifikantní obohacení (Wilcoxonův párový test) pro Ficoll-Paque (F), T-Catch (T) nebo nesignifikantní obohacení (NS) je uvedeno.

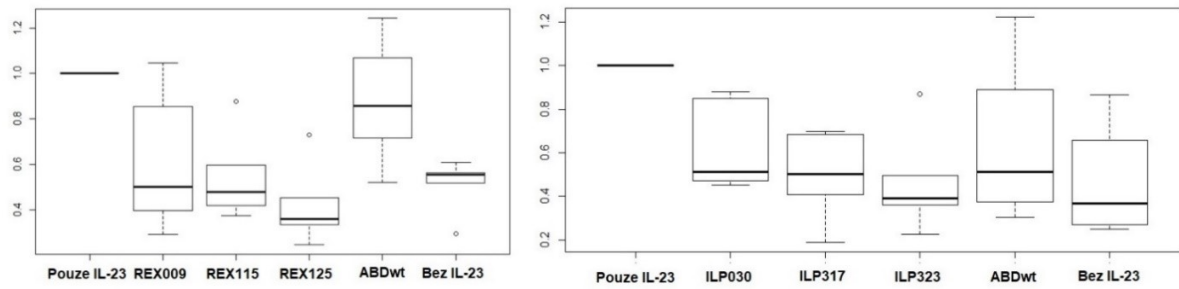
4.7. *Ex vivo* otestovat funkci a vliv vysoce afinitních binderů IL-23p19 a IL-23R na Th17 lymfocytech.

Kuchař, M. *et al.* Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent *ex vivo* expansion of IL-17-producing T-cells. (2014).
Křížová, L. *et al.* p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells. (2017).
Viz příloha 9.4. a příloha 9.5.

Jelikož je důležité sledovat imunitní systém a jeho jednotlivé součásti v širších souvislostech, použili jsme pro testování nových vysoce afinitních binderů molekuly IL-23R (REX-009, -115, -125) a podjednotky IL-23p19 (ILP-030, -317, -323) metodu průtokové cytometrie. Díky tomu jsme byli schopni testovat vliv těchto binderů přímo na PBMC buňkách izolovaných z primárních krevních vzorků metodou *ex vivo* v Th17 stimulačním cytokinovém prostředí. Naším cílem bylo prokázat inhibiční vliv těchto binderů na signalizaci pomocí IL-23 přes jeho odpovídající receptor na CD4+ T lymfocytech tak, abychom zabránili expanzi aktivovaných Th17 lymfocytů při stimulaci IL-23 a IL-2.

Již po třídní *ex vivo* kultivaci PBMC buněk jsme byli schopni pozorovat statisticky významné rozdíly v expanzi Th17 lymfocytů, pokud byly v kultivaci přítomny bindery IL-23R (REX-009 $p=0,0559$; REX-115 $p=0,0074$; REX-125 $p=0,0004$) nebo IL-23p19 (ILP-030 $p=0,0047$; ILP-317 $p=0,0013$; ILP-323 $p=0,0018$) oproti podmínkám se samotným IL-23 a IL-2. Přítomnost WT varianty REX binderů statisticky významná nebyla ($p=0,2892$) obdobně jako u WT varianty ILP binderů ($p=0,0533$). Zde ovšem docházelo k větší variabilitě mezi jednotlivými dárči (Obr. 19), která byla nejspíše způsobena adjuvantní reakcí na WT variantu, jelikož tato doména je součástí BB domény proteinu G u streptokoků, u které byl prokázán stimulační účinek na buňky imunitního systému (178).

Tímto testem jsme potvrdili inhibiční účinky všech testovaných binderů na expanzi Th17 buněk z primárních vzorků krve při stimulaci pomocí IL-23 a podařilo se nám tak potvrdit jejich předem *in silico* predikované blokujiící funkce.



Obrázek 19: Ex vivo inhibice proliferace Th17 buněk. Množství IL-17 produkujících buněk v přítomnosti nebo při absenci REX a ILP binderů. Absolutní počty buněk byly normalizovány na hodnoty buněk v přítomnosti samotného IL-23.

5. DISKUZE A ZÁVĚR

Rekonstituce imunitního systému u pacientů po HSCT je klíčová pro dobrý klinický výsledek. Vývoj v oblasti metod umožňujících rozlišení na úrovni jednotlivých buněk přináší nové možnosti sledování změn v zastoupení jednotlivých populací, ve změnách fenotypu a funkčních profilů napříč celým imunitním systémem tak, jak dochází k jeho obnově po HSCT. Zvětšující se množství současně detekovatelných znaků umožňuje podrobnou fenotypizaci specifických populací nebo širokou analýzu celkových změn imunitního systému při jeho obnově. Díky tomu dochází k objevům nových imunitních ukazatelů, které korelují s různými klinickými výstupy jako jsou infekce, relaps, přítomnost GvHD nebo celkové přežívání. Tyto znaky pak mohou být použity v predikci posttransplantačního vývoje u jednotlivých pacientů, nebo dokonce mohou posloužit ke zlepšení rekonstituce imunitního systému tím, že problematické pacienty budou směřovat k moderním imunoterapiím. V rámci této dizertační práce jsme použili rozsáhlou kohortu pediatrických pacientů po HSCT k identifikaci přesných funkčních odpovědí a jejich minimálnímu prahovému množství, abychom byli schopni předpovědět výsledek preemptivní terapie antivirotiky. Díky použití mnohparametrické fluorescenční cytometrie, jsme byli schopni identifikovat několik funkčních subpopulací T lymfocytů, které poměrně dobře předpovídají výsledek CMV reaktivace. Nejlepší předpovědní hodnotu pak měla polyfunkční populace CD8⁺ T lymfocytů, které produkovaly jak IFN γ , tak IL-2. Tyto naše výsledky jsou ve shodě i s jinými studiemi (179, 180). Zajímavé je, že u 40–50 % pacientů, kteří dobře zvládají CMV reaktivace, jsme nebyli schopni detekovat žádné CMV specifické buňky, což ale může být způsobeno migrací těchto buněk z krevního řečiště do míst reaktivace viru. T lymfocyty, které produkovaly IFN γ , měly významně vyšší práh pro predikci kontroly CMV reaktivace (1,75 %) než ostatní populace, které se pohybovaly na úrovni detekce MRD (181). Vysoké prahové hladiny buněk produkujících IFN γ potvrzují naše předchozí poznatky, že tyto buňky odpovídají v první linii, ale až teprve přítomnost polyfunkčních efektorových CD8⁺ T lymfocytů zprostředkovává kontrolu CMV reaktivace (109). Při modelování rizikových faktorů se ukázalo, že populace T lymfocytů produkujících IFN γ a IFN γ spolu s IL-2 signifikantně a neredundantně přispívají k protekci proti reaktivaci CMV. To opět koreluje s dřívějšími poznatky o komplexním vývoji rychlé CMV specifické odpovědi do paměťové dlouhotrvající reakce, případně s efektorovým vyčerpáním reagujících T lymfocytů (182, 183). Tyto jednotlivé stavy se pak projevují ve schopnosti T lymfocytů reagovat pouze produkcí jednoho cytokinu nebo komplexně polyfunkční cytokinovou odpovědí na přítomnost CMV antigenu (184). Dále jsme ukázali, že léčba kortikoidy významně zvyšuje riziko reaktivace

CMV nezávisle na CMV specifické T buněčné odpovědi. U některých pacientů, kteří byli léčeni kortikoidy, i přesto, že jsme u nich byli schopni detekovat CMV specifické T lymfocyty, došlo k reaktivaci CMV.

Výsledky naší práce tak umožňují časnou identifikaci rizikových pacientů s protrahovanými CMV reaktivacemi, u kterých je vhodné začít s preemptivní terapií antivirotik. Zároveň umožňují identifikaci pacientů, kteří jsou schopni tyto reaktivity vyřešit spontánně a preemptivní terapie by u nich mohla být odložena. Tito pacienti tak nejsou vystaveni vedlejším toxickým efektům antivirotik a zároveň u nich může dojít k lepšímu celkovému vývoji imunitních funkcí (185).

Vzhledem k poměrně úspěšné identifikaci rizikových pacientů s protrahovanými a refrakterními CMV reaktivacemi jsme se také zabývali možností adoptivního transferu CMV specifických T lymfocytů, jakožto alternativní možnosti terapie k podávání virostatik (186). V laboratořích CLIP 2.If UK jsme zavedli ve spolupráci s oddělením buněčné terapie ÚHKT dvě metody selekce CMV specifických T lymfocytů a zároveň jsme vytvořili vhodné schéma pro testování potenciálních dárců CMV specifických T lymfocytů. Vhodného dárce jsme byli schopni identifikovat pro 85 % našich pacientů, což umožňuje poměrně široké využití této buněčné terapie. Dokonce u dvou dospělých pacientů s protrahovanou CMV reaktivací a absencí CMV specifických buněk jsme provedli převody CMV specifických buněk od třetího (příbuzného) dárce bez dalších klinických komplikací. I přes konečný pokles hladiny CMV DNAémie je přínos k vyřešení reaktivity na takto limitovaném vzorku obtížné posoudit. Adoptivní transfer virus specifických buněk rozšiřujeme i o další viry (EBV, ADV) tak, abychom mohli nabídnout tento terapeutický přístup širšímu spektru pacientů. Bohužel se stále jedná o experimentální terapii, která má sice velký terapeutický potenciál, ale není jednoduše použitelná ve všech transplantačních centrech, i když existují slibné přístupy, které by to v budoucnu mohly umožnit (187).

Při podrobnějším zkoumání proliferačních odpovědí CMV specifických buněk na stimulaci CMV peptidy v kombinaci s detekcí ICS jsme identifikovali populaci T lymfocytů, která v reakci na stimulaci antigenem proliferuje, ale neprodukuje žádný z vyšetřovaných cytokinů. Tato skutečnost může být vysvětlena nescifickou aktivací těchto buněk v přítomnosti cytokinového prostředí specifických buněk (bystander aktivace) (188), nebo se může jednat zatím o neznámý funkční typ buněk, které mohou hrát roli při kontrole CMV reaktivity. Z toho vyplývá, že pro plné porozumění této komplexní otázce je nutné použít panely a metody s ještě větším obsahem parametrů.

Abychom získali co nejpodrobnější informaci o průběhu rekonstituce imunitního systému, rozhodli jsme se pro zavedení metody hmotnostní cytometrie, která umožňuje detekci až 50-ti znaků současně na jedné buňce. Zároveň se ale jedná o metodu výrazně pomalejší a s dalšími limity (absence nastavení prahu detekce a absence detekce rozptýleného světla v přímém a bočním směru) (111). Bylo proto nutné zavést novou metodu přípravy vzorků pomocí CD81+ imunoafinitní chromatografie (CD81+ T-Catch™) k získání čistších buněčných suspenzí, čímž jsme dokázali celý proces akvizice vzorku zkrátit v průměru 2,4krát oproti vzorkům připravovaným pomocí izolace přes hustotní gradient Ficoll-Paque™. Další výhodou bylo snížení množství kontaminujících populací a to jak volných, tak navázaných na cílové buňky. Jedinou nevýhodou metody CD81+ T-Catch™ tak byly kvantitativně nižší výtěžky oproti izolaci přes hustotní gradient. Obecně je velkou výhodou imunoafinitních metod to, že v případě potřeby lze nahradit selekční znak CD81 jiným (například CD19, CD45) nebo izolovat buňky v sériové selekci, kdy lze postupně pomocí několika znaků (například CD8, CD62L) izolovat všechny paměťové CD8+ T lymfocyty.

Při analýzách dat z hmotnostní cytometrie jsme také zavedli nesupervidované analýzy vzorků, které nám pomohly identifikovat 18 přehlížených nebo neznámých populací buněk a umožnily nám tak maximální zisk informací z našeho panelu. Je sice pravda, že ani tyto nesupervidované analýzy se nakonec neobejdou bez finální expertní analýzy, ale i zjednodušení desítek dimenzí do dvou je významné ulehčení při hledání specifických buněčných populací (189), které se ukázalo být užitečné i v datových souborech s 6-ti fluorescenčními parametry.

Odlišnou roli CMV specifické T buněčné imunity jsme ukázali u pacientů po transplantaci ledviny, kdy se zdá, že přítomnost CMV specifických klonů hraje roli při akutní rejekci štěpu. Pomocí repertoárové analýzy předtransplantačních vzorků T lymfocytů proliferujících v reakci na přítomnost a nebo CMV antigenů jsme byli schopni identifikovat několik klonů zkříženě reagujících na oba antigeny. Tyto klony jsme pak byli schopni identifikovat dokonce i v bioptických vzorcích ledvin, kdy vyšší frekvence zkříženě reagujících klonů odpovídaly CMV asociované T buněčné akutní rejekci štěpu. Ukazujeme tak, že CMV specifické klony T lymfocytů mohou hrát významnou roli při rejekci štěpu, pokud jsou T lymfocyty vystaveny chronickému antigennímu stimulu, jak uvádí i další studie (190, 191). Abo zkříženě reagující T lymfocyty přes stejné TCR byly popsány u EBV, CMV, varicella-zoster viru a u viru chřipky typu A (192, 193). Naše data ovšem poprvé ukazují výskyt těchto zkříženě reagujících klonů již v předtransplantačních vzorcích periferní krve a v bioptických vzorcích ve fázi rejekce. Z těchto dat je tedy patrné, že pro omezení rejekcí transplantovaných ledvin je vhodné časné

potlačení CMV reaktivace nejenom pro prevenci rozvoje CMV nemoci. V těchto případech se zdá být rovnováha mezi antivirovou a imunosupresivní léčbou velmi důležitá.

V rámci této dizertační práce jsem se také věnoval *ex vivo* testování nových vysoce afinitních binderů IL-23R a IL-23p19. Tyto bindery byly vytvořeny podobně jako bindery IFN γ (194). Pro potřeby testování jsme vyvinuli specifický test, kdy PBMC buňky necháváme tři dny proliferovat v reakci na nespecifickou anti-CD3 stimulaci za přítomnosti Th17 stimulačního cytokinového prostředí (IL-23 a IL-2). Tato metoda nám umožnila sledovat imunosupresivní efekt těchto binderů jednak při kompetiční vazbě na IL-23R podjednotku IL-23 receptoru, ale i při inhibiční vazbě na p19 podjednotku IL-23 samotného. Výsledkem bylo omezení proliferace Th17 buněk s různou úspěšností nejspíše v závislosti na afinitě jednotlivých binderů. Prokázali jsme tak imunosupresivní vliv na Th17 buňky a potvrdili jsme, že tyto bindery slouží jako antagonisté IL-23 receptoru a IL-23 samotného. Úplně poprvé jsme tak *ex vivo* prokázali imunosupresivní funkci ABD derivovaných binderů. Tyto unikátní bindery by tak mohly být dále využity jako terapeutika při léčbě psoriázy, jelikož jejich malá velikost (5 kD ABD doména) potenciálně umožňuje použití v léčivech, které penetrují kůži.

Touto prací jsem se snažil ukázat význam mnohparametrického sledování imunitního systému na úrovni jednotlivých buněk na příkladech pacientů po HSCT, které i nadále v laboratořích CLIP rozvíjíme. Ilustroval jsem, jaké jsou možnosti klinického využití těchto výsledků a jak se dají tyto poznatky dále transformovat do buněčných terapií. Díky spolupráci s kolegy z Institutu pro klinickou a experimentální medicínu se nám pak podařilo ukázat i negativní stranu T buněčné imunity, a ještě více tak demonstrovat rozmanitost funkcí imunitního systému. Díky zkušenostem, které jsem postupně nabyl, jsme pak mohli vyvinout metodu pro testování nových klinicky užitečných imunosupresivních binderů.

Z předložených výsledků je zřejmé, že pro další pokroky v imunologii je potřeba ovládat celou řadu dovedností na vysoké úrovni, což není jednoduché obsáhnout v rámci jednotlivce a je tedy potřeba nové výzvy řešit v týmu. Jsem rád, že jsem mohl v několika takových týmech pracovat a doufám, že tato dizertační práce je toho důkazem.

6. SEZNAM PUBLIKACÍ

Plné znění publikací, které jsou součástí této dizertační práce, se nachází v kapitole 9.

PELÁK, O., J. STUHLÝ, L. KRÓL, P. HUBÁČEK, P. KESLOVÁ, P. SEDLÁČEK, R. FORMÁNKOVÁ, J. STARÝ, O. HRUŠÁK a T. KALINA. Appearance of cytomegalovirus-specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* [online]. 2017, **92**(5), 380–388. ISSN 1552-4957. **IF₂₀₁₈= 2,938**

STRANAVOVA, L.*, O. PELÁK*, M. SVATON, P. HRUBA, E. FRONKOVA, A. SLAVCEV, K. OSICKOVA, J. MALUSKOVA, P. HUBACEK, J. FRONEK, P. REINKE, H.D. VOLK, T. KALINA a O. VIKLICKY. Heterologous cytomegalovirus and allo-reactivity by shared t cell receptor repertoire in kidney transplantation. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10**(OCT), 1–11. ISSN 16643224. **IF₂₀₁₈= 4,716** (*sdílené autorství)

PELÁK, O., D. KUŽÍLKOVÁ, D. THÜRNER, M.-L. KIENE, K. STANAR, J. STUHLÝ, M. VÁŠKOVÁ, J. STARÝ, O. HRUŠÁK, H. STADLER a T. KALINA. Lymphocyte enrichment using CD81-targeted immunoaffinity matrix. *Cytometry Part A* [online]. 2017, **91**(1), 62–72 [vid. 2020-03-26]. ISSN 15524922. **IF₂₀₁₈= 3,433**

KUCHAŘ, M., L. VAŇKOVÁ, H. PETROKOVÁ, J. CERNÝ, R. OSIČKA, O. PELÁK, H. SÍPOVÁ, B. SCHNEIDER, J. HOMOLA, P. SEBO, T. KALINA a P. MALÝ. Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent *ex vivo* expansion of IL-17-producing T-cells. *Proteins* [online]. 2014, **82**(6), 975–89 [vid. 2014-09-25]. ISSN 1097-0134. **IF₂₀₁₈= 2,501**

KŘÍŽOVÁ, L., M. KUCHAŘ, H. PETROKOVÁ, R. OSIČKA, M. HLAVNIČKOVÁ, O. PELÁK, J. ČERNÝ, T. KALINA a P. MALÝ. p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells. *Autoimmunity* [online]. 2017, **50**(2), 102–113. ISSN 0891-6934. **IF₂₀₁₈= 2,403**

7. OSTATNÍ PUBLIKACE AUTORA

MAJER, F., O. PELÁK, T. KALINA, H. VLASKOVA, L. DVORAKOVA, T. HONZIK, T. PALECEK, P. KUCHYNKA, M. MASEK, J. ZEMAN, M. ELLEDER a J. SIKORA. Mosaic tissue distribution of the tandem duplication of LAMP2 exons 4 and 5 demonstrates the limits of Danon disease cellular and molecular diagnostics. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2014, **37**(1), 117–124. ISSN 0141-8955. **IF₂₀₁₈= 4,827**

STUHLÝ, J., V. KANDEROVÁ, M. VLKOVÁ, I. HEŘMANOVÁ, L. SLÁMOVÁ, O. PELÁK, E. TARALDSRUD, D. JÍLEK, P. KRÁLÍČKOVÁ, B. FEVANG, M. TRKOVÁ, O. HRUŠÁK, E. FRONKOVÁ, A. ŠEDIVÁ, J. LITZMAN a T. KALINA. Common Variable Immunodeficiency patients with a phenotypic profile of immunosenescence present with thrombocytopenia. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 39710. ISSN 2045-2322. **IF₂₀₁₈= 4,011**

MAJER, F., L. PIHEROVA, M. REBOUN, V. STARA, O. PELÁK, P. NORAMBUENA, V. STRANECKY, A. KREBSOVA, H. VLASKOVA, L. DVORAKOVA, S. KMOCH, T. KALINA, M. KUBANEK a J. SIKORA. LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected? *American journal of medical genetics. Part A* [online]. 2018, **176**(11), 2430–2434 [vid. 2019-01-25]. ISSN 1552-4833. **IF₂₀₁₈= 2,197**

BLANCO, E., M. PÉREZ-ANDRÉS, S. ARRIBA-MÉNDEZ, T. CONTRERAS-SANFELICIANO, I. CRIADO, O. PELÁK, A. SERRA-CAETANO, A. ROMERO, N. PUIG, A. REMESAL, J. TORRES CANIZALES, E. LÓPEZ-GRANADOS, T. KALINA, A.E. SOUSA, M. VAN ZELM, M. VAN DER BURG, J.J.M. VAN DONGEN a A. ORFAO. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2018, **141**(6), 2208-2219.e16 [vid. 2019-01-25]. ISSN 00916749. **IF₂₀₁₈= 14,110**

BLANCO, E., M. PEREZ-ANDRES, L. SANOJA-FLORES, M. WENTINK, O. PELÁK, M. MARTÍN-AYUSO, G. GRIGORE, J. TORRES-CANIZALES, E. LÓPEZ-GRANADOS, T. KALINA, M. VAN DER BURG, S. ARRIBA-MÉNDEZ, S. SANTA CRUZ, N. PUIG, J.J.M. VAN DONGEN a A. ORFAO. Selection and validation of antibody clones against IgG and IgA subclasses in switched memory B-cells and plasma cells. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2019, **475**, 112372 [vid. 2019-01-25]. ISSN 00221759. **IF₂₀₁₈= 1,913**

POLÁKOVÁ, I., O. PELÁK, D. THÜRNER, B. POKRÝVKOVÁ, R. TACHEZY, T. KALINA a M. ŠMAHEL. Implementation of Mass Cytometry for Immunoprofiling of Patients with Solid Tumors. *Journal of immunology research* [online]. 2019, **2019**, 6705949 [vid. 2020-04-17]. ISSN 2314-7156. **IF₂₀₁₈= 3,404**

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 BRODIN, P. a M.M. DAVIS. Human immune system variation [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 1. leden 2017. ISSN 14741741. Dostupné z: doi:10.1038/nri.2016.125
- 2 KACZOROWSKI, K.J., K. SHEKHAR, D. NKULIKIYIMFURA, C.L. DEKKER, H. MAECKER, M.M. DAVIS, A.K. CHAKRABORTY a P. BRODIN. Continuous immunotypes describe human immune variation and predict diverse responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [online]. 2017, **114**(30), E6097–E6106. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1705065114
- 3 LJUNGMAN, P., M. BREGNI, M. BRUNE, J. CORNELISSEN, T. De WITTE, G. DINI, H. EINSELE, H.B. GASPAR, A. GRATWOHL, J. PASSWEG, C. PETERS, V. ROCHA, R. SACCARDI, H. SCHOUTEN, A. SUREDA, A. TICHELLI, A. VELARDI a D. NIEDERWIESER. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: Current practice in Europe 2009 [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 6. únor 2010. ISSN 02683369. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2009.141
- 4 BAHCECI, E., D. EPPERSON, D.C. DOUEK, J.J. MELENHORST, R.C. CHILDS a A.J. BARRETT. Early reconstitution of the t-cell repertoire after non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation is from post-thymic t-cell expansion and is unaffected by graft-versus-host disease or mixed chimaerism. British Journal of Haematology [online]. 2003, **122**(6), 934–943. ISSN 00071048. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04522.x
- 5 FEDERMANN, B., M. HÄGELE, M. PFEIFFER, S. WIRTHS, M. SCHUMM, C. FAUL, W. VOGEL, R. HANDGRETINGER, L. KANZ a W.A. BETHGE. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: Impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. Leukemia [online]. 2011, **25**(1), 121–129. ISSN 14765551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2010.235
- 6 STOREK, J., D. WELLS, M.A. DAWSON, B. STORER a D.G. MALONEY. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Blood [online]. 2001, **98**(2), 489–491. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V98.2.489
- 7 STOREK, J., A. JOSEPH, G. ESPINO, M.A. DAWSON, D.C. DOUEK, K.M. SULLIVAN, M.E.D. FLOWERS, P. MARTIN, G. MATHIOUDAKIS, R.A. NASH, R. STORB, F.R. APPELBAUM a D.G. MALONEY. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. Blood [online]. 2001, **98**(13), 3505–3512. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V98.13.3505
- 8 LE, R.Q., J.J. MELENHORST, M. BATTIWALLA, B. HILL, S. MEMON, B.N. SAVANI, A. SHENOY, N.F. HENSEL, E.K. KOKLANARIS, K. KEYVANFAR, F.T. HAKIM, D.C. DOUEK a A.J. BARRETT. Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation. Blood [online]. 2011, **117**(19), 5250–5256. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2011-01-329706
- 9 GRATWOHL, A., R. BRAND, F. FRASSONI, V. ROCHA, D. NIEDERWIESER, P. REUSSER, H. EINSELE, C. CORDONNIER, A. URBANO-ISPIZUA, A. BAUR, P. ELVY, V. CHESNELS, N.C. GORIN, P. LJUNGMAN, C. RUIZ DE ELVIRA, J.P. JOUET, A. HAGENBEEK, A. BIEZEN, N. TAZELAAR, H. GREINIX, B. GRITSCH, M. TRNKOVA, M. VIGNETTI, W. ARCESE, R. ONETO, H. OTTINGER, C. MÜLLER, B. KUBANEK, N. SCHMITZ, U.W. SCHAEFER, J. PASSWEG, H. BALDOMERO, K. TOWLSON, N. RUSSELL, M. ARAT, G. GURMAN a N. NAYA. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: An EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time [online]. listopad 2005. ISSN 02683369. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bmt.1705140
- 10 LJUNGMAN, P., M. HAKKI a M. BOECKH. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. Hematology/oncology clinics of North America [online]. 2011, **25**(1), 151–69 [vid. 2012-04-28]. ISSN 1558-1977. Dostupné z: doi:10.1016/j.hoc.2010.11.011
- 11 STYCZYNSKI, J., H. EINSELE, L. GIL a P. LJUNGMAN. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: A

- comprehensive review of reported cases: Review article [online]. B.m.: *Transpl Infect Dis.* říjen 2009. ISSN 13982273. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-3062.2009.00411.x
- 12 KOC, Y., K.B. MILLER, D.P. SCHENKEIN, J. GRIFFITH, M. AKHTAR, J. DESJARDIN a D.R. SNYDMAN. Varicella Zoster Virus Infections Following Allogeneic Bone Marrow Transplantation: Frequency, Risk Factors, and Clinical Outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2000, **6**(1), 44–49. ISSN 10838791. Dostupné z: doi:10.1016/S1083-8791(00)70051-6
 - 13 KLARENBECK, P.L., E.B.M. REMMERSWAAL, I.J.M. TEN BERGE, M.E. DOORENSPLEET, B.D.C. VAN SCHAIK, R.E.E. ESVELDT, S.D. KOCH, a TEN BRINKE, a H.C. VAN KAMPEN, F.J. BEMELMAN, P.P. TAK, F. BAAS, N. DE VRIES a R. a W. VAN LIER. Deep sequencing of antiviral T-cell responses to HCMV and EBV in humans reveals a stable repertoire that is maintained for many years. *PLoS pathogens* [online]. 2012, **8**(9), e1002889 [vid. 2014-07-28]. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1002889
 - 14 SYLWESTER, A.W., B.L. MITCHELL, J.B. EDGAR, C. TAORMINA, C. PELTE, F. RUCHTI, P.R. SLEATH, K.H. GRABSTEIN, N.A. HOSKEN, F. KERN, J.A. NELSON a L.J. PICKER. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *Journal of Experimental Medicine* [online]. 2005, **202**(5), 673–685. ISSN 00221007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20050882
 - 15 CANNON, M.J., D.S. SCHMID a T.B. HYDE. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection [online]. B.m.: *Rev Med Virol.* červenec 2010. ISSN 10529276. Dostupné z: doi:10.1002/rmv.655
 - 16 KORNDREWAL, M.J., L. MOLLEMA, I. TCHERNIAEVA, F. VAN DER KLIS, A.C.M. KROES, A.M. OUDESLUYS-MURPHY, A.C.T.M. VOSSEN a H.E. DE MELKER. Cytomegalovirus infection in the Netherlands: Seroprevalence, risk factors, and implications. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2015, **63**, 53–58. ISSN 18735967. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2014.11.033
 - 17 CWYNARSKI, K., J. AINSWORTH, M. COBBOLD, S. WAGNER, P. MAHENDRA, J. APPERLEY, J. GOLDMAN, C. CRADDOCK a P.A.H. MOSS. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* [online]. 2001, **97**(5), 1232–1240. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V97.5.1232
 - 18 GRATAMA, J.W., J.W.J. VAN ESSER, C.H.J. LAMERS, C. TOURNAY, B. LÖWENBERG, R.L.H. BOLHUIS a J.J. CORNELISSEN. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* [online]. 2001, **98**(5), 1358–1364. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V98.5.1358
 - 19 HEBART, H., S. DAGINIK, S. STEVANOVIC, U. GRIGOLEIT, A. DOBLER, M. BAUR, G. RAUSER, C. SINZGER, G. JAHN, J. LOEFFLER, L. KANZ, H.G. RAMMENSEE a H. EINSELE. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- γ -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* [online]. 2002, **99**(10), 3830–3837. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V99.10.3830
 - 20 GALLEZ-HAWKINS, G.M., L. THAO, J. PALMER, A. DAGIS, X. LI, A.E. FRANCK, B. TEGTMEIER, S.F. LACEY, D.J. DIAMOND, S.J. FORMAN a J.A. ZAIA. Increased Programmed Death-1 Molecule Expression in Cytomegalovirus Disease and Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2009, **15**(7), 872–880. ISSN 10838791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2009.03.022
 - 21 KATO, T., T. NISHIDA, Y. ITO, M. MURASE, M. MURATA a T. NAOE. Correlations of programmed death 1 expression and serum IL-6 level with exhaustion of cytomegalovirus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cellular Immunology* [online]. 2014, **288**(1–2), 53–59. ISSN 10902163. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellimm.2014.02.007
 - 22 BOECKH, M., W. LEISENRING, S.R. RIDDELL, R.A. BOWDEN, M. HUANG, D. MYERSON, T. STEVENS-AYERS, M.E.D. FLOWERS, T. CUNNINGHAM a L. COREY. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and

- T-cell immunity. *Blood* [online]. 2003, **101**(2), 407–14. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2002-03-0993
- 23 ULLMANN, A.J., M. SCHMIDT-HIEBER, H. BERTZ, W.J. HEINZ, M. KIEHL, W. KRÜGER, S. MOUSSET, S. NEUBURGER, S. NEUMANN, O. PENACK, G. SILLING, J.J. VEHRESCHILD, H. EINSELE a G. MASCHMEYER. Infectious diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: prevention and prophylaxis strategy guidelines 2016. *Annals of Hematology* [online]. 2016, **95**(9), 1435–1455. ISSN 14320584. Dostupné z: doi:10.1007/s00277-016-2711-1
 - 24 GREEN, M.L., W. LEISENRING, H. XIE, T.C. MAST, Y. CUI, B.M. SANDMAIER, M.L. SORROR, S. GOYAL, S. ÖZKÖK, J. YI, F. SAHOO, L.E. KIMBALL, K.R. JEROME, M.A. MARKS a M. BOECKH. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *The Lancet Haematology* [online]. 2016, **3**(3), e119–e127. ISSN 23523026. Dostupné z: doi:10.1016/S2352-3026(15)00289-6
 - 25 PARODY, R., R. MARTINO, R. DE LA CÁMARA, A. GARCÍA-NOBLEJAS, A. ESQUIROL, I. GARCIA-CADENAS, T. VILLAESCUSA, D. CABALLERO, M. ROVIRA, F. FERNANDEZ-AVILÉS, F.J. MARQUEZ-MALAVAR, I. ESPIGADO, C. CASTILLA-LLORENTE, I. HERAS, M.A. CABERO, J.R. CABRERA, P. BARBA, D. VALCARCEL, I. SÁNCHEZ-ORTEGA, R.F. DUARTE, D. SERRANO, F. CARRETERO a L. VAZQUEZ. Fungal and viral infections after allogeneic hematopoietic transplantation from unrelated donors in adults: Improving outcomes over time. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2015, **50**(2), 274–281. ISSN 14765365. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2014.229
 - 26 BOECKH, M. Complications, Diagnosis, Management, and Prevention of CMV Infections: Current and Future. *Hematology* [online]. 2011, **2011**, 305–309. ISSN 1520-4391. Dostupné z: doi:10.1182/asheducation-2011.1.305
 - 27 SELLAR, R. a K. PEGGS. Therapeutic strategies for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. 2012, 1161–1172. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/14712598.2012.693471>
 - 28 BATTIWALLA, M., Y. WU, R.P.S. BAJWA, M. RADOVIC, N.G. ALMYROUDIS, B.H. SEGAL, P.K. WALLACE, R. NAKAMURA, S. PADMANABHAN, T. HAHN a P.L. MCCARTHY. Ganciclovir inhibits lymphocyte proliferation by impairing DNA synthesis. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2007, **13**(7), 765–70. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2007.03.009
 - 29 BEHRENDT, C.E., J. ROSENTHAL, E. BOLOTIN, R. NAKAMURA, J. ZAIA a S.J. FORMAN. Donor and Recipient CMV Serostatus and Outcome of Pediatric Allogeneic HSCT for Acute Leukemia in the Era of CMV-Preemptive Therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2009, **15**(1), 54–60. ISSN 10838791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2008.10.023
 - 30 GREEN, M.L., W.M. LEISENRING, H. XIE, R.B. WALTER, M. MIELCAREK, B.M. SANDMAIER, S.R. RIDDELL a M. BOECKH. CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood* [online]. 2013, **122**(7), 1316–24. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-02-487074
 - 31 ELMAAGACLI, A.H., N.-K. STECKEL, Y. HEGERFELDT, M. KOLDEHOFF, M. DITSCHKOWSKI, S. CHRISTOPH, T. GROMKE, R.S. ROSS a D.W. BEELEN. Early Cytomegalovirus Replication After Allogeneic Stem Cell Transplantation Is Associated With a Dramatically Reduced Relapse Risk in Acute Myeloid Leukemia Patients: Evidence for a Putative Virus-Versus-Leukemia Effect [online]. 2011. ISSN 10838791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2010.12.034
 - 32 LUGTHART, G., M.M. VAN OSTAIJEN-TEN DAM, C.M. JOL-VAN DER ZIJDE, T.C. VAN HOLTEN, M.G.D. KESTER, M.H.M. HEEMSKERK, R.G.M. BREDIUS, M.J.D. VAN TOL a A.C. LANKESTER. Early Cytomegalovirus Reactivation Leaves a Specific and Dynamic Imprint on the Reconstituting T Cell Compartment Long-Term after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2014, (February), 1–8 [vid. 2014-02-20]. ISSN 1523-6536. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.018
 - 33 QAYED, M., M. KHURANA, J. HILINSKI, S. GILLESPIE, C. MCCRACKEN, K. APPLGATE, K.

- CHIANG a J. HORAN. Risk for CMV reactivation in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric blood & cancer* [online]. 2014, (September 2014), 364–366 [vid. 2015-02-20]. ISSN 1545-5017. Dostupné z: doi:10.1002/pbc.25237
- 34 PELÁK, O., J. STUHLÝ, L. KRÓL, P. HUBÁČEK, P. KESLOVÁ, P. SEDLÁČEK, R. FORMÁNKOVÁ, J. STARÝ, O. HRUŠÁK a T. KALINA. Appearance of cytomegalovirus-specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* [online]. 2017, **92**(5), 380–388. ISSN 1552-4957. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.21348
- 35 HEUTINCK, K.M., S.L. YONG, L. TONNEIJCK, H. VAN DEN HEUVEL, N.C. VAN DER WEERD, K.A.M.I. VAN DER PANT, F.J. BEMELMAN, F.H.J. CLAAS a I.J.M. TEN BERGE. Virus-Specific CD8⁺ T Cells Cross-Reactive to Donor-Alloantigen Are Transiently Present in the Circulation of Kidney Transplant Recipients Infected With CMV and/or EBV. *American Journal of Transplantation* [online]. 2016, **16**(5), 1480–1491 [vid. 2020-04-20]. ISSN 16006135. Dostupné z: doi:10.1111/ajt.13618
- 36 STRANAVOVA, L., O. PELAK, M. SVATON, P. HRUBA, E. FRONKOVA, A. SLAVCEV, K. OSICKOVA, J. MALUSKOVA, P. HUBACEK, J. FRONEK, P. REINKE, H.D. VOLK, T. KALINA a O. VIKLICKY. Heterologous cytomegalovirus and allo-reactivity by shared t cell receptor repertoire in kidney transplantation. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10**(OCT), 1–11. ISSN 16643224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.02549
- 37 DE ROSA, S.C., L.A. HERZENBERG, L.A. HERZENBERG a M. ROEDERER. 11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naive T cells by phenotype, function and T-cell receptor diversity. *Nature Medicine* [online]. 2001, **7**(2), 245–248 [vid. 2018-04-16]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/84701
- 38 MACKAY, L.K., A. RAHIMPOUR, J.Z. MA, N. COLLINS, A.T. STOCK, M.L. HAFON, J. VEGARAMOS, P. LAUZURICA, S.N. MUELLER, T. STEFANOVIC, D.C. TSCHARKE, W.R. HEATH, M. INOUE, F.R. CARBONE a T. GEBHARDT. The developmental pathway for CD103⁺ CD8⁺ tissue-resident memory T cells of skin. *Nature Immunology* [online]. 2013, **14**(12), 1294–1301. ISSN 15292908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.2744
- 39 MAK, T.W., P.S. OHASHI MARTIN F BACHMANN, P. WATERHOUSE a D.E. SPEISER. Anti-Viral Cytotoxic T Cells Normal Responsiveness of CTLA-4-Deficient [online]. 1998 [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/160/1/95>
- 40 CHATTOPADHYAY, P.K. a M. ROEDERER. Good cell, bad cell: Flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease [online]. B.m.: Cytometry A. červenec 2010. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20905
- 41 FEUGIER, P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas [online]. B.m.: Future Medicine Ltd. 1. květen 2015. ISSN 17448301. Dostupné z: doi:10.2217/fon.15.57
- 42 TAYLOR, P.C. a M. FELDMANN. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* [online]. 2009, **5**(10), 578–82 [vid. 2018-04-16]. ISSN 1759-4804. Dostupné z: doi:10.1038/nrrheum.2009.181
- 43 CHAE, Y.K., A. ARYA, W. IAMS, M.R. CRUZ, S. CHANDRA, J. CHOI a F. GILES. Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal for immunotherapy of cancer* [online]. 2018, **6**(1), 39 [vid. 2018-08-28]. ISSN 2051-1426. Dostupné z: doi:10.1186/s40425-018-0349-3
- 44 CHATTOPADHYAY, P.K. a M. ROEDERER. A mine is a terrible thing to waste: High content, single cell technologies for comprehensive immune analysis [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd. 1. květen 2015. ISSN 16006143. Dostupné z: doi:10.1111/ajt.13193
- 45 CHATTOPADHYAY, P.K., T.M. GIERAHN, M. ROEDERER a J.C. LOVE. Single-cell technologies for monitoring immune systems. *Nature Immunology* [online]. 2014, **15**(2), 128–135 [vid. 2020-04-03]. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.2796

- 46 MAJER, F., O. PELAK, T. KALINA, H. VLASKOVA, L. DVORAKOVA, T. HONZIK, T. PALECEK, P. KUCHYNKA, M. MASEK, J. ZEMAN, M. ELLEDER a J. SIKORA. Mosaic tissue distribution of the tandem duplication of LAMP2 exons 4 and 5 demonstrates the limits of Danon disease cellular and molecular diagnostics. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2014, **37**(1), 117–124. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-013-9617-z
- 47 KRUTZIK, P.O., J.M. IRISH, G.P. NOLAN a O.D. PEREZ. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: Techniques and clinical applications. *Clinical Immunology* [online]. 2004, **110**(3), 206–221. ISSN 15216616. Dostupné z: doi:10.1016/j.clim.2003.11.009
- 48 TALAL, N. Lymphocyte Heterogeneity and Function. *Arthritis & Rheumatism* [online]. 1973, **16**(3), 422–425. ISSN 15290131. Dostupné z: doi:10.1002/art.1780160321
- 49 SCHROEDER, H.W. Similarity and divergence in the development and expression of the mouse and human antibody repertoires. *Developmental and Comparative Immunology* [online]. 2006, **30**(1–2), 119–135. ISSN 0145305X. Dostupné z: doi:10.1016/j.dci.2005.06.006
- 50 OPENSHAW, P., E.E. MURPHY, N.A. HOSKEN, V. MAINO, K. DAVIS, K. MURPHY a A. O’GARRA. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 1995, **182**(5), 1357–1367 [vid. 2020-04-04]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.182.5.1357
- 51 HUSSELL, T., L.C. SPENDER, A. GEORGIU, A. O’GARRA a P.J.M. OPENSHAW. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* [online]. 1996, **77**(10), 2447–2455. ISSN 00221317. Dostupné z: doi:10.1099/0022-1317-77-10-2447
- 52 TONEGAWA, S. Somatic reorganization of immunoglobulin genes during lymphocyte differentiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1981, **45**, 839–858.
- 53 MM DAVIS, P.B. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988, **334**, 395.
- 54 PADOVAN, E. Expression of two TCR α -chains: dual receptor T cells. *Science*. 1993, **262**, 422.
- 55 WR HEATH, J.M. Expression of two α -chains on the surface of T cells in TCR transgenic mice. *J. Exp. Med.* 1993, **178**, 1807.
- 56 PETRIE, H. Multiple rearrangements in T cell receptor α -chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J. Exp. Med.* 1993, **178**, 615–622.
- 57 L IGNATOWICZ, J.K.P.M. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell*. 1996, **84**, 521–529.
- 58 S TOURNE, N.N.S.V.C.B.D.M. The influence of invariant chain on the positive selection of single T cell receptor specificities. *Eur. J. Immunol.* 1995, **25**, 1851–1856.
- 59 J ZERRAHN, W.H.D.R. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell*. 1997, **88**, 627–636.
- 60 C BOUNEAUD, P.K.P.B. Impact of negative selection of the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*. 2000, **13**, 829–840.
- 61 ARSTILA, T.P., A. CASROUGE, V. BARON, J. EVEN, J. KANELLOPOULOS a P. KOURILSKY. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1999, **286**(5441), 958–61 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542151>
- 62 BOUSSO, P. Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires. *Immunity*. 1998, **9**, 169–178.
- 63 JENKINS, M.K., H.H. CHU, J.B. MCLACHLAN a J.J. MOON. On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands. *Annual review of immunology* [online]. 2010, **28**(1), 275–94 [vid. 2018-04-16]. ISSN 1545-3278. Dostupné

z: doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101253

- 64 BURNET, F.M. A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production using the Concept of Clonal Selection. CA: A Cancer Journal for Clinicians [online]. 1976, **26**(2), 119–121 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0007-9235. Dostupné z: doi:10.3322/canjclin.26.2.119
- 65 MASOPUST, D. Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. Science [online]. 2001, **291**(5512), 2413–2417 [vid. 2018-04-16]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1058867
- 66 SUNG, J.H., H. ZHANG, E.A. MOSEMAN, D. ALVAREZ, M. IANNAcone, S.E. HENRICKSON, J.C. DE LA TORRE, J.R. GROOM, A.D. LUSTER a U.H. VON ANDRIAN. Chemokine Guidance of Central Memory T Cells Is Critical for Antiviral Recall Responses in Lymph Nodes. Cell [online]. 2012, **150**(6), 1249–1263 [vid. 2018-04-16]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2012.08.015
- 67 KAECH, S.M., S. HEMBY, E. KERSH a R. AHMED. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. Cell [online]. 2002, **111**(6), 837–51 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12526810>
- 68 WOLINT, P., M.R. BETTS, R.A. KOUP a A. OXENIUS. Immediate Cytotoxicity But Not Degranulation Distinguishes Effector and Memory Subsets of CD8⁺ T Cells. The Journal of Experimental Medicine [online]. 2004, **199**(7), 925–936 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20031799
- 69 PARK, H., Z. LI, X.O. YANG, S.H. CHANG, R. NURIEVA, Y.H. WANG, Y. WANG, L. HOOD, Z. ZHU, Q. TIAN a C. DONG. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nature Immunology [online]. 2005, **6**(11), 1133–1141. ISSN 15292908. Dostupné z: doi:10.1038/ni1261
- 70 HARRINGTON, L.E., R.D. HATTON, P.R. MANGAN, H. TURNER, T.L. MURPHY, K.M. MURPHY a C.T. WEAVER. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nature Immunology [online]. 2005, **6**(11), 1123–1132. ISSN 15292908. Dostupné z: doi:10.1038/ni1254
- 71 SCHMITT, E., M. KLEIN a T. BOPP. Th9 cells, new players in adaptive immunity [online]. B.m.: Trends Immunol. únor 2014. ISSN 14714906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2013.10.004
- 72 EYERICH, S., K. EYERICH, D. PENNINO, T. CARBONE, F. NASORRI, S. PALLOTTA, F. CIANFARANI, T. ODORISIO, C. TRAILD-HOFFMANN, H. BEHRENDT, S.R. DURHAM, C.B. SCHMIDT-WEBER a A. CAVANI. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. Journal of Clinical Investigation [online]. 2009, **119**(12), 3573–3585 [vid. 2020-04-07]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI40202
- 73 CROTTY, S. Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}) . Annual Review of Immunology [online]. 2011, **29**(1), 621–663. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
- 74 JOSEFOWICZ, S.Z. a A. RUDENSKY. Control of Regulatory T Cell Lineage Commitment and Maintenance [online]. B.m.: Immunity. 22. květen 2009. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2009.04.009
- 75 LUCKHEERAM, R.V., R. ZHOU, A.D. VERMA a B. XIA. CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. Clinical and Developmental Immunology [online]. 2012, **2012**, 1–12 [vid. 2020-04-08]. ISSN 1740-2522. Dostupné z: doi:10.1155/2012/925135
- 76 SALLUSTO, F., D. LENIG, R. FÖRSTER, M. LIPP a A. LANZAVECCHIA. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature [online]. 1999, **401**(6754), 708–712 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/44385
- 77 GEBHARDT, T., L.M. WAKIM, L. EIDSMO, P.C. READING, W.R. HEATH a F.R. CARBONE. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. Nature Immunology [online]. 2009, **10**(5), 524–530 [vid. 2018-04-16]. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1718

- 78 GEBHARDT, T., P.G. WHITNEY, A. ZAID, L.K. MACKAY, A.G. BROOKS, W.R. HEATH, F.R. CARBONE a S.N. MUELLER. Different patterns of peripheral migration by memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Nature* [online]. 2011, **477**(7363), 216–219 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature10339
- 79 STEINERT, E.M., J.M. SCHENKEL, K.A. FRASER, L.K. BEURA, L.S. MANLOVE, B.Z. IGYÁRTÓ, P.J. SOUTHERN a D. MASOPUST. Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance. *Cell* [online]. 2015, **161**(4), 737–749 [vid. 2018-04-16]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2015.03.031
- 80 KING, I.L. a M. MOHRS. IL-4-producing CD4⁺ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2009, **206**(5), 1001–1007 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20090313
- 81 ZARETSKY, A.G., J.J. TAYLOR, I.L. KING, F.A. MARSHALL, M. MOHRS a E.J. PEARCE. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2009, **206**(5), 991–999 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20090303
- 82 NAKAYAMADA, S., Y. KANNO, H. TAKAHASHI, D. JANKOVIC, K.T. LU, T.A. JOHNSON, H. SUN, G. VAHEDI, O. HAKIM, R. HANDON, P.L. SCHWARTZBERG, G.L. HAGER a J.J. O'SHEA. Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity* [online]. 2011, **35**(6), 919–931 [vid. 2018-04-16]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2011.11.012
- 83 HIROTA, K., J.H. DUARTE, M. VELDHUEN, E. HORNSBY, Y. LI, D.J. CUA, H. AHLFORS, C. WILHELM, M. TOLAINI, U. MENZEL, A. GAREFALAKI, A.J. POCOCNIK a B. STOCKINGER. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature Immunology* [online]. 2011, **12**(3), 255–263 [vid. 2018-04-16]. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1993
- 84 PEPPER, M., A.J. PAGÁN, B.Z. IGYÁRTÓ, J.J. TAYLOR a M.K. JENKINS. Opposing Signals from the Bcl6 Transcription Factor and the Interleukin-2 Receptor Generate T Helper 1 Central and Effector Memory Cells. *Immunity* [online]. 2011, **35**(4), 583–595 [vid. 2018-04-16]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2011.09.009
- 85 PEPPER, M. a M.K. JENKINS. Origins of CD4⁺ effector and central memory T cells. *Nature Immunology* [online]. 2011, **12**(6), 467–471 [vid. 2018-06-02]. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.2038
- 86 CANTOR, H., E. SIMPSON, V.L. SATO, C.G. FATHMAN a L.A. HERZENBERG. Characterization of subpopulations of T lymphocytes. I. Separation and functional studies of peripheral T-cells binding different amounts of fluorescent anti-Thy 1.2 (theta) antibody using a fluorescence-activated cell sorter (FACS). *Cellular immunology* [online]. 1975, **15**(1), 180–96 [vid. 2018-09-25]. ISSN 0008-8749. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1088903>
- 87 PARKS, D.R., V.M. BRYAN, V.T. OI a L.A. HERZENBERG. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1979, **76**(4), 1962–6 [vid. 2018-09-25]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/287037>
- 88 MAIR, F., F.J. HARTMANN, D. MRDJEN, V. TOSEVSKI, C. KRIEG a B. BECHER. The end of gating? An introduction to automated analysis of high dimensional cytometry data. *European Journal of Immunology* [online]. 2016, **46**(1), 34–43 [vid. 2018-09-25]. ISSN 00142980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201545774
- 89 ERBER, W.N., H. ASBAHR, S.A. RULE a C.S. SCOTT. Unique immunophenotype of acute promyelocytic leukaemia as defined by CD9 and CD68 antibodies. *British Journal of Haematology* [online]. 1994, **88**(1), 101–104. ISSN 00071048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.1994.tb04983.x
- 90 LIU, A.Y., M.P. ROUDIER a L.D. TRUE. Heterogeneity in Primary and Metastatic Prostate Cancer as Defined by Cell Surface CD Profile. *The American Journal of Pathology* [online]. 2004, **165**(5), 1543–1556 [vid. 2018-11-26]. ISSN 00029440. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9440(10)63412-8
- 91 YANG, J., H. LUO, Y. LI, J. LI, Z. CAI, X. SU, D. DAI, W. DU, T. CHEN a M. CHEN. Intratumoral

- Heterogeneity Determines Discordant Results of Diagnostic Tests for Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER) 2 in Gastric Cancer Specimens. *Cell Biochemistry and Biophysics* [online]. 2012, **62**(1), 221–228 [vid. 2018-11-26]. ISSN 1085-9195. Dostupné z: doi:10.1007/s12013-011-9286-1
- 92 BRAGADO, P., Y. ESTRADA, M.S. SOSA, A. AVIVAR-VALDERAS, D. CANNAN, E. GENDEN, M. TENG, A.C. RANGANATHAN, H.-C. WEN, A. KAPOOR, E. BERNSTEIN a J.A. AGUIRRE-GHISO. Analysis of Marker-Defined HNSCC Subpopulations Reveals a Dynamic Regulation of Tumor Initiating Properties. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(1), e29974 [vid. 2018-11-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0029974
- 93 CHOIJAMTS, B., S. JIMI, T. KONDO, Y. NAGANUMA, T. MATSUMOTO, M. KUROKI, H. IWASAKI a M. EMOTO. CD133+ cancer stem cell-like cells derived from uterine carcinosarcoma (malignant mixed Müllerian tumor). *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2011, **29**(10), 1485–95 [vid. 2018-11-26]. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.711
- 94 BONNET, D. a J.E. DICK. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* [online]. 1997, **3**(7), 730–7 [vid. 2018-11-26]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212098>
- 95 CHO, R.W. a M.F. CLARKE. Recent advances in cancer stem cells [online]. únor 2008 [vid. 2019-01-21]. ISBN 0959-437X (Print)r0959-437x. Dostupné z: doi:10.1016/j.gde.2008.01.017
- 96 LOBO, N.A., Y. SHIMONO, D. QIAN a M.F. CLARKE. The Biology of Cancer Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 2007, **23**(1), 675–699 [vid. 2019-01-21]. ISSN 1081-0706. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154
- 97 NGUYEN, L. V, R. VANNER, P. DIRKS a C.J. EAVES. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature reviews. Cancer* [online]. 2012, **12**(2), 133–43 [vid. 2019-01-21]. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc3184
- 98 WANG, T., S. SHIGDAR, M.P. GANTIER, Y. HOU, L. WANG, Y. LI, H. AI SHAMAILEH, W. YIN, S.-F. ZHOU, X. ZHAO a W. DUAN. Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies. *Oncotarget* [online]. 2015, **6**(42) [vid. 2019-01-21]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.6176
- 99 IRISH, J.M., R. HOVLAND, P.O. KRUTZIK, O.D. PEREZ, Ø. BRUSERUD, B.T. GJERTSEN a G.P. NOLAN. Single Cell Profiling of Potentiated Phospho-Protein Networks in Cancer Cells. *Cell* [online]. 2004, **118**(2), 217–228 [vid. 2019-01-21]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2004.06.028
- 100 KOTECHA, N., N.J. FLORES, J.M. IRISH, E.F. SIMONDS, D.S. SAKAI, S. ARCHAMBEAULT, E. DIAZ-FLORES, M. CORAM, K.M. SHANNON, G.P. NOLAN a M.L. LOH. Single-Cell Profiling Identifies Aberrant STAT5 Activation in Myeloid Malignancies with Specific Clinical and Biologic Correlates. *Cancer Cell* [online]. 2008, **14**(4), 335–343 [vid. 2019-02-05]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2008.08.014
- 101 IRISH, J.M., J.H. MYKLEBUST, A.A. ALIZADEH, R. HOUOT, J.P. SHARMAN, D.K. CZERWINSKI, G.P. NOLAN a R. LEVY. B-cell signaling networks reveal a negative prognostic human lymphoma cell subset that emerges during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2010, **107**(29), 12747–54 [vid. 2019-02-05]. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1002057107
- 102 PALAZZO, A.L., E. EVENSEN, Y.-W. HUANG, A. CESANO, G.P. NOLAN a W.J. FANTL. Association of Reactive Oxygen Species-Mediated Signal Transduction with In Vitro Apoptosis Sensitivity in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(10), e24592 [vid. 2019-02-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0024592
- 103 PEREZ, O.D. a G.P. NOLAN. Resistance is futile: assimilation of cellular machinery by HIV-1. *Immunity* [online]. 2001, **15**(5), 687–90 [vid. 2019-02-05]. ISSN 1074-7613. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728331>
- 104 KRUTZIK, P.O. a G.P. NOLAN. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: Monitoring single cell signaling events. *Cytometry* [online]. 2003, **55A**(2), 61–70 [vid. 2019-02-05].

- 105 SACHS, K., O. PEREZ, D. PE'ER, D.A. LAUFFENBURGER a G.P. NOLAN. Causal Protein-Signaling Networks Derived from Multiparameter Single-Cell Data. *Science* [online]. 2005, **308**(5721), 523–529 [vid. 2019-02-05]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1105809
- 106 ROSEN, D.B., S. PUTTA, T. COVEY, Y.-W. HUANG, G.P. NOLAN, A. CESANO, M.D. MINDEN a W.J. FANTL. Distinct Patterns of DNA Damage Response and Apoptosis Correlate with Jak/Stat and PI3Kinase Response Profiles in Human Acute Myelogenous Leukemia [online]. nedatováno [vid. 2020-03-19]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0012405
- 107 KRUTZIK, P.O., J.M. CRANE, M.R. CLUTTER a G.P. NOLAN. High-content single-cell drug screening with phosphospecific flow cytometry. *Nature Chemical Biology* [online]. 2008, **4**(2), 132–142. ISSN 15524469. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.2007.59
- 108 IRISH, J.M., N. KOTECHA a G.P. NOLAN. Mapping normal and cancer cell signalling networks: Towards single-cell proteomics [online]. B.m.: Nat Rev Cancer. únor 2006. ISSN 1474175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1804
- 109 KRÓL, L., J. STUHLÝ, P. HUBÁČEK, P. KESLOVÁ, P. SEDLÁČEK, J. STARÝ, O. HRUŠÁK a T. KALINA. Signature profiles of CMV-specific T-cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone marrow transplantation* [online]. 2011, **46**(8), 1089–98 [vid. 2013-12-14]. ISSN 1476-5365. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2010.261
- 110 YATES, J.R., C.I. RUSE a A. NAKORCHEVSKY. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2009, **11**(1), 49–79. ISSN 1523-9829. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-bioeng-061008-124934
- 111 BANDURA, D.R., V.I. BARANOV, O.I. ORNATSKY, A. ANTONOV, R. KINACH, X. LOU, S. PAVLOV, S. VOROBIEV, J.E. DICK a S.D. TANNER. Mass Cytometry: Technique for Real Time Single Cell Multitarget Immunoassay Based on Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry [online]. nedatováno [vid. 2020-03-20]. Dostupné z: doi:10.1021/ac901049w
- 112 BENDALL, S.C., E.F. SIMONDS, P. QIU, E.D. AMIR, P.O. KRUTZIK, R. FINCK, R. V BRUGGNER, R. MELAMED, A. TREJO, O.I. ORNATSKY, R.S. BALDERAS, S.K. PLEVITIS, K. SACHS, D. PE'ER, S.D. TANNER a G.P. NOLAN. Single-Cell Mass Cytometry of Differential Immune and Drug Responses Across a Human Hematopoietic Continuum. *Science* [online]. 2011, **332**(May), 687–697. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1198704
- 113 QIU, P., E.F. SIMONDS, S.C. BENDALL, K.D. GIBBS, R. V BRUGGNER, M.D. LINDERMAN, K. SACHS, G.P. NOLAN a S.K. PLEVITIS. Extracting a Cellular Hierarchy from High-dimensional Cytometry Data with SPADE [online]. nedatováno [vid. 2020-03-20]. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.1991
- 114 NEWELL, E.W., N. SIGAL, S.C. BENDALL, G.P. NOLAN a M.M. DAVIS. Cytometry by Time-of-Flight Shows Combinatorial Cytokine Expression and Virus-Specific Cell Niches within a Continuum of CD8+ T Cell Phenotypes. *Immunity* [online]. 2012, **36**(1), 142–152 [vid. 2018-04-16]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2012.01.002
- 115 BEHBEHANI, G.K., S.C. BENDALL, M.R. CLUTTER, W.J. FANTL a G.P. NOLAN. Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle. *Cytometry Part A* [online]. 2012, **81A**(7), 552–566 [vid. 2020-03-20]. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22075
- 116 FIENBERG, H.G., E.F. SIMONDS, W.J. FANTL, G.P. NOLAN a B. BODENMILLER. A platinum-based covalent viability reagent for single-cell mass cytometry. *Cytometry Part A* [online]. 2012, **81 A**(6), 467–475. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22067
- 117 BENDALL, S.C., G.P. NOLAN, M. ROEDERER a P.K. CHATTOPADHYAY. A deep profiler's guide to cytometry [online]. B.m.: NIH Public Access. červenec 2012. ISSN 14714906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2012.02.010
- 118 PELÁK, O., D. KUŽÍLKOVÁ, D. THÜRNER, M.-L. KIENE, K. STANAR, J. STUHLÝ, M. VÁŠKOVÁ, J. STARÝ, O. HRUŠÁK, H. STADLER a T. KALINA. Lymphocyte enrichment using

- CD81-targeted immunoaffinity matrix. *Cytometry Part A* [online]. 2017, **91**(1), 62–72 [vid. 2020-03-26]. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22918
- 119 MERAD, M., P. SATHE, J. HELFT, J. MILLER a A. MORTHA. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology* [online]. 2013, **31**(1), 563–604. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- 120 BECHER, B., A. SCHLITZER, J. CHEN, F. MAIR, H.R. SUMATOH, K.W.W. TENG, D. LOW, C. RUEDL, P. RICCARDI-CASTAGNOLI, M. POIDINGER, M. GRETER, F. GINHOUX a E.W. NEWELL. High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nature Immunology* [online]. 2014, **15**(12), 1181–1189. ISSN 15292916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.3006
- 121 GUILLIAMS, M., F. GINHOUX, C. JAKUBZICK, S.H. NAIK, N. ONAI, B.U. SCHRAML, E. SEGURA, R. TUSSIWAND a S. YONA. Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 2014. ISSN 14741741. Dostupné z: doi:10.1038/nri3712
- 122 JAITIN, D.A., H. KEREN-SHAUL, N. ELEFANT a I. AMIT. Each cell counts: Hematopoiesis and immunity research in the era of single cell genomics [online]. B.m.: Academic Press. 1. únor 2015. ISSN 10963618. Dostupné z: doi:10.1016/j.smim.2015.01.002
- 123 ZHENG, G.X.Y., J.M. TERRY, P. BELGRADER, P. RYVKIN, Z.W. BENT, R. WILSON, S.B. ZIRALDO, T.D. WHEELER, G.P. MCDERMOTT, J. ZHU, M.T. GREGORY, J. SHUGA, L. MONTESCLAROS, J.G. UNDERWOOD, D.A. MASQUELIER, S.Y. NISHIMURA, M. SCHNALL-LEVIN, P.W. WYATT, C.M. HINDSON, R. BHARADWAJ, A. WONG, K.D. NESS, L.W. BEPPU, H.J. DEEG, C. MCFARLAND, K.R. LOEB, W.J. VALENTE, N.G. ERICSON, E.A. STEVENS, J.P. RADICH, T.S. MIKKELSEN, B.J. HINDSON a J.H. BIELAS. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**. ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms14049
- 124 VILLANI, A.C., R. SATIJA, G. REYNOLDS, S. SARKIZOVA, K. SHEKHAR, J. FLETCHER, M. GRIESBECK, A. BUTLER, S. ZHENG, S. LAZO, L. JARDINE, D. DIXON, E. STEPHENSON, E. NILSSON, I. GRUNDBERG, D. MCDONALD, A. FILBY, W. LI, P.L. DE JAGER, O. ROZENBLATT-ROSEN, A.A. LANE, M. HANIFFA, A. REGEV a N. HACOHEM. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* [online]. 2017, **356**(6335). ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aah4573
- 125 BJÖRKLUND, A.K., M. FORKEL, S. PICELLI, V. KONYA, J. THEORELL, D. FRIBERG, R. SANDBERG a J. MJÖSBERG. The heterogeneity of human CD127⁺ innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature Immunology* [online]. 2016, **17**(4), 451–460. ISSN 15292916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.3368
- 126 SEE, P., C.A. DUTERTRE, J. CHEN, P. GÜNTHER, N. MCGOVERN, S.E. IRAC, M. GUNAWAN, M. BEYER, K. HÄNDLER, K. DUAN, H.R. BIN SUMATOH, N. RUFFIN, M. JOUVE, E. GEAMALLORQUÍ, R.C.M. HENNEKAM, T. LIM, C.C. YIP, M. WEN, B. MALLERET, I. LOW, N.B. SHADAN, C.F.S. FEN, A. TAY, J. LUM, F. ZOLEZZI, A. LARBI, M. POIDINGER, J.K.Y. CHAN, Q. CHEN, L. RÉNIA, M. HANIFFA, P. BENAROCH, A. SCHLITZER, J.L. SCHULTZE, E.W. NEWELL a F. GINHOUX. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* [online]. 2017, **356**(6342). ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aag3009
- 127 PAUL, F., Y. ARKIN, A. GILADI, D.A. JAITIN, E. KENIGSBURG, H. KEREN-SHAUL, D. WINTER, D. LARA-ASTIASO, M. GURY, A. WEINER, E. DAVID, N. COHEN, F.K.B. LAURIDSEN, S. HAAS, A. SCHLITZER, A. MILDNER, F. GINHOUX, S. JUNG, A. TRUMPP, B.T. PORSE, A. TANAY a I. AMIT. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell* [online]. 2015, **163**(7), 1663–1677. ISSN 10974172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2015.11.013
- 128 SCHLITZER, A., V. SIVAKAMASUNDARI, J. CHEN, H.R. Bin SUMATOH, J. SCHREUDER, J. LUM, B. MALLERET, S. ZHANG, A. LARBI, F. ZOLEZZI, L. RENIA, M. POIDINGER, S. NAIK, E.W. NEWELL, P. ROBSON a F. GINHOUX. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nature Immunology* [online]. 2015, **16**(7), 718–728. ISSN 15292916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.3200

- 129 MASS, E., I. BALLESTEROS, M. FARLIK, F. HALBRITTER, P. GÜNTHER, L. CROZET, C.E. JACOME-GALARZA, K. HÄNDLER, J. KLUGHAMMER, Y. KOBAYASHI, E. GOMEZ-PERDIGUERO, J.L. SCHULTZE, M. BEYER, C. BOCK a F. GEISSMANN. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* [online]. 2016, **353**(6304). ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aaf4238
- 130 DIXIT, A., O. PARNAS, B. LI, J. CHEN, C.P. FULCO, L. JERBY-ARNON, N.D. MARJANOVIC, D. DIONNE, T. BURKS, R. RAYCHOWDHURY, B. ADAMSON, T.M. NORMAN, E.S. LANDER, J.S. WEISSMAN, N. FRIEDMAN a A. REGEV. Perturb-Seq: Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens. *Cell* [online]. 2016, **167**(7), 1853-1866.e17. ISSN 10974172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.11.038
- 131 JAITIN, D.A., A. WEINER, I. YOFE, D. LARA-ASTIASO, H. KEREN-SHAUL, E. DAVID, T.M. SALAME, A. TANAY, A. VAN OUDENAARDEN a I. AMIT. Dissecting Immune Circuits by Linking CRISPR-Pooled Screens with Single-Cell RNA-Seq. *Cell* [online]. 2016, **167**(7), 1883-1896.e15. ISSN 10974172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.11.039
- 132 SHALEK, A.K., R. SATIJA, X. ADICONIS, R.S. GERTNER, J.T. GAUBLomme, R. RAYCHOWDHURY, S. SCHWARTZ, N. YOSEF, C. MALBOEUF, D. LU, J.J. TROMBETTA, D. GENNERT, A. GNIRKE, A. GOREN, N. HACOHEM, J.Z. LEVIN, H. PARK a A. REGEV. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* [online]. 2013, **498**(7453), 236–240 [vid. 2018-04-16]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12172
- 133 BOYD, S.D. Diagnostic Applications of High-Throughput DNA Sequencing. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. 2013, **8**(1), 381–410. ISSN 1553-4006. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164026
- 134 LOGAN, A.C., H. GAO, C. WANG, B. SAHAF, C.D. JONES, E.L. MARSHALL, I. BUÑO, R. ARMSTRONG, A.Z. FIRE, K.I. WEINBERG, M. MINDRINOS, J.L. ZEHNDER, S.D. BOYD, W. XIAO, R.W. DAVIS a D.B. MIKLOS. High-throughput VDJ sequencing for quantification of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia and immune reconstitution assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2011, **108**(52), 21194–21199. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1118357109
- 135 ADEMOKUN, A., Y.-C. WU, V. MARTIN, R. MITRA, U. SACK, H. BAXENDALE, D. KIPLING a D.K. DUNN-WALTERS. Vaccination-induced changes in human B-cell repertoire and pneumococcal IgM and IgA antibody at different ages. *Aging Cell* [online]. 2011, **10**(6), 922–930 [vid. 2020-04-21]. ISSN 14749718. Dostupné z: doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00732.x
- 136 KANDA, J., L.W. CHIOU, P. SZABOLCS, G.D. SEMPOWSKI, D.A. RIZZIERI, G.D. LONG, K.M. SULLIVAN, C. GASPARETTO, J.P. CHUTE, A. MORRIS, J. MCPHERSON, J. HALE, J.A. LIVINGSTON, G. BROADWATER, D. NIEDZWIECKI, N.J. CHAO a M.E. HORWITZ. Immune Recovery in Adult Patients after Myeloablative Dual Umbilical Cord Blood, Matched Sibling, and Matched Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2012, **18**(11), 1664-1676.e1. ISSN 15236536. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2012.06.005
- 137 VAN HEIJST, J.W.J., I. CEBERIO, L.B. LIPUMA, D.W. SAMILO, G.D. WASILEWSKI, A.M.R. GONZALES, J.L. NIEVES, M.R.M. VAN DEN BRINK, M.A. PERALES a E.G. PAMER. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nature Medicine* [online]. 2013, **19**(3), 372–377. ISSN 10788956. Dostupné z: doi:10.1038/nm.3100
- 138 BOYD, S.D., Y. LIU, C. WANG, V. MARTIN a D.K. DUNN-WALTERS. Human lymphocyte repertoires in ageing [online]. *B.m.: Elsevier Current Trends*. 1. srpen 2013. ISSN 09527915. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2013.07.007
- 139 VENTURI, V., H.Y. CHIN, T.E. ASHER, K. LADELL, P. SCHEINBERG, E. BORNSTEIN, D. VAN BOCKEL, A.D. KELLEHER, D.C. DOUEK, D.A. PRICE a M.P. DAVENPORT. TCR β -Chain Sharing in Human CD8 + T Cell Responses to Cytomegalovirus and EBV . *The Journal of Immunology* [online]. 2008, **181**(11), 7853–7862. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.181.11.7853
- 140 ROBINS, H.S., S.K. SRIVASTAVA, P. V. CAMPREGHER, C.J. TURTLE, J. ANDRIESEN, S.R.

- RIDDELL, C.S. CARLSON a E.H. WARREN. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Science Translational Medicine* [online]. 2010, **2**(47), 47ra64–47ra64. ISSN 19466234. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.3001442
- 141 BELKINA, A.C., C.O. CICCOLELLA, R. ANNO, R. HALPERT, J. SPIDLEN a J.E. SNYDER-CAPPIONE. Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. *Nature Communications* [online]. 2019, **10**(1), 1–12. ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-13055-y
- 142 MAECKER, H.T., J.P. MCCOY a R. NUSSENBLATT. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project [online]. *B.m.: Nat Rev Immunol.* březen 2012. ISSN 14741733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3158
- 143 QUINN, J., P.W. FISHER, R.J. CAPOCASALE, R. ACHUTHANANDAM, M. KAM, P.J. BUGELSKI a L. HREBIEN. A statistical pattern recognition approach for determining cellular viability and lineage phenotype in cultured cells and murine bone marrow. *Cytometry Part A* [online]. 2007, **71**(8), 612–624. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20416
- 144 LO, K., R.R. BRINKMAN a R. GOTTARDO. Automated gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. In: *Cytometry Part A* [online]. *B.m.: Cytometry A*, 2008, s. 321–332. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20531
- 145 FINAK, G., A. BASHASHATI, R. BRINKMAN a R. GOTTARDO. Merging Mixture Components for Cell Population Identification in Flow Cytometry. *Advances in Bioinformatics* [online]. 2009, **2009**, 1–12 [vid. 2020-03-27]. ISSN 1687-8027. Dostupné z: doi:10.1155/2009/247646
- 146 QIAN, Y., C. WEI, F.E.H. LEE, J. CAMPBELL, J. HALLILEY, J.A. LEE, J. CAI, Y.M. KONG, E. SADAT, E. THOMSON, P. DUNN, A.C. SEEGMILLER, N.J. KARANDIKAR, C.M. TIPTON, T. MOSMANN, I. SANZ a R.H. SCHEUERMANN. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry* [online]. 2010, **78**(SUPPL. 1). ISSN 15524949. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.20554
- 147 HU, Z., B.S. GLICKSBERG a A.J. BUTTE. Robust prediction of clinical outcomes using cytometry data. *Bioinformatics* [online]. 2019, **35**(7), 1197–1203 [vid. 2020-03-27]. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bty768
- 148 AGHAEPOUR, N., A. JALALI, K. O'NEILL, P.K. CHATTOPADHYAY, M. ROEDERER, H.H. HOOS a R.R. BRINKMAN. RchyOptimyx: Cellular hierarchy optimization for flow cytometry. *Cytometry Part A* [online]. 2012, **81A**(12), 1022–1030 [vid. 2020-03-27]. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22209
- 149 FINAK, G., J. FRELINGER, W. JIANG, E.W. NEWELL, J. RAMEY, M.M. DAVIS, S.A. KALAMS, S.C. DE ROSA a R. GOTTARDO. OpenCyto: An Open Source Infrastructure for Scalable, Robust, Reproducible, and Automated, End-to-End Flow Cytometry Data Analysis. *PLoS Computational Biology* [online]. 2014, **10**(8). ISSN 15537358. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.1003806
- 150 JOHNSSON, K., J. WALLIN a M. FONTES. BayesFlow: Latent modeling of flow cytometry cell populations. *BMC Bioinformatics* [online]. 2016, **17**(1). ISSN 14712105. Dostupné z: doi:10.1186/s12859-015-0862-z
- 151 LEE, S.X., G.J. MCLACHLAN a S. PYNE. Modeling of inter-sample variation in flow cytometric data with the joint clustering and matching procedure. *Cytometry Part A* [online]. 2016, **89**(1), 30–43. ISSN 15524930. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22789
- 152 LEE, H.-C., R. KOSOY, C.E. BECKER, J.T. DUDLEY a B.A. KIDD. Automated cell type discovery and classification through knowledge transfer. *Bioinformatics* [online]. 2017, **33**(11), 1689–1695 [vid. 2020-03-27]. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btx054
- 153 ARVANITI, E. a M. CLAASSEN. Sensitive detection of rare disease-associated cell subsets via representation learning. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**(1), 14825 [vid. 2020-03-27]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms14825

- 154 LI, H., U. SHAHAM, K.P. STANTON, Y. YAO, R.R. MONTGOMERY a Y. KLUGER. Gating mass cytometry data by deep learning. *Bioinformatics* [online]. 2017, **33**(21), 3423–3430 [vid. 2020-03-27]. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btx448
- 155 KO, B.-S., Y.-F. WANG, J.-L. LI, C.-C. LI, P.-F. WENG, S.-C. HSU, H.-A. HOU, H.-H. HUANG, M. YAO, C.-T. LIN, J.-H. LIU, C.-H. TSAI, T.-C. HUANG, S.-J. WU, S.-Y. HUANG, W.-C. CHOU, H.-F. TIEN, C.-C. LEE a J.-L. TANG. Clinically validated machine learning algorithm for detecting residual diseases with multicolor flow cytometry analysis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *EBioMedicine* [online]. 2018, **37**, 91–100 [vid. 2020-03-27]. ISSN 23523964. Dostupné z: doi:10.1016/j.ebiom.2018.10.042
- 156 MICHAUD, M., I. MARTINS, A.Q. SUKKURWALA, S. ADJEMIAN, Y. MA, P. PELLEGGATTI, S. SHEN, O. KEPP, M. SCOAZEC, G. MIGNOT, S. RELLO-VARONA, M. TAILLER, L. MENGER, E. VACCHELLI, L. GALLUZZI, F. GHIRINGHELLI, F. DI VIRGILIO, L. ZITVOGEL a G. KROEMER. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science* [online]. 2011, **334**(6062), 1573–1577 [vid. 2018-08-15]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1208347
- 157 CHUANG, H.-Y., M. HOFREE a T. IDEKER. A Decade of Systems Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 2010, **26**(1), 721–744. ISSN 1081-0706. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104122
- 158 ALIZADEH, A.A., M.B. EISEN, R.E. DAVIS, C. MA, I.S. LOSSOS, A. ROSENWALD, J.C. BOLDRICK, H. SABET, T. TRAN, X. YU, J.I. POWELL, L. YANG, G.E. MARTI, T. MOORE, J. HUDSON, L. LU, D.B. LEWIS, R. TIBSHIRANI, G. SHERLOCK, W.C. CHAN, T.C. GREINER, D.D. WEISENBURGER, J.O. ARMITAGE, R. WARNKE, R. LEVY, W. WILSON, M.R. GREVER, J.C. BYRD, D. BOTSTEIN, P.O. BROWN a L.M. STAUDT. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* [online]. 2000, **403**(6769), 503–511 [vid. 2018-08-15]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35000501
- 159 BULLINGER, L., K. DÖHNER, E. BAIR, S. FRÖHLING, R.F. SCHLENK, R. TIBSHIRANI, H. DÖHNER a J.R. POLLACK. Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* [online]. 2004, **350**(16), 1605–1616 [vid. 2018-08-15]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa031046
- 160 DRUKER, B.J., S. TAMURA, E. BUCHDUNGER, S. OHNO, G.M. SEGAL, S. FANNING, J. ZIMMERMANN a N.B. LYDON. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine* [online]. 1996, **2**(5), 561–6 [vid. 2018-08-15]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616716>
- 161 O'DAY, S.J., O. HAMID a W.J. URBA. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4). *Cancer* [online]. 2007, **110**(12), 2614–2627 [vid. 2018-08-15]. ISSN 0008543X. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.23086
- 162 WATERHOUSE, P., J.M. PENNINGER, E. TIMMS, A. WAKEHAM, A. SHAHINIAN, K.P. LEE, C.B. THOMPSON, H. GRIESSER a T.W. MAK. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1995, **270**(5238), 985–8 [vid. 2018-08-15]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7481803>
- 163 YANG, X.-P., K. GHORESCHI, S.M. STEWARD-THARP, J. RODRIGUEZ-CANALES, J. ZHU, J.R. GRAINGER, K. HIRAHARA, H.-W. SUN, L. WEI, G. VAHEDI, Y. KANNO, J.J. O'SHEA a A. LAURENCE. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature Immunology* [online]. 2011, **12**(3), 247–254 [vid. 2018-08-26]. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1995
- 164 KUCHAR, M., L. VAŇKOVÁ, H. PETROKOVÁ, J. CERNÝ, R. OSIČKA, O. PELÁK, H. SÍPOVÁ, B. SCHNEIDER, J. HOMOLA, P. SEBO, T. KALINA a P. MALÝ. Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent *ex vivo* expansion of IL-17-producing T-cells. *Proteins* [online]. 2014, **82**(6), 975–89 [vid. 2014-09-25]. ISSN 1097-0134. Dostupné z: doi:10.1002/prot.24472
- 165 KRÍŽOVÁ, L., M. KUCHAR, H. PETROKOVÁ, R. OSIČKA, M. HLAVNIČKOVÁ, O. PELÁK, J.

- ČERNÝ, T. KALINA a P. MALÝ. p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells. *Autoimmunity* [online]. 2017, **50**(2), 102–113. ISSN 0891-6934. Dostupné z: doi:10.1080/08916934.2016.1272598
- 166 MOLD, J.E., S. VENKATASUBRAHMANYAM, T.D. BURT, J. MICHAËLSSON, J.M. RIVERA, S.A. GALKINA, K. WEINBERG, C.A. STODDART a J.M. MCCUNE. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2010, **330**(6011), 1695–9 [vid. 2018-08-26]. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1196509
- 167 GALLI, S.J., N. BORREGAARD a T.A. WYNN. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology* [online]. 2011, **12**(11), 1035–44 [vid. 2018-08-27]. ISSN 1529-2916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.2109
- 168 AKBAR, A.N. a S.M. HENSON. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nature Reviews Immunology* [online]. 2011, **11**(4), 289–295 [vid. 2018-08-28]. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2959
- 169 BUTTERFIELD, L.H., M.L. DISIS, S.N. KHLEIF, J.M. BALWIT a F.M. MARINCOLA. Immunoncology biomarkers 2010 and beyond: perspectives from the iSBTc/SITC biomarker task force. *Journal of translational medicine* [online]. 2010, **8**, 130 [vid. 2018-08-28]. ISSN 1479-5876. Dostupné z: doi:10.1186/1479-5876-8-130
- 170 CHEN, L. a X. HAN. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2015, **125**(9), 3384–3391 [vid. 2018-08-28]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI80011
- 171 HODI, F.S., S.J. O'DAY, D.F. MCDERMOTT, R.W. WEBER, J.A. SOSMAN, J.B. HAANEN, R. GONZALEZ, C. ROBERT, D. SCHADENDORF, J.C. HASSEL, W. AKERLEY, A.J.M. VAN DEN EERTWEGH, J. LUTZKY, P. LORIGAN, J.M. VAUBEL, G.P. LINETTE, D. HOGG, C.H. OTTENSMEIER, C. LEBBÉ, C. PESCHEL, I. QUIRT, J.I. CLARK, J.D. WOLCHOK, J.S. WEBER, J. TIAN, M.J. YELLIN, G.M. NICHOL, A. HOOS a W.J. URBA. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* [online]. 2010, **363**(8), 711–723 [vid. 2018-08-28]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1003466
- 172 LEEN, A.M., C.M. BOLLARD, G.D. MYERS a C.M. ROONEY. Adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation [online]. březen 2006. ISSN 10838791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2005.10.024
- 173 HESLOP, H.E. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood* [online]. 2009, **114**(19), 4002–4008. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-07-143545
- 174 SERVAIS, S., N. DUMONTIER, L. BIARD, N. SCHNEPF, M. RESCHE-RIGON, R. PEFFAULT DE LATOUR, C. SCIEUX, M. ROBIN, M. MEUNIER, A. XHAARD, F. SICRE DE FONTBRUNE, J. LE GOFF, G. SOCIÉ, F. SIMON a M.C. MAZERON. Response to antiviral therapy in haematopoietic stem cell transplant recipients with cytomegalovirus (CMV) reactivation according to the donor CMV serological status. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2016, **22**(3), 289.e1-289.e7. ISSN 14690691. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmi.2015.11.006
- 175 BOLLARD, C.M., I. KUEHNLE, A. LEEN, C.M. ROONEY a H.E. HESLOP. Adoptive immunotherapy for posttransplantation viral infections. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2004, **10**(3), 143–155. ISSN 10838791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2003.09.017
- 176 KUMARESAN, P., M. FIGLIOLA, J.S. MOYES, M.H. HULS, P. TEWARI, E.J. SHPALL, R. CHAMPLIN a L.J.N. COOPER. Automated cell enrichment of cytomegalovirus-specific T cells for clinical applications using the cytokine-capture system. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2015, **2015**(104). ISSN 1940087X. Dostupné z: doi:10.3791/52808
- 177 ANDERSEN, P.K. a R.D. GILL. Cox's regression model for counting processes, a large sample study. *Annals of Statistics*. 1982, **10**(4), 1100–1120.
- 178 GOETSCH, L., J.F. HAEUW, T. CHAMPION, C. LACHENY, T. N'GUYEN, A. BECK a N. CORVAIA.

- Identification of B- and T-cell epitopes of BB, a carrier protein derived from the G protein of Streptococcus strain G148. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* [online]. 2003, **10**(1), 125–132. ISSN 1071412X. Dostupné z: doi:10.1128/CDLI.10.1.125-132.2003
- 179 GIMÉNEZ, E., B. MUÑOZ-COBO, C. SOLANO, P. AMAT, R. DE LA CÁMARA, J. NIETO, J. LÓPEZ, M.J. REMIGIA, a. GARCIA-NOBLEJAS a D. NAVARRO. Functional patterns of cytomegalovirus (CMV) pp65 and immediate early-1-specific CD8⁺ T cells that are associated with protection from and control of CMV DNAemia after allogeneic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease* [online]. 2015, **17**(3), 361–370. ISSN 13982273. Dostupné z: doi:10.1111/tid.12391
- 180 TORMO, N., C. SOLANO, I. BENET, J. NIETO, R. DE LA CÁMARA, A. GARCIA-NOBLEJAS, M.A. CLARI, M. CHILET, J. LÓPEZ, J.C. HERNÁNDEZ-BOLUDA, M.J. REMIGIA a D. NAVARRO. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *Journal of medical virology* [online]. 2010, **82**(7), 1208–15. ISSN 1096-9071. Dostupné z: doi:10.1002/jmv.21799
- 181 RAWSTRON, A.C., S. BÖTTCHER, R. LETESTU, N. VILLAMOR, C. FAZI, H. KARTSIOS, R.M. DE TUTE, J. SHINGLES, M. RITGEN, C. MORENO, K. LIN, A.R. PETTITT, M. KNEBA, E. MONTSERRAT, F. CYMBALISTA, M. HALLEK, P. HILLMEN a P. GHIA. Improving efficiency and sensitivity: European research initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia* [online]. 2013, **27**(1), 142–149. ISSN 08876924. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2012.216
- 182 KAECH, S.M. a W. CUI. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2012, **12**(11), 749–761. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3307
- 183 KAHAN, S.M., E.J. WHERRY a A.J. ZAJAC. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* [online]. 2015, 1–14. ISSN 0042-6822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2014.12.033
- 184 CASAZZA, J.P., M.R. BETTS, D. a PRICE, M.L. PRECOPIO, L.E. RUFF, J.M. BRENCHLEY, B.J. HILL, M. ROEDERER, D.C. DOUEK a R. a KOUP. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4⁺ T lymphocytes with cellular maturation. *The Journal of experimental medicine* [online]. 2006, **203**(13), 2865–77. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20052246
- 185 HAKKI, M., S.R. RIDDELL, J. STOREK, R. a CARTER, T. STEVENS-AYERS, K. WHITE, L. COREY, M. BOECKH, W. DC a P. SUDOUR. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation : impact of host factors , drug therapy , and subclinical reactivation Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell tran [online]. 2003, **102**(8), 3060–3067. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2002-11-3472
- 186 KAEUFERLE, T., R. KRAUSS, F. BLAESCHKE, S. WILLIER a T. FEUCHTINGER. Strategies of adoptive T -cell transfer to treat refractory viral infections post allogeneic stem cell transplantation [online]. B.m.: BioMed Central Ltd. 6. únor 2019 [vid. 2020-03-31]. ISSN 17568722. Dostupné z: doi:10.1186/s13045-019-0701-1
- 187 LEEN, A.M., C.M. BOLLARD, A.M. MENDIZABAL, E.J. SHPALL, P. SZABOLCS, J.H. ANTIN, N. KAPOOR, S.Y. PAI, S.D. ROWLEY, P. KEBRIAIEI, B.R. DEY, B.J. GRILLEY, A.P. GEE, M.K. BRENNER, C.M. ROONEY a H.E. HESLOP. Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* [online]. 2013, **121**(26), 5113–5123. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-02-486324
- 188 MCNALLY, J.M., C.C. ZAROZINSKI, M.-Y. LIN, M.A. BREHM, H.D. CHEN a R.M. WELSH. Attrition of Bystander CD8 T Cells during Virus-Induced T-Cell and Interferon Responses. *Journal of Virology* [online]. 2001, **75**(13), 5965–5976. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.75.13.5965-5976.2001
- 189 PEDERSEN, C.B. a L.R. OLSEN. Algorithmic Clustering Of Single-Cell Cytometry Data—How Unsupervised Are These Analyses Really? *Cytometry Part A* [online]. 2020, **97**(3), 219–221 [vid. 2020-04-21]. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.23917

- 190 D'ORSOGNA, L., H. VAN DEN HEUVEL, C. VAN KOOTEN, S. HEIDT a F.H.J. CLAAS. Infectious pathogens may trigger specific allo-HLA reactivity via multiple mechanisms [online]. B.m.: Springer Verlag. 1. srpen 2017. ISSN 14321211. Dostupné z: doi:10.1007/s00251-017-0989-3
- 191 ZENG, G., Y. HUANG, Y. HUANG, Z. LYU, D. LESNIAK a P. RANDHAWA. Antigen-Specificity of T Cell Infiltrates in Biopsies With T Cell-Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing. *American Journal of Transplantation* [online]. 2016, **16**(11), 3131–3138. ISSN 16006143. Dostupné z: doi:10.1111/ajt.13911
- 192 AMIR, A.L., L.J. a D. ORSOGNA, D.L. ROELEN, M.M. Van LOENEN, S. RENATE, R. De BOER, M. a W.G. Van Der HOORN, M.G.D. KESTER, I.I.N. DOXIADIS, J.H.F. FALKENBURG, F.H.J. CLAAS, M.H.M. HEEMSKERK, W. DC a R.S. HAGEDOORN. Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Library* [online]. 2011, **115**(15), 3146–3157. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-07-234906
- 193 D'ORSOGNA, L.J.A., D.L. ROELEN, E.M.W. VAN DER MEER-PRINS, P. VAN DER POL, M.E. FRANKE-VAN DIJK, M. EIKMANS, J. ANHOLTS, J. ROSSJOHN, J. MCCLUSKEY, A. MULDER, C. VAN KOOTEN, I.I.N. DOXIADIS a F.H.J. CLAAS. Tissue specificity of cross-reactive allogeneic responses by EBV EBNA3A-specific memory T cells. *Transplantation* [online]. 2011, **91**(5), 494–500. ISSN 00411337. Dostupné z: doi:10.1097/TP.0b013e318207944c
- 194 AHMAD, J.N., J. LI, L. BIEDERMANNOVÁ, M. KUCHAR, H. ŠÍPOVÁ, A. SEMERÁDTOVÁ, J. ČERNÝ, H. PETROKOVÁ, P. MIKULECKÝ, J. POLÍNEK, O. STANĚK, J. VONDRÁŠEK, J. HOMOLA, J. MALÝ, R. OSIČKA, P. ŠEBO a P. MALÝ. Novel high-affinity binders of human interferon gamma derived from albumin-binding domain of protein G. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* [online]. 2012, **80**(3), 774–789. ISSN 08873585. Dostupné z: doi:10.1002/prot.23234

9. SEZNAM PŘÍLOH

- 9.1. PELÁK, O., J. STUHLÝ, L. KRÓL, P. HUBÁČEK, P. KESLOVÁ, P. SEDLÁČEK, R. FORMÁNKOVÁ, J. STARÝ, O. HRUŠÁK a T. KALINA. Appearance of cytomegalovirus-specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* [online]. 2017, **92**(5), 380–388. ISSN 1552-4957.
- 9.2. STRANAVOVA, L.*, O. PELÁK*, M. SVATON, P. HRUBA, E. FRONKOVA, A. SLAVCEV, K. OSICKOVA, J. MALUSKOVA, P. HUBACEK, J. FRONEK, P. REINKE, H.D. VOLK, T. KALINA a O. VIKLICKÝ. Heterologous cytomegalovirus and allo-reactivity by shared t cell receptor repertoire in kidney transplantation. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10**(OCT), 1–11. ISSN 16643224. (*sdílené autorství)
- 9.3. PELÁK, O., D. KUŽÍLKOVÁ, D. THÜRNER, M.-L. KIENE, K. STANAR, J. STUHLÝ, M. VÁŠKOVÁ, J. STARÝ, O. HRUŠÁK, H. STADLER a T. KALINA. Lymphocyte enrichment using CD81-targeted immunoaffinity matrix. *Cytometry Part A* [online]. 2017, **91**(1), 62–72 [vid. 2020-03-26]. ISSN 15524922.
- 9.4. KUCHAR, M., L. VAŇKOVÁ, H. PETROKOVÁ, J. CERNÝ, R. OSIČKA, O. PELÁK, H. SÍPOVÁ, B. SCHNEIDER, J. HOMOLA, P. SEBO, T. KALINA a P. MALÝ. Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent *ex vivo* expansion of IL-17-producing T-cells. *Proteins* [online]. 2014, **82**(6), 975–89 [vid. 2014-09-25]. ISSN 1097-0134.
- 9.5. KŘÍŽOVÁ, L., M. KUCHAR, H. PETROKOVÁ, R. OSIČKA, M. HLAVNIČKOVÁ, O. PELÁK, J. ČERNÝ, T. KALINA a P. MALÝ. p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells. *Autoimmunity* [online]. 2017, **50**(2), 102–113. ISSN 0891-6934.