

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Dominik Vitek**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Molekulárně genetické metody pro HLA  
typizaci na úrovni vysokého rozlišení**

**Bakalářská práce**

**Dominik Vitek**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**doc. MUDr. František Mrázek, Ph. D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil pouze uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

Olomouc 12. květen 2017

---

podpis

## **Souhrn**

Cílem této bakalářské práce je v teoretické části zpracovat literární přehled o HLA systému se zaměřením na molekulární podstatu jeho polymorfismu, názvosloví a medicínské aplikace. Práce se zaměří také na speciální molekulárně-genetické přístupy, které se aktuálně využívají k HLA typizaci na úrovni vysokého rozlišení (sekvenování dle Sangerova a pokročilé technologie "next generation sequencing", PCR v různých modifikacích).

V praktické části budou prezentovány a srovnávány aktuální strategie molekulárně-genetických postupů využívaných k HLA typizaci v HLA laboratoři Ústavu imunologie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UP Olomouc. Součástí praktické části bude rovněž charakterizace vybraných unikátních výsledků vyšetření HLA genů u pacientů indikovaných k transplantaci krvetvorných kmenových buněk.

## **Summary**

The goal of this bachelor's thesis is to compile literary information into a review about the HLA system with the main focus being on molecular basis of its polymorphism, nomenclature and medical application. The thesis will also focus on special molecular-genetic approaches which are currently used for high resolution HLA typing (Sanger sequencing and advanced technologies of „next generation sequencing“, various PCR modifications).

Furthermore the current molecular-genetic approaches used for HLA typing in the HLA laboratory of the Department of Immunology University Hospital and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc will be presented and compared. Additionally last part of thesis will be dedicated to characteristics of unique typing results of HLA genes in patients indicated for hematopoietic stem cell transplantation.

## Poděkování

Děkuji doc. MUDr. Františku Mrázkovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce. Dále děkuji Ing. Bc. Nikole Königové a Dr. Ing. Evě Kriegové za praktické seznámení s metodikou a pracovištěm zabývající se problematikou HLA-typizace. Rovněž děkuji všem členům mé rodiny, zvláště pak rodičům, a přátelům, kteří mi vždy byli morální i duševní oporou.

1	ÚVOD .....	9
2	HLAVNÍ HISTOKOMPATIBILNÍ KOMPLEX.....	10
2.1	Fyziologie .....	10
2.2	Genetika .....	18
2.3	Polymorfismus HLA systému.....	21
2.4	Využití v medicíně .....	24
2.5	Nomenklatura HLA systému.....	27
3	METODY VYŠETŘOVÁNÍ HLA SYSTÉMU .....	30
3.1	Sérologické metody .....	30
3.2	Molekulárně genetické metody .....	31
3.2.1	PCR metody .....	32
3.2.1.1	PCR-SSP .....	34
3.2.1.2	PCR-SSOP .....	36
3.2.1.3	Real-time PCR.....	38
3.2.2	SBT .....	38
3.2.2.1	Konvenční sekvenování.....	39
3.2.2.2	Next generation sequencing.....	41
4	CÍL PRÁCE .....	43
5	MATERIÁL A PŘÍSTROJE .....	44
5.1	Typizace lokusu HLA-A na úrovni nízkého rozlišení metodou PCR-SSP .....	44
5.2	Typizace lokusů HLA-A na úrovni vysokého rozlišení metodou SBT .....	44
6	METODIKA.....	46
6.1	Typizace lokusu HLA-A na úrovni nízkého rozlišení metodou PCR-SSP .....	46
6.2	Typizace lokusů HLA-A na úrovni vysokého rozlišení metodou SBT .....	47
7	VÝSLEDKY .....	51
7.1	PCR-SSP .....	51
7.2	Automatické sekvenování .....	53
8	DISKUZE.....	56
9	KAZUISTIKA .....	58
9.1	Somatická mutace HLA-B genu.....	58
9.2	Detekce vzácné alely bez exprese HLA-B*51:11N .....	59
10	ZÁVĚR.....	60
11	LITERATURA .....	62

# 1 ÚVOD

Člověk je v průběhu svého života každodenně vystavován vlivům vnějšího prostředí. Mimo vlivů fyzikálních musí ovšem také odolávat působení biologických faktorů – parazitů, bakterií, virů a jiných potenciálně škodlivých organismů. Den za dnem je člověk schopen se těmto vlivům ubránit pomocí komplexních systémů molekul, proteinů, chemických a buněčných interakcí, souborně označovaných jako imunitní systém. Esenciální součástí tohoto systému jsou mimo jiné molekuly hlavního histokompatibilního komplexu, které dovolují organismu rozlišovat vlastní a neškodné struktury od cizích, a tak snadněji identifikovat potenciálního původce choroby. Přesný princip jejich funkce byl objeven při experimentech s inbredními populacemi myši (Zinkernagel *et* Doherty, 1975). Bohužel preciznost tohoto systému rozpoznává i rozdíly mezi buňkami vlastními a buňkami příslušníků stejného živočišného druhu, což komplikuje úspěšné provedení transplantací. Kvůli tomu je kladen čím dál větší důraz na metody schopné určit HLA genotyp jedince, a prostřednictvím zajištění shody v HLA znacích mezi dárcem a příjemcem tak zlepšit výsledek transplantací. Původně se v této oblasti upřednostňovaly metody sérologické, ovšem dnes se spíše preferují metody molekulárně-genetické pro vyšší schopnost a přesnost rozlišení HLA znaků. Mezi nimi převládají metody založené na polymerázové řetězové reakci a „konvenčním“ sekvenování, i když v poslední době vzrůstá význam metod sekvenování nové generace. Všechny tyto zmíněné metody jsou charakterizovány řadou výhod a nevýhod, proto se pro HLA typizaci často volí kombinace několika metod.



## 2 HLAVNÍ HISTOKOMPATIBILNÍ KOMPLEX

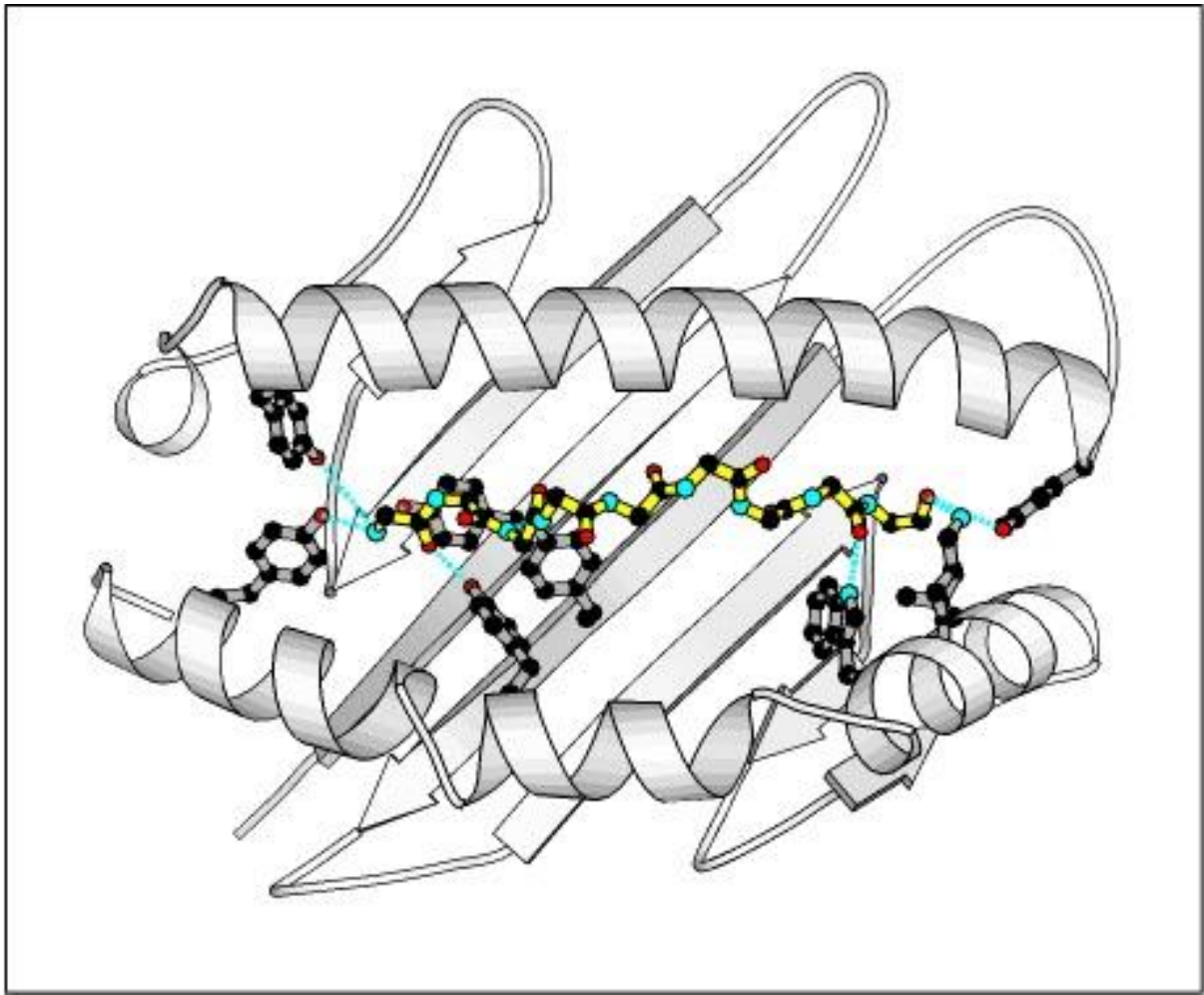
Hlavní histokompatibilní komplex, označovaný zkratkou MHC (Major histocompatibility complex), je soubor glykoproteinů, které se v rámci organismu uplatňují prostřednictvím vazby peptidových fragmentů cizorodého původu a jejich následným vystavením na povrchu buňky, kde jsou rozpoznávány vhodnými T-lymfocyty. V organismu obratlovců hraje MHC klíčovou roli v identifikaci extracelulárních patogenů, intracelulárních patogenů i aberantních buněk a je tak nedílnou součástí sítě imunitního systému (Snell *et al*, 1948). Glykoproteiny patřící do tohoto komplexu se u lidí označují jako HLA molekuly (Human Leukocyte Antigens), u ostatních obratlovců můžeme pozorovat velice podobné molekuly se stejnou funkcí (H-2K, D a L u myší). Vysoká efektivita MHC vychází převážně ze dvou jeho vlastností – a to, že je polygenní a velice polymorfní. Jako polygenní komplex tvoří MHC genovou rodinu, která se dále člení na MHC první třídy a MHC druhé třídy, přitom každá třída obsahuje několik genů a pseudogenů. Navíc je většina z těchto genů extrémně polymorfní, s několika sty až tisíci alelickými variantami. Téměř každý člověk tak tvoří unikátní mozaiku HLA molekul, což výrazně snižuje riziko vzniku patogenu schopného infikovat více jedinců bez spuštění efektivní imunitní reakce.

### 2.1 Fyziologie

V této části práce bude rozvedena struktura molekul HLA, princip jejich fungování, maturace a interakce s ostatními složkami imunitního systému. Jak již bylo zmíněno dříve, molekuly hlavního histokompatibilního komplexu rozlišujeme na dvě třídy – MHC I. třídy a MHC II. třídy. Tyto dvě třídy je nutno rozlišovat, jelikož i přes podobnou strukturu a mechanismus fungování plní v organismu odlišný úkol.

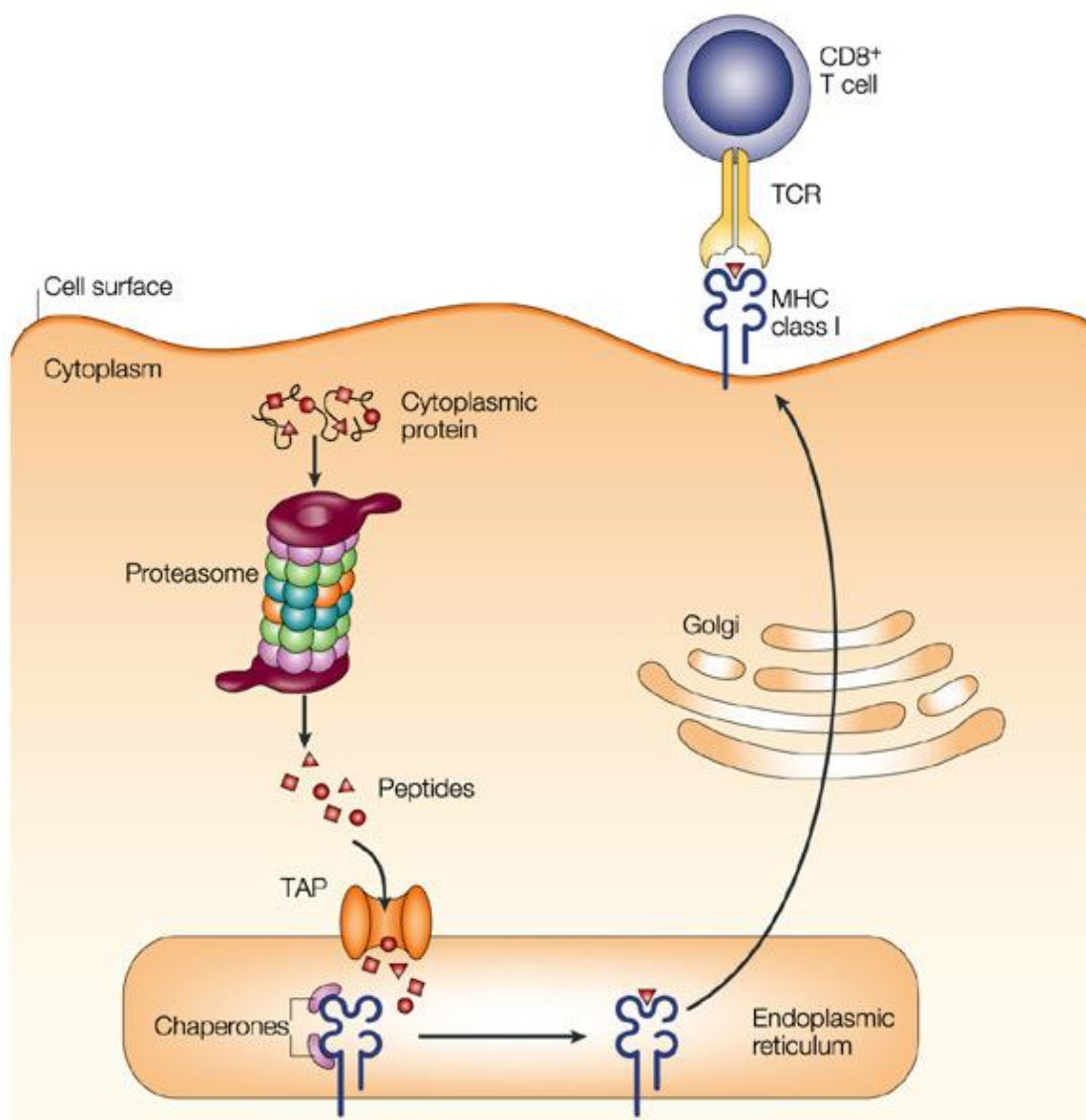
Mezi klasické molekuly MHC I. třídy patří HLA-A, HLA-B a HLA-C, které slouží k vazbě a prezentaci peptidových fragmentů proteinů produkovaných buňkou. Takto navázané fragmenty v komplexu peptid-MHC jsou exprimovány na povrchu plazmatické membrány všech jaderných buněk organismu (Hořejší *et al*, 2013). Pokud je buňka infikovaná patogeny, viry nebo pokud dochází k syntéze aberantních proteinů, dojde i k vystavení fragmentů z těchto potenciálně škodlivých částic na plazmatické membráně. Na takové komplexy MHC I. třídy typicky reagují T-buněčné receptory asociované s CD8 receptory cytotoxických T-lymfocytů. Infikované buňky jsou tímto způsobem selektovány a eliminovány.

Strukturálně jsou MHC I. třídy složeny ze dvou řetězců – většího transmembránového řetězce  $\alpha$  a menšího nekovalentně asociovaného mikroglobulinu  $\beta_2$ . Na řetězci  $\alpha$  můžeme rozlišovat tři domény: dvě N-terminální domény  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ , které svou strukturou vytvářejí vazebné místo pro exprimované peptidové fragmenty, a doménu  $\alpha_3$  tvořící membránovou kotvu (Murphy, 2012). Je dobré zmínit, že doména  $\alpha_3$  a mikroglobulin  $\beta_2$  se svou strukturou velice podobají imunoglobulinům, což poukazuje na společný ancestrální gen. Nejzajímavější část architektury molekul MHC I. třídy je ovšem štěrbina pro antigenní peptid vytvořená složenými doménami  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  (Obr. č. 1). Molekuly MHC I. třídy váží peptidy pomocí volných amino a karboxy skupin při koncích jejich řetězců. Vazebné místo je konformačně uzavřené na obou koncích štěrbinové struktury (Fremont *et al*, 1992), což nedovoluje přesah řetězců a limituje možnou velikost navázaných peptidů na 8 až 10 aminokyselin. Variabilní velikost vázaných peptidových řetězců může být kompenzována mírným vyklenutím peptidického řetězce mimo strukturu štěrbiny.



Obr. č. 1: Vazba peptidu přes vedlejší skupiny aminokyselin do štěrbinu  $\alpha_1/\alpha_2$  domény u MHC I. třídy (převzato z Janeway *et al*, 2001)

Ke konjugaci peptidového řetězce a vazebného místa domén  $\alpha_1/\alpha_2$  dochází již v průběhu biosyntézy a skládání terciární struktury v endoplazmatickém retikulu. Peptidický řetězec je tam dopraven pomocí TAP transportérů (McCluskey *et al*, 2004). Řetězec musí také vyhovovat vazebnému motivu dané varianty MHC I. třídy (determinující bývají postranní skupiny dvou až tří aminokyselin na okrajích vázaného peptidového řetězce). Původem jsou peptidické fragmenty zbytky cytoplazmatických proteinů odbouraných pomocí polyubikvitinace a proteazomu. Následně po složení komplexu  $\alpha/\beta_2m$ -peptid dochází k jeho zpracování v Golgiho aparátu a vystavení na buněčném povrchu (Obr. č. 2). Nekompletní komplexy jsou rychle odbourávány.



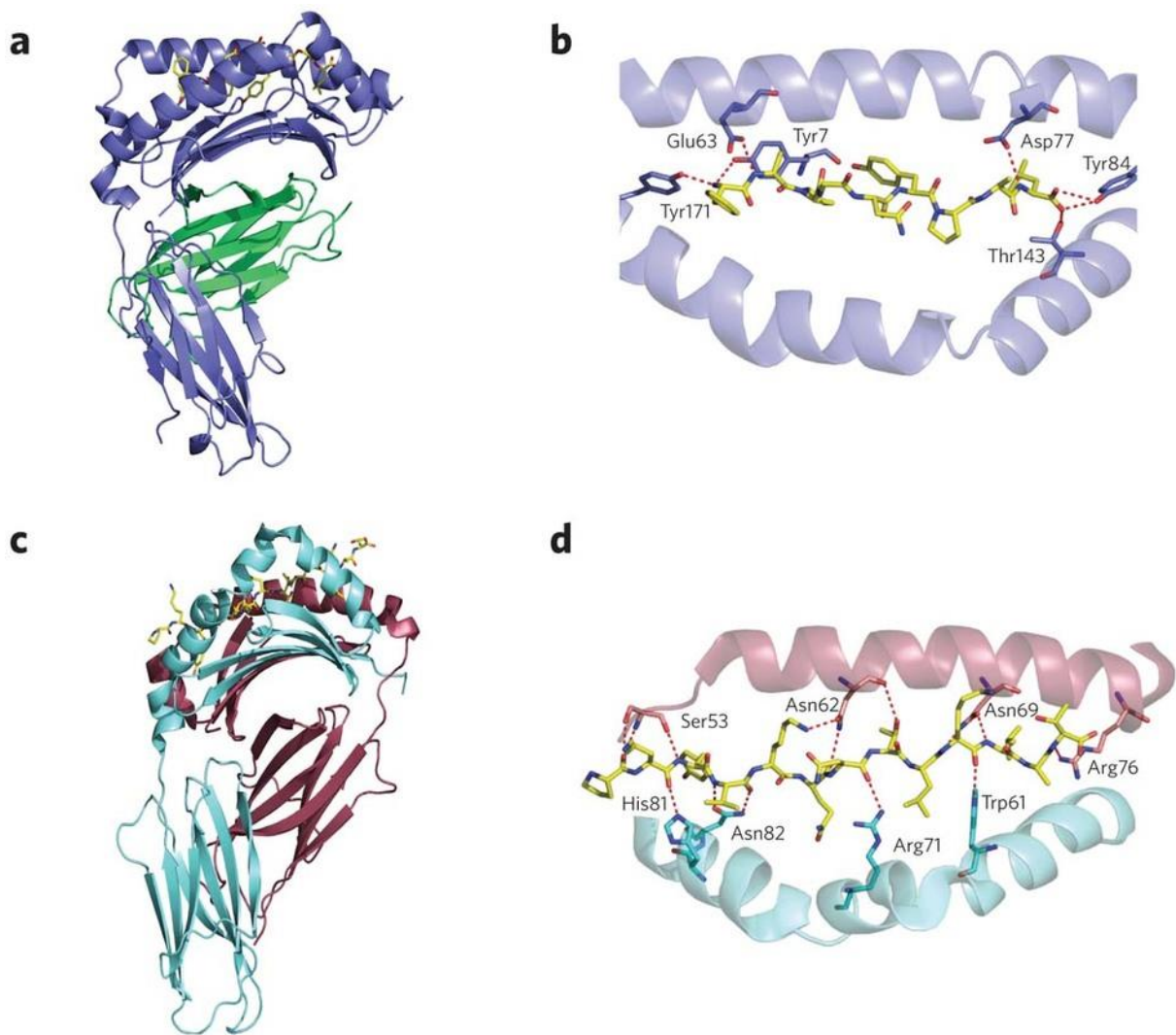
Nature Reviews | Immunology

Obr. č. 2: Proces prezentace antigenních peptidů MHC molekulami I. třídy (převzato z Yewdell *et al*).

Detekce intracelulárních patogenů a aberantních (např. nádorových) proteinů ovšem není jedinou funkcí MHC I. třídy. Rovněž dochází k unikátní interakci těchto molekul, přítomných na všech jaderných buňkách lidského těla, a receptorů KIR (Killer immunoglobulin-like receptors), exprimovaných na NK buňkách (Natural killer cells). Pokud dojde k této interakci, KIR předá NK buňce signál, který ji deaktivuje. Buňky, které neexprimují MHC I. třídy na svém povrchu (např. nádorové) jsou rychle usmrceny NK buňkou (Moretta *et al*, 2004). Takto vznikl velice oblíbený příměr mezi MHC I. třídy a občanským průkazem.

Mimo to existují i tzv. neklasické MHC molekuly I. třídy, HLA-E, HLA-F, HLA-G a CD1, které jsou strukturně i funkčně velice podobné klasickým, ovšem vyznačují se podstatně menší genetickou variabilitou, vyskytují se pouze u specifických populací buněk (NK buňky, povrchové buňky trofoblastu) a mají více specializované funkce (Hořejší *et al*, 2013).

Mezi MHC II. třídy patří u lidí 3 izotypy: HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP. Všechny tři jsou tvořeny heterodiméry ze dvou nekovalentně asociovaných řetězců  $\alpha$  a  $\beta$ . Na rozdíl od  $\alpha$  řetězce MHC I. třídy mají tyto řetězce dvě extracelulární domény  $\alpha_{1-2}$  a  $\beta_{1-2}$ , kde N-terminální domény tvoří vazebné místo pro peptidový řetězec (Stites *et al*, 1994). Struktura se ovšem liší tím, že v tomto případě oba řetězce pronikají do plazmatické membrány a vazebné místo peptidu je více otevřené (Obr. č. 3). K jejich expresi dochází pouze na povrchu některých imunokompetentních buněk (B-lymfocytů) a profesionálních antigen prezentujících buněk (APC). Takto exprimované MHC II. třídy s navázanými peptidy jsou detekovány pomocí T-buněčných receptorů asociovaných s CD4 u  $T_H$ -lymfocytů.



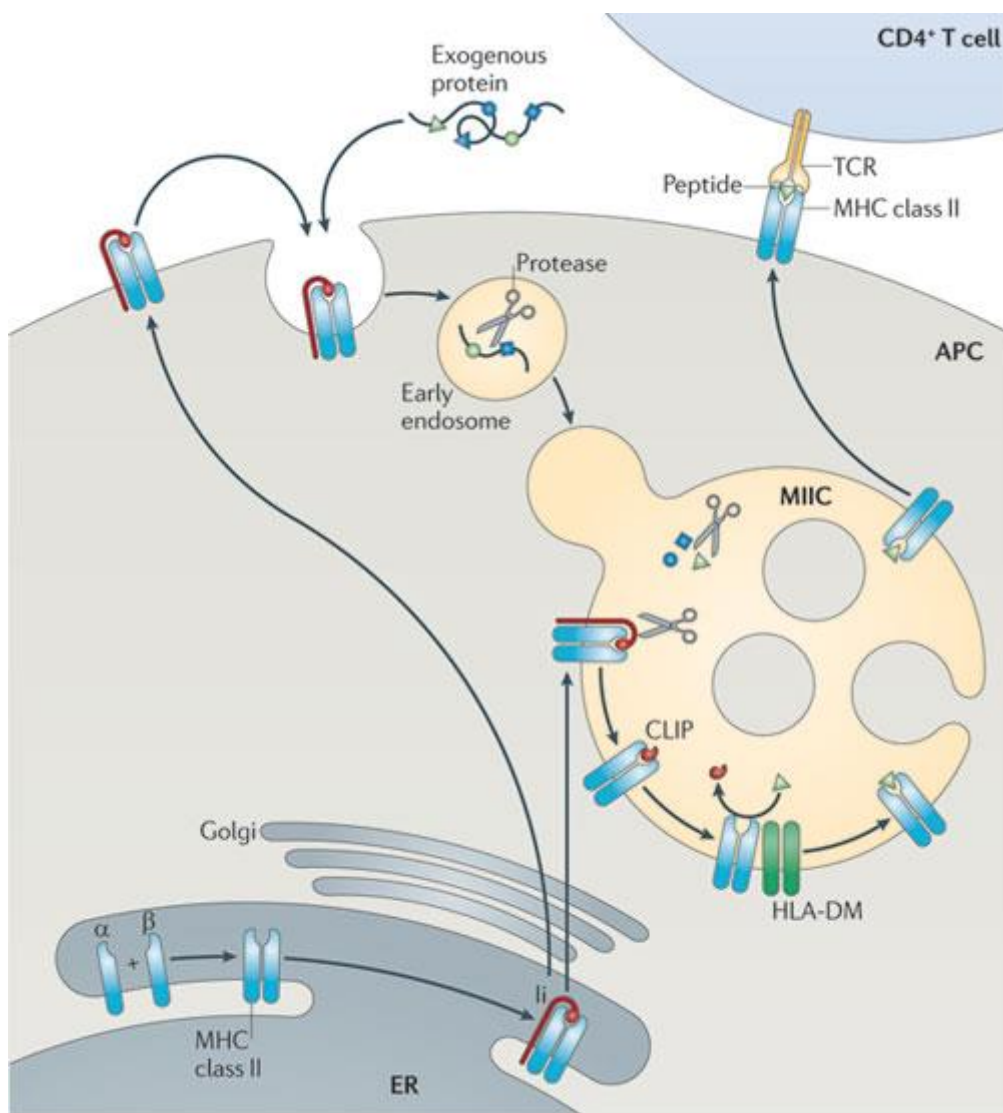
Obr. č. 3: Struktura MHC I. a II. třídy, pohled ze strany a shora. a – Struktura MHC I. třídy při pohledu ze strany, fialově značený  $\alpha$  řetězec struktury, zeleně značený mikroglobulin  $\beta_2$ , žlutě značený peptidový fragment; b – Vazebné místo MHC I. třídy při pohledu shora, tečkované čáry vyznačují interakce mezi peptidovým fragmentem a  $\alpha$  řetězcem; c – Struktura MHC II. třídy při pohledu ze strany, karmínově značený  $\alpha$  řetězec, tyrkysově značený  $\beta$  řetězec, žlutě značený peptid; d – Vazebné místo MHC II. třídy pohled shora, tečkované čáry vyznačují interakce mezi peptidovým fragmentem a strukturou  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce. (převzato z Neefjes *et al*, 2013)

S využitím rentgenové krystalografie bylo zjištěno, že se způsob navázání peptidických fragmentů MHC II. třídy mírně liší. Jak již bylo zmíněno, MHC II. třídy mají rozdílnou volnější konformaci vazebného místa pro peptidy, což dovoluje peptidickému řetězci jistý přesah mimo strukturu. Minimální délka vázaného peptidu je podle studie 13 aminokyselin. Maximální délka peptidu je teoreticky bez omezení, ovšem kvůli působení peptidáz bývá

fragment štěpen na délku 17 aminokyselin, ale může být i delší (Rudensky *et al*, 1991). Vazebný motiv bývá navíc méně konzervativní než u MHC I. třídy a dovoluje vazbu i více aminokyselin na dané místo, zatímco MHC I. třídy většinou vyžaduje specifickou aminokyselinu.

Mírné odlišnosti můžeme u MHC II. třídy nalézt i v procesu maturace komplexu. Uvnitř endoplazmatického retikula dochází k asociaci řetězců  $\alpha$  a  $\beta$  s transmembránovým proteinem zvaným invariantní řetězec (Ii, CD74), který zabraňuje navázání peptidů do vazebného místa  $\alpha_1/\beta_1$  jeho konformační blokací (část Ii řetězce přesahuje do vazebného místa) a vede molekulu  $\alpha\beta$  do následujících buněčných oddílů. Tento komplex  $\alpha/\beta/Ii$  ve formě homotrimerů (celkem 9 podjednotek) dále pokračuje biosyntetickou drahou přes Golgiho aparát. Antigen prezentující buňka pohlcuje proteinové komplexy za vzniku endozomů (experimenty s virem chřipky bylo zjištěno, že vystavované peptidy jsou extracelulárního původu), které následně fúzuje s lysozomy (Morrison *et al*, 1986). Takovéto endozomy obsahující fragmenty proteinů cizorodých částic jsou fúzovány s váčky z Golgiho aparátu obsahující komplexy  $\alpha\beta Ii$  za vzniku MIIC kompartmentu. Dále dochází k proteolytickému štěpení Ii řetězce využitím Cathepsinu S (v některých případech Cathepsinu L). Štěpením Ii řetězce vzniká peptid CLIP (class II associated invariant chain peptide), který nadále blokuje vazebné místo komplexu. CLIP je z vazebného místa uvolněn za asistence pomocných proteinů HLA-DM (neklasická molekula MHC II. třídy), které rovněž stabilizují komplex  $\alpha\beta$  a napomáhají vazbě antigenního peptidu (Mamedov *et al*, 2016). Jednou ze zajímavých funkcí proteinů HLA-DM je štěpení antigenních peptidů, které se vyznačují slabou afinitou k vazebnému místu MHC II. třídy. To dovoluje navázání peptidů s vyšší afinitou, které dají vznik komplexu s delší životností (Obr. č. 4).





Nature Reviews | Immunology

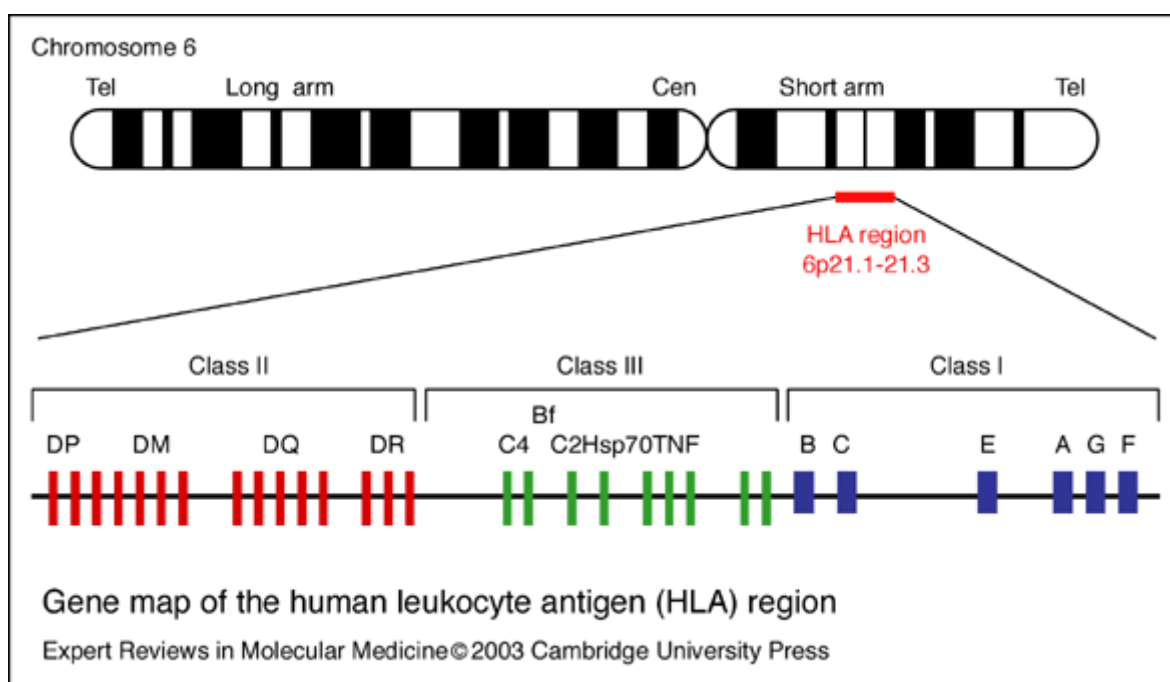
Obr. č. 4: Proces prezentace molekul MHC II. třídy (převzato s Neefjes *et al*).

Doposud popsané způsoby vazby peptidových fragmentů na molekuly HLA lze považovat za klasické a obecně nejčastěji užívané. MHC systém je ovšem relativně flexibilní a proto existuje řada výjimek. Například v některých případech je možné, aby MHC molekuly I. třídy u APC, zvláště pak u dendritických buněk, prezentovaly peptidy extracelulárního či lumenálního původu CD8 T-lymfocytům (Cresswell *et al*, 2005). Takový fenomén se nazývá křížová prezentace (cross-presentation). Dalším speciálním případem vazby jsou superantigeny jako enterotoxiny stafylokoků. Jedná se o zvláštní druh molekul s neobyčejnou schopností imunostimulace. Podstata jejich potence spočívá v tom, že na HLA molekulu II. třídy nasedají mimo její vazebné místo (Dellabona *et al*, 1990).



## 2.2 Genetika

Abychom vskutku porozuměli podstatě fungování kteréhokoliv z mnoha komplexních systémů živoucích organismů, musíme často nahlédnout do jejich genetické podmíněnosti, a MHC není výjimkou. U člověka můžeme tento komplex nalézt na krátkém raménku chromozomu č. 6 (Obr. č. 5). Některé proteiny esenciální pro funkci HLA systému jsou kódovány mimo region MHC genů. Specificky se jedná o invariantní řetězec (Ii), jehož gen leží na dlouhém raménku pátého chromozomu a mikroglobulin  $\beta_2$ , který pochází z dlouhého raménka 15. chromozomu.



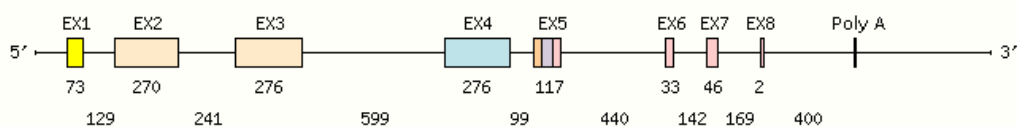
Obr. č. 5: Zjednodušená mapa 6. lidského chromozomu se zaměřením na HLA-region. (převzato z Mehra a Kaur, 2003)

Region MHC genů zabírá přibližně  $4 \times 10^6$  párů bází a lze na něm rozlišovat tři různé úseky. Nejblíže centromere leží úsek MHC II. třídy kódující zvláště  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce molekul HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP a mnoho jiných polypeptidů, které se podílejí na regulaci a metabolismu HLA molekul jako TAP geny, HLA-DM a HLA-DO. Další v pořadí je „nešťastně“ nazvaná oblast „MHC III. třídy“, která sice obsahuje geny esenciální pro funkci imunitního systému (jako třeba geny kódující druhou a čtvrtou složku klasické cesty komplementu C2 a C4, properdinový faktor B alternativní cesty komplementu, TNF  $\alpha$  a  $\beta$ , MICA a MICB proteiny, nebo podjednotky proteazomu LMP2 a LMP7), ovšem nekóduje žádné HLA glykoproteiny. Nejdále od centromery je úsek MHC I. třídy, který kóduje klasické molekuly HLA-A,

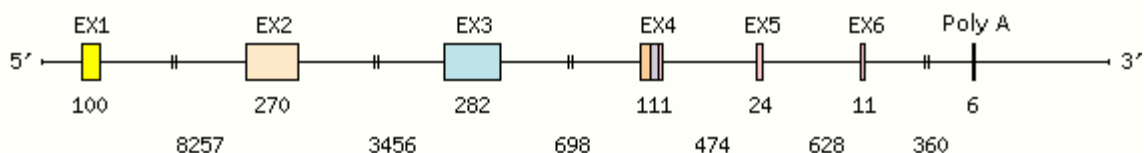
HLA-B, HLA-C a neklasické molekuly HLA-E, HLA-F, HLA-G. Mimo to všechny tři úseky obsahují velké množství pseudogenů a genům podobných sekvencí, jejichž funkce nebyla dosud plně objasněna.

Co se týče struktury individuálních HLA genů, jsou, jako většina eukaryotních genů, složeny z intronových a exonových sekvencí. HLA protein je poté syntetizován translací mRNA vytvořené sestřihem intronových sekvencí. V případě MHC genů I. a II. třídy (i imunoglobulinových genů) je struktura relativně podobná (Obr. č. 6 a 7).

První exon v sekvenci typicky kóduje signální peptid, který je přítomen v primárním translačním produktu, ovšem ve struktuře hotového proteinu se již nevyskytuje. Následuje několik exonů, které kódují extracelulární části peptidů. Počet těchto exonů může být variabilní v závislosti na genové rodině – v případě HLA I. třídy jsou tyto exony tři (Malissen *et al*, 1982) a u HLA II. třídy jsou pouze dva (Larhammar *et al*, 1983). U HLA I. třídy korespondují tyto exony s doménami těžkého řetězce HLA antigenu – exon 2 odpovídá doméně  $\alpha_1$ , exon 3  $\alpha_2$  a exon 4  $\alpha_3$ . U HLA II. třídy kóduje exon 2 domény  $\alpha_1$  nebo  $\beta_1$ , exon 3 potom  $\alpha_2$  nebo  $\beta_2$ . Z toho plyne, že největší význam pro diagnostiku mají exony 2 a 3 pro HLA I. třídy a exon 2 pro HLA II. třídy. Dále se v genu nachází jeden exon kódující integrální (transmembránový) segment proteinu a část cytoplazmatického řetězce následovaný jedním (HLA II. třídy) či dvěma (HLA I. třídy) exony kódující zbytek cytoplazmatického segmentu. Mimo to bývá v sekvenci přítomen i jeden krátký exon bez exprese.



Obr. č. 6: Struktura MHC genu I. třídy, HLA-A2. Žlutá – signální peptid, béžová – sekvence kódující vazebné místo, modrá – membránová kotva, oranžová/fialová – integrální (transmembránová) část peptidu, růžová – cytoplazmatický segment. (Přebráno z portálu IMGT, 12. 4. 2017)



Obr. č. 7: Struktura MHC genu II. třídy, HLA-DRB. Žlutá – signální peptid, béžová – sekvence kódující vazebné místo, modrá – membránová kotva, oranžová/fialová – integrální (transmembránová) část peptidu, růžová – cytoplazmatický segment. (Přebráno z portálu IMGT, 12. 4. 2017)

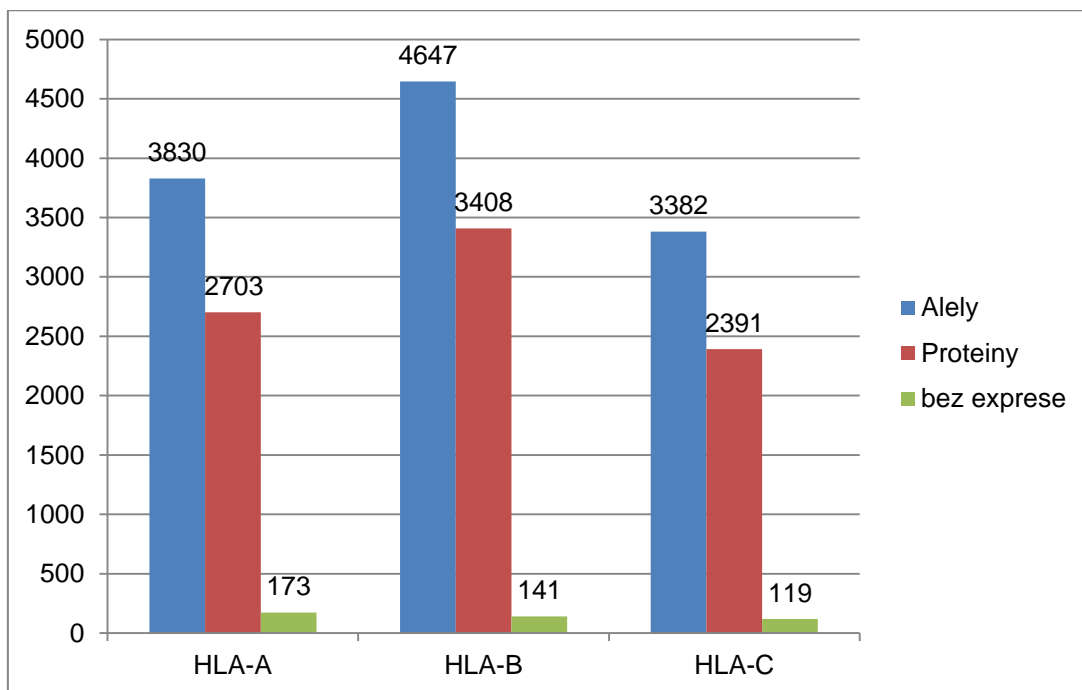
Zajímavostí genu HLA-DRB je, že se u některých jedinců, kromě konstantně přítomného genu HLA-DRB1, vyskytuje ve více kopiích známých jako HLA-DRB3, HLA-DRB4 a HLA-DRB5. Tyto geny se vyznačují individuálním repertoárem vazebných motivů a asociací k některým alelám genu HLA-DRB1 pomocí silné vazebné nerovnováhy.

K expresi proteinů MHC I. a II. třídy dochází v průběhu celého životního cyklu buněk, i když na jistých populacích buněk ve snížené míře, MHC II. třídy jsou konstitutivně exprimovány pouze na antigen-prezentujících buňkách. Jejich produkce může ovšem být v průběhu infekce stimulována pomocí interferonů (INF)  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  (Imanishi, 1994). Produkce INF- $\alpha$  a INF- $\beta$  je běžná odpověď leukocytů a fibroblastů na virovou infekci a INF- $\gamma$  je produkován při kontaktu senzibilizovaných lymfocytů s antigenem či mitogenem. Všechny tři INF mají pozitivní vliv na expresi MHC molekul I. třídy, TAP transportérů a jednotek proteazomu LMP2 a LMP7, které výrazně zlepšují schopnosti proteazomu štěpit polypeptidy (Driscoll *et al*, 1993). Synergisticky tak všechny složky spolupracují proti intracelulárním infekcím. Aktivita MHC II. třídy je mimo exprese vlastních molekul regulována přes pomocné proteiny HLA-DM a HLA-DO. Jak již bylo zmíněno, HLA-DM rozpoznává komplexy  $\alpha/\beta/CLIP$  a napomáhá v procesu navázání peptidu extracelulárního původu. HLA-DO působí jako negativní regulátor HLA-DM (Kropshofer *et al*, 1999). Při bakteriálních infekcích (bakterie exprimují povrchové antigeny, na které mohou reagovat senzibilizované leukocyty) dochází k produkci INF- $\gamma$ , který stimuluje produkci kompletních HLA-DM, ale pouze  $\alpha$  podjednotku HLA-DO (pro správné fungování proteinu jsou nutné oba řetězce). Tímto dochází ke stimulaci detekce extracelulárních patogenů posílením pomocných mechanismů.

## 2.3 Polymorfismus HLA systému

V předchozích kapitolách bylo zmíněno, že genová rodina MHC je velice polymorfní, význam a rozsah tohoto systému však nebyl rozveden. V kapitole 2.1 se uvádí, že molekuly MHC obou tříd mají vazebný motiv, který určuje spektrum peptidů, jenž může konkrétní MHC molekula prezentovat. Při navázání peptidu, který přesně nevyhovuje vazebnému motivu, vznikne komplex s nízkou afinitou k vázanému peptidu a krátkou životností na povrchu membrány. Tento vazebný motiv se ovšem může silně lišit mezi alelickými variantami molekul MHC. Peptid, který není možné navázat na jednu variantu molekuly HLA, může perfektně vyhovovat vazebnému motivu molekuly druhé. Tím, že se molekuly HLA výrazně liší ve svém vazebném motivu napříč alelickými variantami i geny a že se v jednom organismu nachází alespoň tři různé varianty MHC I. třídy a tři až čtyři MHC II. třídy (v homozygotním stavu), umožňuje imunitnímu systému bránit se širokému spektru přirozeně se vyskytujících antigenů. MHC geny se navíc exprimují kodominantně, což dále zvyšuje množství exprimovaných molekul u heterozygotů.

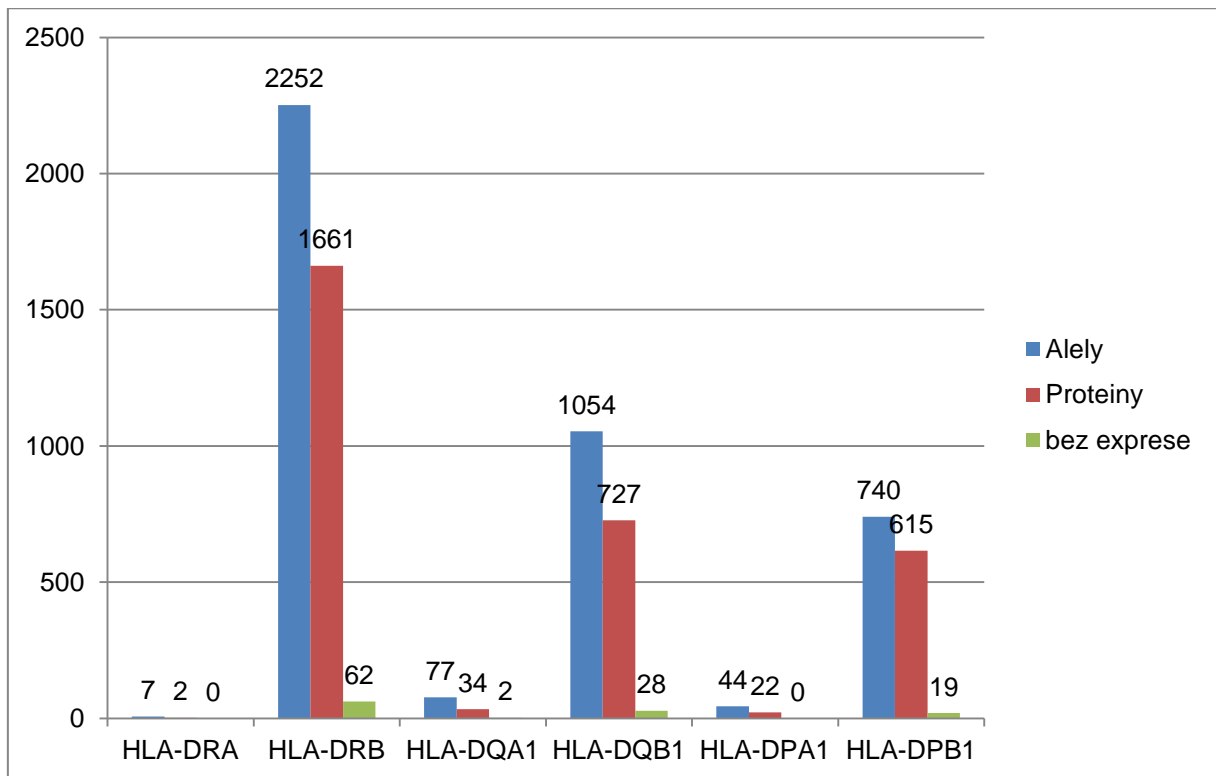
Na rozdíl od ostatních proteinů, které se v rámci svých alelických variant liší pouze jednou či několika málo aminokyselinami, aby byla zachována jejich funkce, se mezi sebou mohou molekuly HLA lišit až 20 aminokyselinami. Hlavní rozdíly bývají v oblastech vazebného místa s tím, že transmembránová část řetězce bývá relativně konzervativní. Tím dochází ke změně vazebného motivu molekuly, přičemž je funkce komplexu zachována. Hlavní příčinou těchto rozdílů bývají bodové mutace a částečné genové konverze. Některé nově vznikající alelické varianty ovšem nemusejí přinášet žádné užitečné rozšíření repertoáru vazebných motivů. Tyto alely jsou v lepším případě nositeli tichých mutací, tedy takových změn genetického kódu, které se nijak neprojevují na sekvenci aminokyselin syntetizovaného proteinu (většinou se jedná o změny bází na 3. pozici kodonu). V horším případě mají tyto alely zhoršenou schopnost transkripce nebo nedochází k jejich expresi vůbec, v pozdějším případě hovoříme o takzvaných nulových alelách. Distribuce celkového množství známých HLA alel, jimi kódovaných proteinů a nulových alel je vizualizována v grafu č. 1.



Graf č. 1: Množství známých alel MHC I. třídy, unikátních proteinů, které mohou kódovat a nulových alel bez exprese na povrchu buněk. (Informace přebrány z portálu EMBL-EBI, 10. 3. 2017)

Jak lze vyčíst z grafu, množství variant každého z těchto genů je obrovské, především u genu HLA-B. Čísla rovněž nejsou finální. Na začátku 90. let se předpokládalo, že každý z genů má v lidské populaci 20 až 50 alelických variant. Po objasnění funkce MHC a jeho významu v imunitním systému (Zinkernagel *et* Doherty, 1997), ovšem začala být znalost systému prioritní kvůli jeho aplikaci v medicíně. Od té doby docházelo ke konstantnímu růstu známých alel MHC obou tříd.

U MHC II. třídy hraje důležitou roli ještě jeden faktor – a to, že je molekula složena ze dvou řetězců, které se mohou v rámci genu volně kombinovat. Pokud je jedinec heterozygot v genech obou řetězců, může dohromady vytvořit čtyři různé HLA molekuly. Je rovněž zajímavé, že u všech genů MHC II. třídy se  $\beta$  řetězec vždy vyznačuje mnohonásobně vyšším polymorfismem než  $\alpha$  řetězec (Graf č. 2).



Graf č. 2: Množství známých alel MHC II. třídy, unikátních proteinů, které mohou kódovat a nulových alel bez exprese na povrchu buněk. (Informace přebrány z portálu EMBL-EBI, 10. 3. 2017)

Velká část alel MHC je zastoupena v lidské populaci s relativně vysokou frekvencí (vzhledem k počtu alel). Podle Hardy-Weinbergova zákona budou kombinace jakýkoliv dvou alel v populaci zastoupeny v poměru  $a^2 + 2ab + b^2$ , kde  $a$  a  $b$  jsou alelické frekvence jednotlivých alel. Vezmeme-li v úvahu, že všechny alely v populaci budou v tomto poměru, můžeme si snadno odvodit, že zastoupení alel v homozygotním stavu v populaci bude pro většinu známých variant minimální. Navíc dochází k pozitivní selekci heterozygotů, kteří jsou schopni reagovat na větší spektrum antigenů. Stabilní rovnoměrná frekvence alel ovšem není v populaci udržována pouze selekcí heterozygotů. Mechanismus, který se zde uplatňuje, je výběr závislý na frekvenci. Princip této selekce je takový, že kdykoliv dojde ke zvýšení frekvence individuální alely v populaci, dojde k selekčnímu zvýhodnění patogenních mikroorganismů, které mají proteiny neodpovídající vazebnému motivu hojně alely. Časem tak dojde ke zmnožení takových patogenů a tím dojde i k negativní selekci vůči hojně alele (Klein *et* O’Huigin, 1994).

Vědomí, že větší množství různých variant MHC genů zlepšuje schopnost organismu rozlišovat potenciálně škodlivé antigeny a iniciovat proti nim imunitní odpověď, ovšem

podněcuje otázku – proč máme počet funkčních klasických MHC genů limitován na tři až čtyři v rámci třídy? Vysvětlení je relativně prosté. V brzlíku dochází k intenzivní selekci proti T-lymfocytům schopným rozpoznávat s vysokou afinitou vlastní peptidy schopné vazby na MHC molekuly. Tímto se předchází silné autoimunitní reakci. Pokud by variabilita MHC molekul v rámci organismu byla příliš vysoká, docházelo by k velice agresivní selekci T-lymfocytů a tím ke snížení jejich schopnosti rozeznávat antigeny. Je tedy možné, že současný stav MHC genů je produktem ustanovení delikátní rovnováhy mezi variabilitou MHC molekul v rámci organismu a selekce T-lymfocytů (Takahata, 1995).

## 2.4 Využití v medicíně

Znalost HLA systému nám v klinické praxi přináší široké využití, což je nepochybně hlavní důvod velkého zájmu o jeho intenzivní studium. Mimo klíčové role, kterou HLA molekuly hrají v transplantační léčbě, mají i nezanedbatelný význam při diagnostice chorob, protože některé alely HLA genů mohou mít spojitost s predispozicí či rezistencí k jistým druhům onemocnění. Z těchto důvodů je ze strany Světové zdravotnické organizace (WHO) a imunologické komunity kladen velký důraz na jednotnost nomenklatury a rozvoj rychlejších, přesnějších a levnějších metod typizace HLA alel.

Nesporně hlavním důvodem zájmu o MHC je to, že HLA alely jsou primární příčinnou aloreaktivity. Aloreaktivita je imunitní odpověď nasměřovaná proti nevlastním buňkám stejného živočišného druhu. Tento efekt je způsoben z velké většiny nitrodruhovou variabilitou a polymorfismem membránových antigenů. Při vpravení nevlastních buněk do organismu, například při transfuzi, se nové buňky budou pravděpodobně lišit svým repertoárem exprimovaných povrchových proteinů. Jak již bylo dříve zmíněno, v brzlíku dochází k silné selekci T-lymfocytů, které tolerují membránové proteiny přirozeně se vyskytující v organismu. Nové buňky se svými povrchovými antigeny ovšem liší a proto jsou imunitním systémem považovány za cizí a potenciálně patogenní. Při transfuzi červených krvinek bývají hlavní překážkou povrchové antigeny označované jako aglutinogeny, které reagují s volnými aglutininy, nebo jiné krevní skupinové systémy, jako Rh faktor. U transfúzí jaderných buněk či transplantací kostní dřeně a orgánů hraje dominantní roli v navození aloreaktivity MHC systém.

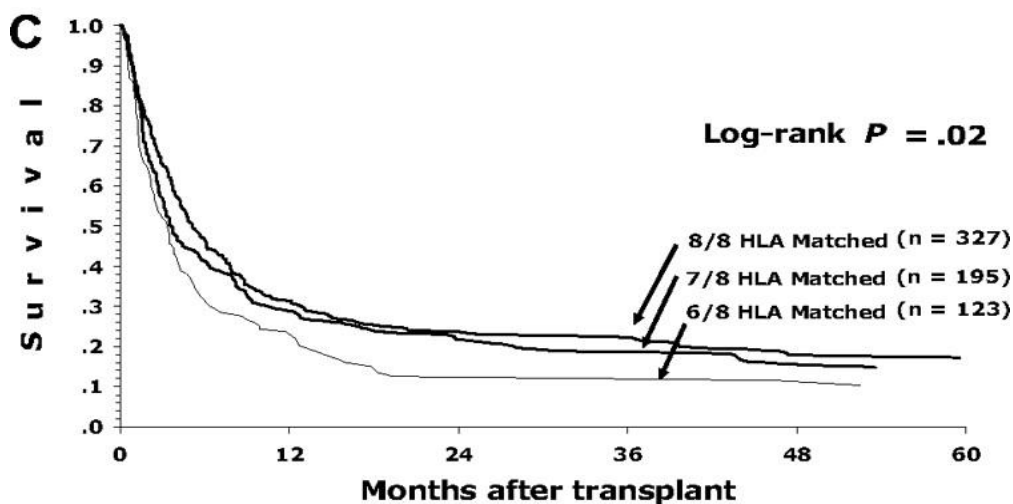
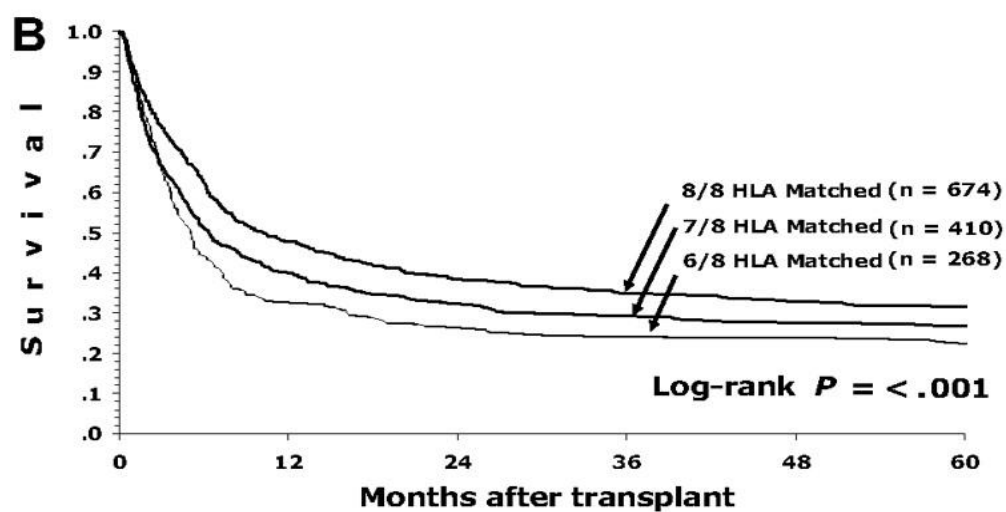
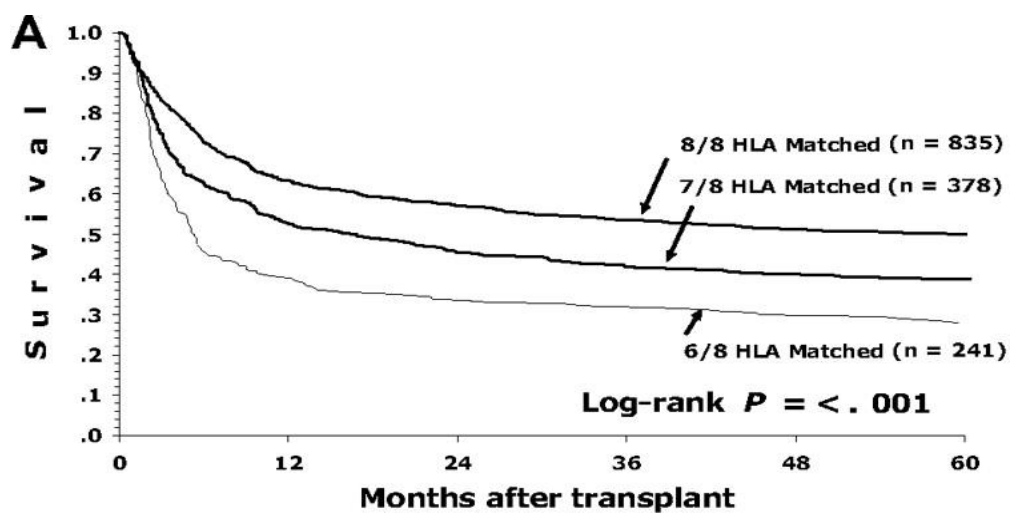
Pokud dojde k imunizaci proti transplantovaným buňkám a jejich následovné destrukci, hovoříme o tzv. odhojení (rejection). Míra imunitní odpovědi může být zmírněna, pokud

se dárce (donor) a příjemce (host), alespoň částečně shodují ve svých MHC alelách (případně krevních skupinách). Z tohoto důvodu se jeví jako optimální autologní (transplantace vlastní tkáně) či syngenní transplantace (dárce je jednovaječné dvojče). Bohužel ve většině případů není syngenní dárce dostupný, a proto se musíme uchýlit k alogenním transplantacím od jiných jedinců. V těchto případech jsou jako první voleni pro transplantaci kmenových buněk příbuzní příjemce, především pak sourozenci, kteří mohou sdílet stejné HLA alely (rodiče a potomci nejsou ideální dárce, protože ve většině případů sdílejí pouze jednu sadu HLA alel). Pokud takoví příbuzní nejsou dostupní, je hledán vhodný nepřibuzný dárce z registru dárců. Tento proces je často zdlouhavý (může trvat i několik měsíců) a při diagnostice by se měl brát v potaz.

V oblastech hematologie a hematonekologie má největší význam alogenní transplantace krvetvorných buněk, pro jejíž úspěšnost je rozhodující rozvoj reakce štěpu proti leukémii (GVL). Neshoda v HLA znacích ovšem může vyvolávat reakci štěpu proti hostiteli (GVHD), což zvyšuje mortalitu u transplantovaných jedinců. Nejvýznamnější pro úspěšnost transplantace jsou geny HLA-A, HLA-B, HLA-C a HLA-DRB1. Shoda v HLA-DQB1 genu může být významná, pokud je spojená s neshodou některého jiného HLA genu, ovšem vzhledem k silné asociaci ke genu HLA-DRB1 jsou izolované neshody genu HLA-DQB1 velmi vzácné. V ideálním případě se tedy dárce i příjemce štěpu shodují v 10/10 HLA alel. Ze studií porovnávajících korelaci množství neshod HLA genů mezi dárce a příjemcem a šanci příjemce trpícího maligní chorobou na přežití (Lee *et al*, 2007) bylo možno odvodit několik závěrů (Jindra, 2013).

Existuje přímá úměra mezi množstvím neshod HLA alel a rizikem mortality po transplantaci, přičemž toto riziko stoupá přibližně o 5 až 10 % při každé další neshodě. S rostoucí závažností choroby dochází ke snížení vlivu HLA neshody na mortalitu příjemce (Obr. č. 8). Zajímavým poznatkem ohledně HLA neshod je, že s výjimkou HLA-C nezáleží na tom, zda je neshoda na úrovni alelických rodin v rámci genu nebo alelických variant v rámci alelické rodiny – negativní efekt bude srovnatelný (např. reakce HLA-A\*02:01 na HLA-A\*02:05 bude podobná jako HLA-A\*02:01 na HLA-A\*24:02). Rovněž není možno jednoznačně určit význam jednotlivých genů pro úspěšnost transplantace.





Obr. č. 8: Míra přežití pacientů s časnou, střední a pokročilou formou choroby vzhledem ke stupni HLA shody pro HLA-A, HLA-B, HLA-C a HLA-DRB1. A – časná forma onemocnění, B – střední forma, C – pokročilá forma (Převzato z Lee *et al*, 2007).

Další překážkou při aplikaci nepříbuzenské alogenní transplantace jsou vedlejší histokompatibilní antigeny (MiHA). Jedná se o membránové aloantigeny schopné vyvolat proliferaci T-lymfocytů a spouštět u příjemců štěpu GVHD. Kvůli tomu může docházet postupem času, i při perfektní shodě HLA genů, ke komplikacím (GVHD, odhojení štěpu). V praxi je tento efekt kompenzován imunosupresivní terapií, kterou musí příjemce dodržovat do konce života.

Existuje rovněž spojitost mezi přítomností konkrétních HLA alel a genetickou predispozicí k chorobám. Například nositelé alely HLA-B27 mají v průběhu života mnohonásobně vyšší riziko rozvoje ankylozující spondylitidy (Van der Linden, 1984). HLA-DR2 alela zvyšuje pravděpodobnost rozvoje Goodpastureova syndromu a HLA-DR3 (DQ2) s HLA-DR4 (DQ8) v heterozygotním stavu predisponují k onemocnění diabetes mellitus I. typu (Janeway *et al.*, 2001). Detekci těchto alel můžeme diagnostikovat zvýšenou pravděpodobností výskytu těchto chorob, jejich nepřítomnost naopak může svědčit pro jinou diagnózu (bez asociace s danou HLA variantou).

## 2.5 Nomenklatura HLA systému

Vzhledem k zásadnímu významu MHC v medicíně je potřeba jednotného a spolehlivého názvosloví tohoto komplexního systému. Rovněž vzhledem k progresivnímu výzkumu a neustálému růstu počtu známých alel nejde o jednorázovou záležitost. Proto dochází k častým revizím názvosloví při zasedáních Výboru pro nomenklaturu faktorů HLA systému, které se datují už od roku 1968. Při těchto zasedáních jsou za přísných podmínek uděleny oficiální názvy nově objeveným alelám, které byly před tím publikovány v časopisech jako *Tissue antigens*, *Human immunology* nebo *International Journal of Immunogenetics*.

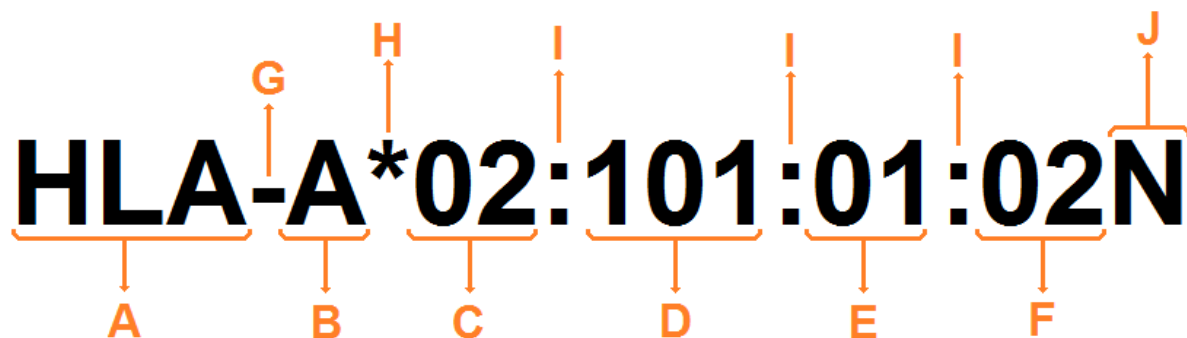
Původně užívaný formát názvosloví byl složen z předložky HLA a názvu genu vzájemně oddělených spojovníkem, následované čtyřmi, šesti či osmi čísly a případnou příponou (např. HLA-A\*02010102L, HLA-A\*3301, HLA-B\*0808N). V tomto formátu první dvojčíslí představuje alelickou rodinu, která zpravidla koresponduje se sérologickým antigenem. Třetí a čtvrté číslo udává pořadí, ve kterém byly alelické varianty objeveny. Alely, které se liší v prvních čtyřech číslech, nesou alespoň jednu mutaci, která mění aminokyselinovou sekvenci jejich proteinu. Alely lišící se v pátém a šestém čísle mají sice odlišnou nukleotidovou sekvenci, ovšem výsledný kódovaný peptid zůstává stejný (tichá mutace). Změny kódu v oblasti intronů či jiné nekódující oblasti související s genem jsou zastoupeny v posledním

dvojčíslí. Někdy přítomná přípona na konci formátu představuje možnou změnu exprese proteinu. Zde je užíváno několik značek. Písmenem „N“ (null) jsou značeny alely bez povrchové exprese, většinou v důsledku mutace se vznikem stop kodonu, posunutím čtecího rámce nebo v oblastech významných pro posttranskripční sestřih. Jako „L“ (low expression) jsou značeny alely, jež jsou exprimovány na buněčném povrchu ve zřetelně menší míře; to bývá způsobeno mutací kodonů kódujících cystein, který je esenciální pro tvorbu disulfidických můstků. Pokud snížená míra exprese alely nebyla dosud potvrzena, užívá se dočasně přípony „Q“ (questionable). Mimo to se užívá také „S“ (secreted) pro alely, jejichž protein je exprimován pouze jako sekretovaná molekula.

Vysokou prioritu má také synchronizace alelického názvosloví se sérologickým profilem exprimovaných molekul. Tento úkol však s postupným rozvojem databáze HLA alel začal nabírat na obtížnosti vzhledem k rostoucímu důrazu na sekvenace genetického kódu a následného nedostatku sérologického popisu mnohých nově objevených alel. Některé nově objevené alely rovněž nelze jasně zařadit do žádné ze sérologických skupin. Název takových alel by tedy neměl být brán jako nic víc, než jejich unikátní označení (Marsh *et al.*, 2010).

V roce 2002 se objevil nový problém s přiřazováním názvů novým alelám, protože se u alelických rodin A\*02 a B\*15 objevilo více než 100 individuálních alel. Tento problém měl být vyřešen zavedením nových alelických rodin A\*92 a B\*95, které by byly přímým rozšířením již obsazených rodin A\*02 a B\*15. Toto opatření bylo zavedeno s očekáváním, že stávající systém bude dostatečně rozsáhlý, aby pojal všechny nově objevené alely. Bohužel kvůli konstantnímu růstu známých alel uvnitř alelických rodin i alelických rodin samotných (případ HLA-DRB1) začalo být zřejmé, že tento způsob navyšování kapacity nebyl dostatečný.

Problém byl vyřešen zavedením dvojteček (:), které oddělují jednotlivé úrovně klasifikace alely (Obr. č. 9). Existující alely s překročenou kapacitou bylo možno díky tomuto systému možno přeřadit zpět do korespondujících alelických rodin (A\*9201 byla přejmenována na A\*02:101 atd.). Názvy A\*02:100 a B\*15:100 nebyly přiřazeny kvůli přehlednosti systému, při následujících případech překročení kapacity (například v případě A\*24) ovšem bylo číslo 100 normálně užito.



Obr. č. 9: Formát názvosloví HLA alely; A – HLA předložka, B – gen, C – alelická rodina, D – specifická varianta exprimovaného proteinu, E – tiché mutace v kódujícím regionu, F – rozdíly mimo kódující region, G – spojovník rozdělující HLA předložku od názvu genu, H – hvězdička dělicí jméno genu od alelického kódu, I – dvojtečky dělicí úroveň rozlišení, J – přípona naznačující změnu v expresi proteinu.

Většina dnes užívaných typizačních technologií ovšem nedovoluje jednoznačné určení HLA alely přítomné v genomu až do čtvrté úrovně. Výsledkem typizace většinou bývá „řetězec“ možných alel. Pro usnadnění zápisu těchto řetězců byly zavedeny skupiny „P“ a „G“. Skupina „P“ se užívá pro označení všech HLA alel, které kódují stejný peptidický produkt vazebných domén (exon 2 a 3 pro MHC I. třídy a 2 exon pro MHC II. třídy). Například zápisem HLA-A\*02:01P můžeme sumarizovat všechny alely kódující peptid specifický pro tuto skupinu (HLA-A\*02:01:01:01/ HLA-A\*02:01:01:02L/ HLA-A\*02:01:01:03/ HLA-A\*02:01:02...). Skupina „G“ je podobně užívána pro označení všech HLA alel sdílejících stejnou sekvenci nukleotidů v oblasti exonů kódujících domény vazebného místa. Na rozdíl od skupiny „P“ tedy rozlišuje i tiché mutace.

Užívané sérologické názvosloví je velice podobné, nicméně s několika malými odlišnostmi. Jméno genu není odděleno od alelické rodiny hvězdičkou, jednociferná čísla nepředchází nula a na rozdíl od molekulárně-genetických metod pracují metody sérologické pouze s exprimovanými proteiny na povrchu jaderných buněk. Tento přístup zpravidla nedovoluje detekci specifických variant exprimovaného proteinu v rámci alelických rodin, tichých mutací, mutací v oblastech intronů či alel bez exprese. Kvůli této limitaci je tedy možno při typizaci pouze rozlišit první úroveň analogického molekulárně-genetického názvosloví (např. HLA-A2).

S nomenklaturou HLA systému rovněž souvisí úroveň HLA typizace. Jedná se o schopnost rozlišení HLA alel přítomných v genomu vyšetřovaného jedince a v praxi rozeznáváme dvě

úrovně HLA typizace – nízkou a vysokou. Nízkou úrovní rozlišení rozumíme pouze základní rozlišení alelických rodin, tedy pouze první úroveň (např. HLA-A\*02). Typizace na úrovni nízkého rozlišení se v současné době uplatňuje např. v případě orgánových transplantací, pro transplantace krvetvorných buněk je ovšem nedostatečná. Vysoká úroveň rozlišení alely odpovídá rozlišení na „P“ skupiny v oblasti vazebného místa, tedy s důrazem na exon 2 a 3 u MHC I. třídy a exon 2 u MHC II. třídy (European Federation for Immunogenetics, 2015). Rovněž se bere ohled na mutace vedoucí ke změně exprese alely, rozlišování „G“ skupin se neprovádí, protože tiché mutace nemají klinický význam. Pro tato vyšetření se užívá řada molekulárně-genetických metod, jako jsou PCR-SSP, PCR-SSOP a v neposlední řadě SBT (typizace založená na sekvenování, Sequencing-Based Typing).

### **3 METODY VYŠETŘOVÁNÍ HLA SYSTÉMU**

Pro vyšetřování HLA systému existují dva hlavní přístupy typizace, a to přístup sérologický a molekulárně-genetický. Historicky starší přístup sérologický je založen na analýze HLA proteinů exprimovaných na povrchu jaderných buněk organismu, zatímco přístup molekulárně-genetický analyzuje sekvence nukleové kyseliny genů kódujících tyto HLA proteiny. V dnešní době se v klinické praxi většina pracovišť přiklání spíše k metodám molekulárně-genetickým kvůli jejich rozlišení a přesnosti, přístup sérologický je ovšem také stále omezeně užíván minimálně jako způsob ověření molekulárně-genetické analýzy (např. k potvrzení exprese alely).

#### **3.1 Sérologické metody**

Sérologické metody HLA typizace jsou podobně jako většina imunologických metod založené na specifické interakci protilátek s epitopem daného proteinu, v našem případě molekuly HLA. Nejčastěji užívanou sérologickou metodou pro HLA typizaci je tzv. lymfocytotoxický test. Jako výchozí materiál se při této metodě užívají živé lymfocyty vyšetřovaného. Tyto lymfocyty jsou testovány proti sérii monoklonálních či polyklonálních lidských protilátek specifických pro určité HLA antigeny. K takto inkubované směsi je dále přidán králičí komplement – lymfocyty s navázanými specifickými protilátkami jsou usmrceny. Suspenze je dále hodnocena mikroskopicky, přičemž je pozitivní reakce indikována nálezem lyzovaných (usmrcených) lymfocytů. Dnes je tato metoda již na ústupu kvůli rostoucímu využití molekulárně-genetických metod, které poskytují mnohem detailnější

informace o HLA molekulách přítomných v rámci organismu. V mnohých laboratořích ovšem stále nachází využití při základní typizaci HLA antigenů I. třídy.

Druhou a nepostradatelnou aplikací sérologických technik v HLA diagnostice je vyšetření anti-HLA protilátek. Jak již bylo zmíněno, imunitní systém aktivně rozpoznává HLA molekuly ostatních jedinců a spouští klasickou imunitní odpověď, která vede k následné aloimunizaci. K imunizaci může typicky dojít u matky během těhotenství (přítomnost otcovských HLA znaků na plodu) či po krevních transfuzích nebo transplantacích. Při každé další expozici stejným HLA molekulám dojde k rychlejší a agresivnější odezvě imunitního systému, což má zásadní význam zejména při orgánových transplantacích. Pro tyto účely se využívají metody jako lymfocytotoxický test, ELISA metody, průtoková cytometrie nebo technologie „Luminex“.

### **3.2 Molekulárně genetické metody**

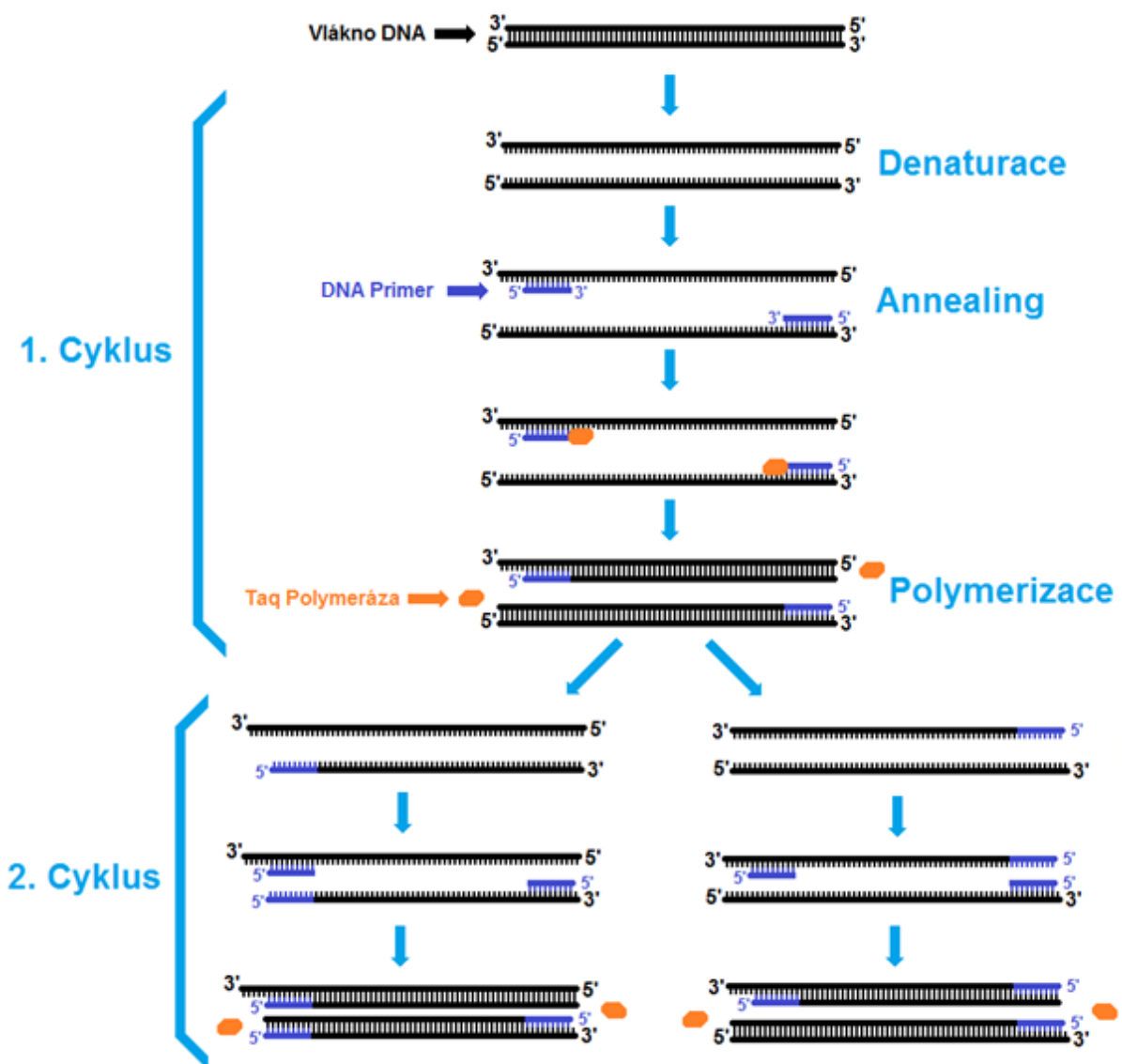
Metody molekulárně-genetické jsou, jak již bylo zmíněno, založené na analýze genetické informace, která podmiňuje strukturu HLA proteinu. Tento přístup byl zpočátku problematický, protože první metody nebyly schopné přesně určit celou sekvenci. Mezi takové metody patří restriční štěpení (Arber *et* Linn, 1969), které využívalo bakteriálních enzymů – restričních endonukleáz. Tyto enzymy dokázaly tvořit dvojřetězcové „zářezy“ v DNA na pro ně specifických palindromatických sekvencích (sekvence má stejný smysl v obou směrech – např. CAATTG). Porovnáním délky vzniklých střížných fragmentů bylo následovně možné určit variantu sekvence. Tato metoda ovšem nebyla příliš vhodná pro účely typizace HLA alel, kde se alely vyznačují enormním polymorfismem a často se liší pouze v malém počtu nukleotidů.

Úspěšnějším nástupcem restričního štěpení jsou metody založené na polymerázové řetězové reakci, metodě typicky užívané k amplifikaci DNA, která se v řadě modifikací dá využít i při vyšetřování genotypu. Druhým, v dnešní době již široce využívaným přístupem je typizace založená na sekvenování nukleových kyselin (Sequencing based typing – SBT). Je vhodné rovněž zmínit, že v praxi se provádějí analýzy směsných vzorků obou chromozomů u konkrétního jedince, což komplikuje zajištění dostatečného rozlišení užitých metod. Toto snížení přesnosti se např. u technik PCR-SSP a PCR-SSOP projevuje zvýšením počtu možných kombinací alel a u SBT jevem známým jako cis/trans nejednoznačnosti.

### 3.2.1 PCR metody

Vzhledem k významu samotné PCR reakce pro všechny odvozené a zde popisované metody je nutné plně porozumět jejímu principu. Amplifikace DNA touto metodou je složena z několika odlišných reakcí, které společně tvoří cyklus. Tyto reakce se nazývají denaturace, annealing a polymerace (Mullis *et al.*, 1986).

V prvním kroku reakce dochází k denuraci nukleových kyselin na jednotlivá vlákna, typicky při teplotě kolem 95 °C. Vzorek je v následujícím kroku (annealing) ochlazen na teplotu okolo 60 °C, kdy dochází k hybridizaci denaturovaných vláken DNA s krátkými molekulami DNA zvanými primery (primery hybridizují s cílovou sekvencí prioritně kvůli jejich krátké délce). Primery musejí být alespoň částečně komplementární k amplifikovanému vláknu DNA a ohraničovat část sekvence, která má být amplifikována. Třetím krokem je polymerace – teplota je zvýšena na 72 °C a enzym DNA-polymeráza nasedá na DNA hybridní molekulu a začíná syntetizovat komplementární vlákno k vláknu templátovému ve směru 5'→3' vkládáním volných nukleotidů. Takto nasyntetizované vlákno je dále opět denaturováno při 95 °C a proces se opakuje (Obr. č. 10).



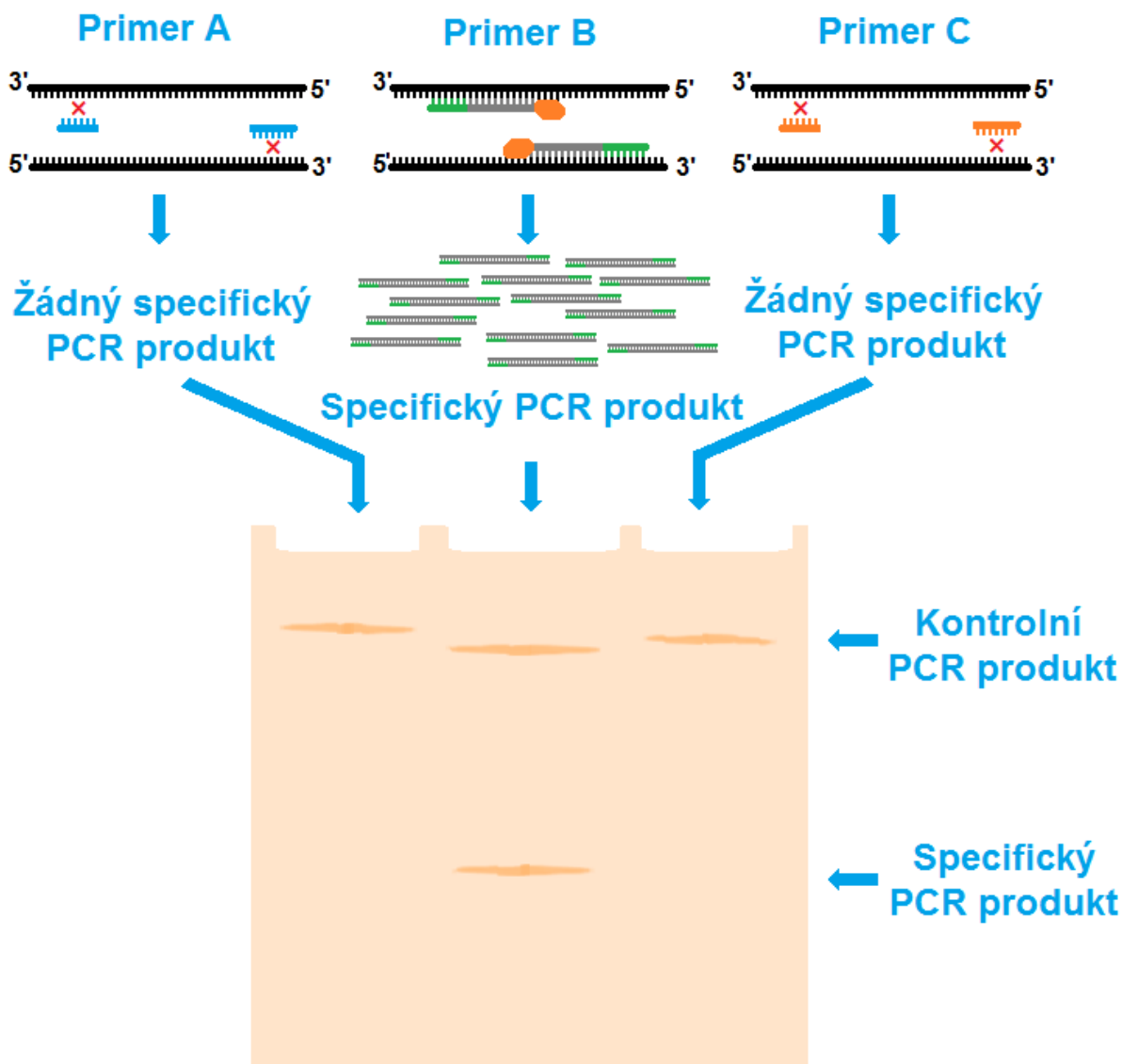
Obr. č. 10: Schéma polymerázové řetězové reakce

Je vhodné zmínit, že teplota 72 °C není ani zdaleka optimální teplotou pro aktivitu většiny standardních enzymů. V prvních verzích této metody byla užívána normální DNA-polymeráza s optimem 37 °C, ovšem při každém denaturačním kroku docházelo k nevratnému znehodnocení enzymu, který musel být při každém cyklu manuálně nahrazen. Proces byl zdokonalen objevem termostabilní DNA-polymerázy u termofilních bakterií jako je *Thermus aquaticus*. Metoda má rovněž jistá omezení – délka amplifikovaného fragmentu je omezena a počet cyklů by se měl ideálně pohybovat mezi 20-35 (při nižším počtu není amplifikace dostatečná, při vyšším dochází k výraznému snížení efektivity). Většinu nedostatků PCR reakcí ovšem lze do jisté míry kompenzovat mnohými variacemi této metody.



### 3.2.1.1 PCR-SSP

PCR-SSP, neboli polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery je jednou z několika PCR technik užívaných při typizaci HLA. Jak naznačuje název techniky, jde o využití komplementarity mezi specificky se vážícím DNA primerem a úsekem DNA unikátním pro určitou HLA alelu. Pokud je primer komplementární k přítomné sekvenci HLA genu, dojde v průběhu PCR reakce k amplifikaci DNA, což lze detekovat pomocí gelové elektroforézy a interkalačních barviv (Obr. č. 11). V opačném případě, kdy komplementární vlákno DNA k sekvenci primeru není přítomné, nedochází k amplifikaci a tedy ani ke vzniku detekovatelného PCR produktu (Olerup *et* Zetterquist, 1992). Správnost reakce bývá potvrzena užitím vnitřní kontroly. PCR-SSP je tak v principu multiplexní PCR (specifické a kontrolní primery).



Obr. č. 11: Schéma PCR-SSP reakce.

Jak již víme, všechny HLA geny jsou extrémně polymorfní a jejich alely se často liší pouze o jeden nukleotid, který ani nemusí ovlivňovat exprimovaný protein (tiché mutace). Pro detailní typizaci jediného přítomného HLA genu by bylo nutno provést stovky PCR reakcí. Takový druh typizace by byl zdlouhavý, náročný na materiály a hlavně velice nepraktický. Proto se technika PCR-SSP užívá primárně k typizaci na úrovni nízkého rozlišení či subtypizaci. K provedení takových vyšetření jsou dnes běžně dostupné komerční soupravy.

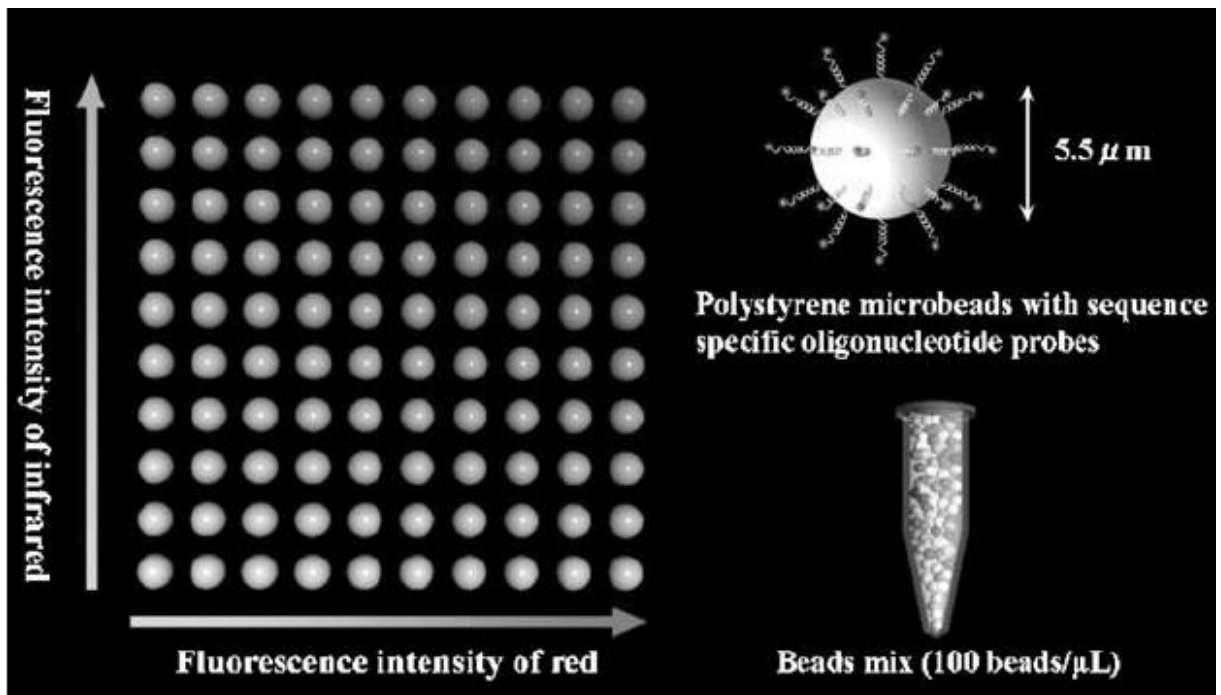
Při vyšetření HLA genotypu na úrovni nízkého rozlišení se zjišťují pouze hlavní alelické skupiny HLA genu, které se běžně vyskytují v populaci. Při takovém omezení lze zredukovat

počet nutných PCR reakcí na přijatelné množství. Podobně je tomu u subtypizace, kdy vyšetřujeme pouze specifickou alelu v rámci alelické skupiny.

### 3.2.1.2 PCR-SSOP

Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligosondami (zkracováno jako PCR-SSOP nebo jen PCR-SSO) je další PCR dependentní metodou užívanou pro určování HLA genotypu. Na rozdíl od PCR-SSP nejsou jednotlivé HLA alely rozpoznávány na úrovni PCR, ale až pomocí hybridizace PCR produktů od vyšetřovaného jedince s DNA sondami namířenými proti konkrétním variantám sekvence. Markantní rozdíl je rovněž v provedení metody. Zatímco co se PCR-SSP skládá prakticky pouze ze dvou kroků – PCR amplifikace a detekce pomocí gelové elektroforézy, PCR-SSOP má komplexnější průběh. Existuje řada modifikací PCR-SSOP podle toho, jakým způsobem jsou na pevnou fázi fixovány hybridizační sondy nebo testované PCR produkty. V současné době je velmi rozšířená PCR-SSOP technika, která využívá fixace hybridizačních sond na fluorescenčně značených mikrokuličkách.

V původním provedení metody (Itoh *et al*, 2005) byly užity vzorky DNA izolované z periferní krve japonských dobrovolníků. U těchto vzorků DNA byly amplifikovány exony 2 a 3 pro HLA I. třídy a exon 2 pro HLA-DRB1. Užití primery byly značené na 5' konci biotinem. Dále byly nasyntetizovány sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy schopné určit variantu HLA alely (analogicky jako primery u PCR-SSP) s přidanou terminální amino-skupinou na 5' konci. Upravené sondy byly kovalentně navázány na karboxylovaný povrch polystyrenových mikrokuliček pomocí etylén dichloridu. Tyto polystyrenové mikrokuličky obsahovaly směs dvou fluorescenčních barviv o různých koncentracích, tvořící jistý identifikační kód individuálních mikrokuliček, který bylo možno po expozici záření o vlnové délce 635 nm identifikovat (Obr. č. 12). Oligonukleotidové sondy specifické pro HLA alely jsou navázané na mikrokuličky tak, aby je bylo možno podle identifikačního kódu kuliček rozlišit.



Obr. č. 12: Rozlišení mikrokuliček dle interních barviv a jejich struktura (Převzato z Itoh *et al*, 2005)

Sondami značené mikrokuličky byly dále smíchány a zředěny do koncentrace 100 mikrokuliček na 1  $\mu\text{l}$ . Roztok kuliček následovně hybridizoval s biotinem značeným a denaturovaným PCR produktem v prostředí hybridizačního pufru po dobu 60 minut při 52  $^{\circ}\text{C}$ . Hybridizační směs byla promyta PBS-tween puftrem a centrifugována. Supernatant byl odstraněn a suspenze smíchána a 5 minut inkubována při 52  $^{\circ}\text{C}$  se zředěným roztokem SA-PE (Streptavidin-fykoerythrin). Výsledky reakce byly hodnoceny pomocí průtokového cytometru Luminex 100, vybaveného dvojicí laserů schopných zároveň analyzovat identitu mikrokuliček při 635 nm a přítomnost streptavidin-fykoerythrinu při 532 nm. Tímto způsobem bylo možné rozlišit volné mikrokuličky (poskytují pouze signál pro identitu kuličky) a mikrokuličky s navázaným komplementárním vláknem DNA (poskytují signál pro identitu mikrokuličky a signál streptavidin-fykoerythrinu navázaného přes biotin). Informace o množství a identitě mikrokuliček s navázaným PCR produktem jsou elektronicky zpracovány a porovnány s knihovnou známých alel.

Vývoj této metody byl průlomem v oblasti typizace HLA – výsledky, na které bylo dříve nutné desítky PCR-SSP reakcí, se s aplikací PCR-SSOP daly získat z jediné reakční směsi. Schopnost průtokového cytometru analyzovat až 96 vzorků naráz navíc dovoľovala provádět hromadné typizace HLA, což výrazně ulehčilo práci ve velkých zdravotnických centrech.

Na druhou stranu je metoda PCR-SSOP relativně nevhodná pro jednorázové typizace individuálních pacientů, kde klasická PCR-SSP nabízí stále lepší alternativu. Typizace je rovněž omezena rozlišovací schopností průtokového cytometru. Luminex 100 a jeho novější model Luminex 200 jsou schopny rozlišit pouze 100 (a 200 v případě novějšího modelu) kombinací barviv v mikrokuličkách a tedy i stejný počet sekvenčně specifických sond. Zcela nedávno byl ovšem uveden na trh přístroj Luminex s rozeznávací kapacitou až 500 specifických mikrokuliček, což dále rozšířilo možnosti metody.

### **3.2.1.3 Real-time PCR**

Metoda real-time PCR byla původně zavedena do HLA typizace jako pokus o vyvinutí rychlejší a přesnější alternativy metod PCR-SSP a PCR-SSOP (Casamitjana *et al*, 2005). Toho bylo dosaženo kombinací sekvenčně specifických primerů s dvojicí specifických TaqMan sond v každé reakční směsi. TaqMan sondy jsou krátké nukleotidové sekvence s kovalentně vázaným fluorescenčním barvivem na 5' konci a zhášecem na 3' konci. Při PCR amplifikaci se využívá 5'→3' exonukleázové aktivity DNA-polymerázy, která odbourává sondu a uvolňuje fluorescenční barvivo, jehož intenzita dosahuje detekovatelných hladin kolem 15 až 20 cyklu. Díky tomuto přístupu je možno snížit množství nutných reakcí, zvýšit jejich specifitu a provést analýzu výsledků ještě v průběhu amplifikační reakce. Přestože většina laboratoří preferuje osvědčené PCR-SSP a PCR-SSOP techniky, real-time PCR se v poslední době stává jejich alternativou zejména pro svou jednoduchost a rychlost provedení, např. při urgentních HLA typizacích zesnulých dárců orgánů.

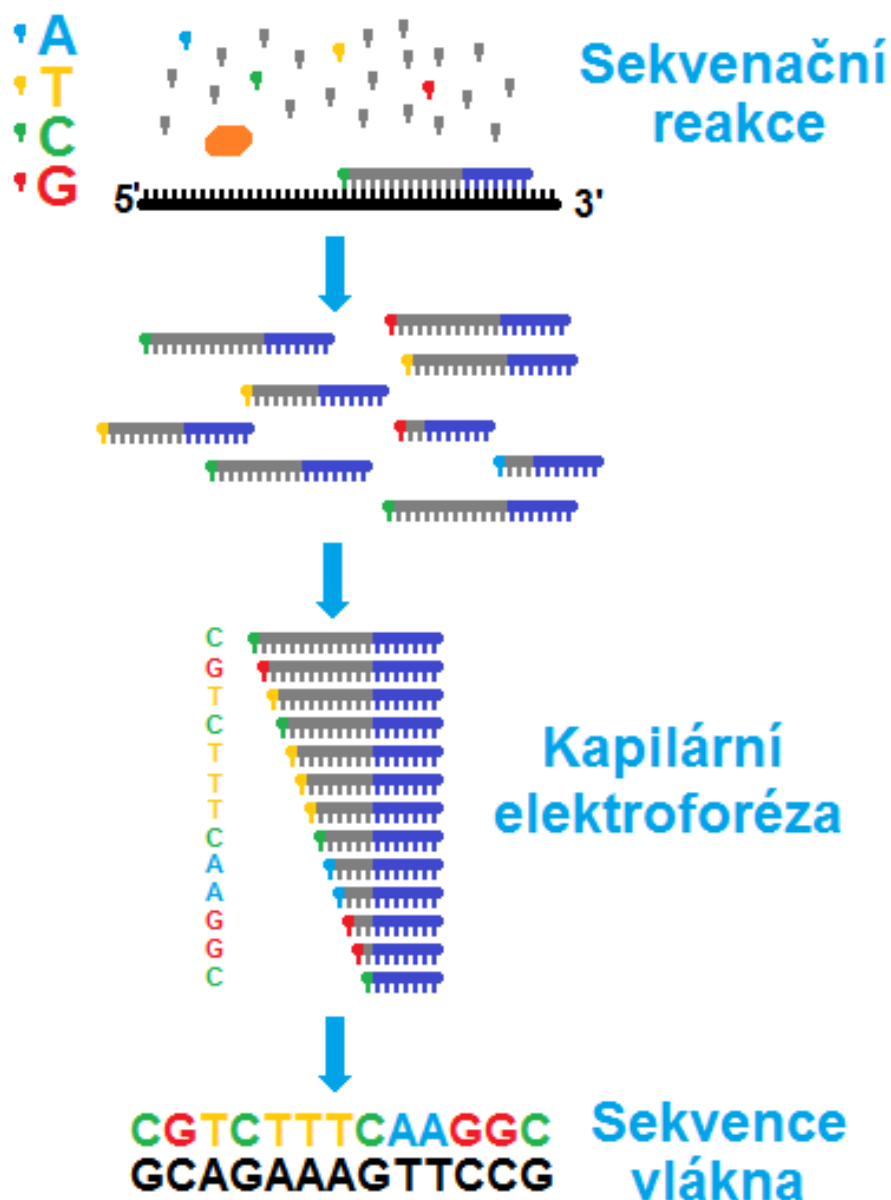
### **3.2.2 SBT**

Druhým molekulárně-genetickým přístupem k typizaci HLA alel jsou metody označované jako SBT (Sequencing based typing), tedy metody určující specifickou variantu zájmového genu sestavením jeho kompletní nukleotidové sekvence. Tyto metody, na rozdíl od metod založených na PCR, dovolují provést analýzu celé kódující oblasti genu v mnohem menším množství reakcí. Mezi dnes aktuální metody sekvenování řadíme automatické sekvenování (Smith *et al*, 1986), metodu principiálně odvozenou od původní metody sekvenování syntézou dle Sangera (Sanger *et al*, 1977) a prudce se rozvíjející odvětví metod sekvenování nové generace (z anglického „Next generation sequencing“).

### 3.2.2.1 Konvenční sekvenování

Původně bylo k sekvenování nukleových kyselin užíváno dvou různých přístupů – odbouráváním řetězce dle Maxama nebo syntézou dle Sangera. Z těchto dvou přístupů se prokázal ten Sangerův jako praktičtější. Metody dnes chápané jako konvenční sekvenování (jako automatické sekvenování) jsou přímými nástupci původní Sangerovy techniky.

Princip těchto metod je následovný – podobně jako při PCR dochází k syntéze nového řetězce na denaturovaném vlákně DNA pomocí termostabilní DNA-polymerázy a jednoho DNA primeru ve vhodném prostředí. Esenciální součástí reakční směsi jsou rovněž fluorescenčně značené dideoxyribonukleotidy (ddNTPs), přičemž každý z nich (A, T, G, C) je značen individuálním fluorescenčním barvivem (v původním provedení dle Sangera bylo užito radioaktivní značení a reakce s každým značeným nukleotidem musela být prováděna zvlášť). Značené ddNTPs se náhodně začleňují do nově syntetizovaného vlákna (vznikajícího ze sekvenačního primeru) a kvůli chybějící hydroxylové skupině na třetím uhlíku pentózy terminují polymerizační reakci. Výsledkem je směs fluorescenčně značených DNA řetězců o náhodné délce. Takto získaná směs je podrobena elektromigrační separaci většinou ve formě kapilární elektroforézy. Seřazením denaturovaných fragmentů DNA dle jejich délky a snímáním signálů fluorescenčních značek vázaných na ddNTPs lze určit kompletní sekvenci řetězce nukleotidů (Obr. č. 13).



Obr. č. 13: Schéma automatické sekvenace.

Metoda je velice výhodná pro účely typizace HLA, protože výstupem je celá sekvence nukleotidů sekvenovaného úseku a ne pouze informace obdržené z komplementarity primerů či sond. Konvenční sekvenování ovšem není bez nedostatků. Podobně jako polymerázová řetězová reakce má i konvenční sekvenování jistý horní limit délky syntetizovaných řetězců, dojde-li k překročení tohoto limitu, dochází k výraznému snížení přesnosti metody. Toto omezení společně s obecnou „anatomíí“ eukaryotního genomu ve většině případů nedovoluje sekvenovat větší úseky kódující DNA než jeden exon. Problematické je, že některé změny exprese HLA genů jsou způsobené mutací v intronové oblasti. Sekvenování intronů je touto

metodou sice proveditelné, ovšem vzhledem k průměrné délce intronu a kapacitě této metody je to velice nepraktické. Sekvenování také musí být prováděno na již amplifikovaném specifickém úseku DNA, což znamená, že musíme znát sekvence ohraničující zájmovou sekvenci, abychom mohli nasyntetizovat amplifikační primery.

Při sekvenaci směsných vzorků z obou chromozomů se rovněž můžeme setkat s jevem známým jako cis/trans nejednoznačností. Jde o problém snižující rozlišení typizace způsobený přítomností dvou sekvenovaných vláken DNA (z různých chromozomů), které poskytují dva různé signály detekované při kapilární elektroforéze. V některých případech nelze rozlišit, ze které varianty signál pochází, protože se stejná kombinace heterozygotních pozic v daném lokusu může nacházet u několika různých kombinací alel. Jako důsledek tedy nemůžeme jednoznačně určit genotyp jedince. Problém lze řešit sekvenací individuálních chromozomů zvlášť (např. po jejich „oddělení“ tzv. skupinově specifickou amplifikací), nebo doplnit SBT typizaci směsných vzorků subtypizací metodou PCR-SSP k odstranění případných nejednoznačností.

Dalšími možnými komplikacemi při typizaci jsou jevy jako preferenční amplifikace či alelický dropout. Preferenční amplifikace se vyznačuje silnou preferencí amplifikace jedné z alel u heterozygotního jedince zapříčiněnou délkou či složením užitých primerů. Alelický dropout pak způsobuje úplné vypadnutí jedné z alel, většinu kvůli nízké kvalitě materiálu. Oba tyto problémy se projevují zdánlivě homozygotním výsledkem.

### **3.2.2.2 Next generation sequencing**

Mimo klasické sekvenování se stále častěji začínají užívat pokročilé technologie tzv. sekvenování nové generace (NGS). NGS metody ve většině případů spočívají v sekvenování velkého množství krátkých segmentů pocházejících z různých míst amplifikované analyzované sekvence. Tyto krátké segmenty jsou následovně v závislosti na jejich vzájemném překryvu bioinformaticky zpracovány do kompletní sekvence (Obr. č. 14). Hlavní předností NGS metod je jejich obrovská kapacita a tedy i schopnost analyzovat celou sekvenci včetně intronů v několika vzorcích zároveň. Nevýhodou NGS je prozatím nesporně pracná příprava analyzovaných vzorků – většina NGS metod vyžaduje přípravu cDNA knihovny následovanou emulsní PCR či můstkovou PCR (podle užívané NGS techniky). NGS metod je mnoho, v dnešní době je nejvíce využívanou metoda sekvenování syntézou od firmy Illumina, která překonala původní metodu pyrosekvenování.



Technika sekvenování syntézou od firmy Illumina vyžaduje imobilizaci DNA na čipu. Následně dochází k amplifikaci templátu na pevné fázi. K takovému vzorku jsou přidány sekvenační primery a směs všech čtyř nukleotidů, každý značený individuálním barvivem. Po inkorporaci značeného nukleotidu je snímán jeho signál. Fluorescenční značka je následovně odštěpena terminátorem, nukleotid je ovšem v sekenci zachován. Technika pokračuje zařazením dalšího značeného nukleotidu a detekcí, dokud není určena celá sekvence DNA molekuly. Překryvem sekvencí DNA molekul je poté sestavena celková původní sekvence.

Obr. č. 14: Bioinformatická analýza výsledků obdržných metodou NGS. (Převzato z Buckingham, 2010)

Molekulární biologie a genetika jsou extrémně progresivní obory s neustálou snahou o zdokonalení jejich metod. Není tedy divu, že se začínají objevovat a postupně uplatňovat sekvenační metody třetí generace, které dokážou zjistit nukleotidovou sekvenci z jediné molekuly. Zda-li některá z těchto metod opanuje „zítřek“ sekvenování je ve hvězdách, budoucnost, přinejmenším v oblasti sekvenačních technologií, je však blíže, než se nám zdá.

## 4 CÍL PRÁCE

### **Teoretická část**

- Shromáždění bibliografických informací a vypracování literárního přehledu na téma hlavní histokompatibilní komplex člověka a běžně užívané metody pro jeho typizaci.

### **Praktická část**

- Popis strategie vyšetření HLA genotypu
- Demonstrace typizace HLA genotypu s využitím metod PCR-SSP a SBT
- Zpracování vybraných zajímavých případů HLA typizace (kazuistiky)

## 5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

### 5.1 Typizace lokusu HLA-A na úrovni nízkého rozlišení metodou PCR-SSP

**Biologický materiál:** Roztok DNA č. 23326 (anonymní vzorek externí kontroly kvality) získaný z jaderných buněk periferní žilní krve vyšetřovaného jedince a skladovaný při teplotě  $-18^{\circ}\text{C}$  ( $c = 302 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ).

**Reagencie:** Voda pro PCR, Taq DNA-polymeráza (Top-Bio, T032,  $c = 5 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) skladovaná při teplotě  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , Master mix (Olerup; kresolčerveň, glycerin, PCR pufr a deoxynukleotid trifosfáty), komerční souprava pro HLA-A typizaci na nízkém rozlišení (Olerup, 78Y, 101.401-48u), připravený ztuhlý agarózový gel s jamkami (2%, obarvený ethidium bromidem), PCR marker relativní molekulové hmotnosti (Olerup), TBE pufr  $5\times$ .

**Přístroje:** Flowbox SKAN Basel-Allschwil (B48S), chladnička laboratorní (LIEBHERR, LKpv 6523), mraznička (Brandt, BFU112SW), mechanické pipety (0,1-2,5  $\mu\text{l}$ ; 1-10  $\mu\text{l}$ ; 2-20  $\mu\text{l}$ ; 10-100  $\mu\text{l}$ ; 20-200  $\mu\text{l}$ ; 100-1000  $\mu\text{l}$ ), automatická pipeta, 12kanálová pipeta, příruční minicentrifuga Mini-Labnet, centrifuga Heraeus Multifuge X1R, elektroforetická vana Easy-cast model #82, zdroj stejnosměrného napětí Enduro Labnet 300V (E0303), termocyklér Biometra TProfessional Basic Gradient (BM-070-601), snímací zařízení Gel Logic 112.

**Spotřební materiál:** Pipetovací špičky (2 – 1000  $\mu\text{l}$ ), rukavice nitrilové jednorázové, mikrozkuhavky (1,5 ml), lepivá fólie, stěrka, destička na mikrozkuhavky, buničina.

### 5.2 Typizace lokusů HLA-A na úrovni vysokého rozlišení metodou SBT

**Biologický materiál:** Roztok DNA č. 23326 (anonymní vzorek externí kontroly kvality) získaný z jaderných buněk periferní žilní krve vyšetřovaného jedince a skladovaný při teplotě  $-18^{\circ}\text{C}$  ( $c = 302 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ).

**Reagencie:** Voda pro PCR, komerční souprava HLA-A AlleleSEQR CORE (GenDx, 1601410116), AmpliTaq Gold DNA-polymeráza (ThermoFisher), připravený ztuhlý agarózový gel s jamkami (2%, obarvený ethidium bromidem), ethanol absolutní (p. a.), formamid deionizovaný (Sigma, SLBN4928V), TBE pufr  $5\times$ , kresolčerveň ( $c = 12,5 \text{ mg}/\text{ml}$ ).

**Přístroje:** Flowbox SKAN Basel-Allschwil (B48S), chladnička laboratorní (LIEBHERR, LKpv 6523), chladnička laboratorní (LIEBHERR, LKexv 3910-22A), mraznička (Brandt, BFU112SW), mechanické pipety (0,1-2,5  $\mu\text{l}$ ; 1-10  $\mu\text{l}$ ; 2-20  $\mu\text{l}$ ; 10-100  $\mu\text{l}$ ; 20-200  $\mu\text{l}$ ;

100-1000  $\mu$ l), příruční minicentrifuga Mini-Labnet, termocyklér Biometra TProfessional Basic Gradient (BM-070-601), genetický analyzátor ABI3500 (ThermoFisher - Hitachi, 8ch), třepačka VX100 (Labnet).

**Spotřební materiál:** Pipetovací špičky (2 – 1000  $\mu$ l), rukavice nitrilové jednorázové, mikrozkušavky (1,5 ml, stripy 0,5 ml), buničina, plastová „Falconova“ zkumavka (5 ml), pryžové víčko.

## 6 METODIKA

### 6.1 Typizace lokusu HLA-A na úrovni nízkého rozlišení metodou PCR-SSP

Typizace lokusu HLA-A byla provedena v souladu s pracovním postupem soupravy pro typizaci metodou PCR-SSP (Olerup) a standardizovaným pracovním postupem (SOP-HLA-A01) za dozoru kvalifikovaného pracovníka.

#### Pracovní postup:

1. Byla připravena reakční směs pro provedení 32 PCR amplifikací smícháním 110,3  $\mu\text{l}$  Master mixu Olerup, 243  $\mu\text{l}$  vody pro PCR a 5  $\mu\text{l}$  Taq DNA-polymerázy v 1,5 ml mikrozkuhavce. Směs byla řádně promíchána pomocí mechanické pipety.
2. Z takto připravené směsi byl odebrán a následně napipetován do 32. jamky kitu, která slouží jako negativní kontrola, objem 10  $\mu\text{l}$ .
3. K zbylému objemu reakční směsi bylo napipetováno 2,08  $\mu\text{l}$  vzorku DNA 23326 ( $c = 302 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ). Vzorek byl opět promíchán pomocí pipety a následovně stočen na stolní centrifuze.
4. Reakční směs byla dále využitím automatické pipety rozdělena po 10  $\mu\text{l}$  do zbývajících 31 jamek destičky obsahujících specifické primery.
5. Jamky byly následovně překryty lepkavou fólií s utěsněním stěrkou.
6. Destička byla krátkodobě stočena v centrifuze (76 G, 20-30 sekund, 20 °C), umístěna do termocykléru a inkubována za průběhu teplotního programu D1dynam (Tab. č. 1).

Počet cyklů	Teplota (°C)	délka trvání kroku (sekundy)	Proces
1	94	120	Denaturace
10	94	10	Denaturace
	65	60	Annealing/Extense
20	94	10	Denaturace
	61	50	Annealing
	72	30	Extense
1	4	trvale	-

Tab. č. 1: Průběh programu D1dynam (teplotní profil)

7. Po doběhnutí programu D1dynam byla destička vyjmuta z termocykléru a fólie byla odstraněna.
8. Předem připravený ztuhlý agarózový gel byl umístěn do elektroforetické komory a převrstven 0,5 $\times$  koncentrovaným TBE pufrem.

9. Pomocí 12kanálové pipety byly přeneseny PCR směsi z jamek destičky soupravy do připraveného agarózového gelu. V první řadě agarózového gelu bylo rovněž do jamky vpravo od vzorků napipetováno 5  $\mu$ l PCR markeru relativní molekulové hmotnosti.
10. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí při 130 V. Elektromigrace byla zastavena po uplynutí 25 minut.
11. Agarózový gel byl následovně vyjmut z elektroforetické vany, umístěn do snímacího zařízení. Produkt PCR reakce byl vizualizován expozicí UV záření.
12. Výsledky PCR reakcí byly interpretovány s využitím programu SCORE, verze 5.00.72.17 T.

## 6.2 Typizace lokusů HLA-A na úrovni vysokého rozlišení metodou SBT

Typizace lokusu HLA-A byla provedena v souladu s pracovním postupem soupravy pro typizaci metodou SBT (GenDx) a standardizovaným pracovním postupem (SOP-HLA-A02) za dozoru kvalifikovaného pracovníka.

### Pracovní postup:

1. Původní vzorek DNA 23326 ( $c = 302 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) byl naředěn vodou pro PCR na koncentraci  $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Směs byla důkladně promíchána pomocí mechanické pipety.
2. Do prázdné mikrozkušavky (strip, 0,5 ml) bylo napipetováno 8  $\mu$ l originální amplifikační směsi HLA-A AlleleSEQR CORE a 0,3  $\mu$ l AmpliTaq Gold DNA-polymerázy. K této směsi byly přidány 2  $\mu$ l zředěného vzorku DNA. Směs byla důkladně promíchána pomocí mechanické pipety.
3. Mikrozkušavka byla dále pevně uzavřena víčkem a umístěna do termocykléru.
4. Směs byla následovně inkubována v termocykléru při programu ATRIA-PCR (Tab. č. 2).

Počet cyklů	Teplota (°C)	Délka trvání cyklu (sekundy)	Proces
1	95	600	Denaturace
36	96	20	Denaturace
	60	30	Annealing
	72	180	Extense
1	4	trvale	-

Tab. č. 2: Průběh programu ATRIA-PCR (teplotní profil)

5. Po skončení amplifikační reakce byla zkumavka vyjmuta z termocykléru a uchována do dalšího užití v chladničce při teplotě 4 °C.
6. Ověření amplifikace bylo provedeno elektroforézou 3 µl směsi PCR produktu s 5 µl nanášecího pufru s kresolčervení v agarózovém gelu převrstveném 0,5× koncentrovaným TBE pufrem.
7. Ke zbývajícimu objemu PCR produktu byly přidány 3 µl „PCR clean-up“ roztoku ze soupravy AlleleSEQR (obsahuje alkalickou fosfatázu k odstranění nespotřebovaných dNTPs a exonukleázu 1 k odstranění nespotřebovaných primerů). Mikrozkumavka byla uzavřena.
8. Mikrozkumavka byla protřepána a krátkodobě centrifugována (76 G, 20-30 sekund, 20 °C).
9. Mikrozkumavka byla dále vložena a následně inkubována v termocykléru při programu EXOSAP (Tab. č. 3).

Počet cyklů	Teplota (°C)	délka trvání cyklu (minuty)	Proces
1	37	30	Aktivace enzymů
1	80	15	Denaturace enzymů
1	4	trvale	-

Tab. č. 3: Průběh programu ExoSAP (teplotní profil)

10. Po doběhnutí programu byla mikrozkumavka vyjmuta z termocykléru a přečištěný PCR produkt byl naředěn v poměru 1:1 vodou pro PCR.
11. Do připraveného mikrozkumavkového stripu bylo napipetováno po 8 µl každé originální sekvenační směsi ze soupravy AlleleSEQR CORE (ex2F, ex2R, ex3F, ex3R, ex4F, ex4R). Ke každé ze sekvenačních směsí byly přidány 2 µl přečištěného PCR produktu, strip byl uzavřen pryžovým víčkem.
12. Mikrozkumavkový strip byl krátkodobě centrifugován (76 G, 20-30 sekund, 20 °C).
13. Mikrozkumavkový strip byl následně umístěn do termocykléru a inkubován při programu ATRIASE – sekvenační reakce (Tab. č. 4).

Počet cyklů	Teplota (°C)	délka trvání cyklu (sekundy)	Proces
25	96	20	Denaturace
	50	30	Annealing
	60	120	Extense
1	4	trvale	

Tab. č. 4: Průběh programu ATRIASE (teplotní profil)

14. Mikrozkumavkový strip obsahující sekvenační produkt byl vyjmut z termocykléru, následovalo přečištění sekvenačního produktu precipitací ethanolem. Ke každému sekvenačnímu produktu byly připipetovány 2  $\mu$ l NAOAc/EDTA pufru (součást soupravy). Strip byl opět uzavřen pryžovým víkem.
15. Strip byl dále centrifugován při 500 G po dobu 30 sekund za laboratorní teploty (20 °C).
16. Mikrozkumavkový strip byl následovně vyjmut z centrifugy a ke každému ze sekvenačních produktů bylo napipetováno 25  $\mu$ l absolutního ethanolu. Mikrozkumavkový strip byl uzavřen pryžovým víkem.
17. Celý mikrozkumavkový strip byl krátkodobě vortexován a následovně centrifugován při 2000 G po dobu 30 minut za laboratorní teploty (20 °C).
18. Mikrozkumavkový strip byl odzátkován a překryt buničinou. Následovně byl vložen do centrifugy dnem vzhůru a centrifugován při 76 G po dobu 20 sekund při laboratorní teplotě (20 °C).
19. Absolutní ethanol byl naředěn na koncentraci 80 %.
20. Mikrozkumavkový strip byl vyjmut z centrifugy. Ke každému ze sekvenačních produktů bylo přidáno 50  $\mu$ l 80% ethanolu. Mikrozkumavkový strip byl uzavřen pryžovým víkem.
21. Mikrozkumavkový strip byl dále centrifugován při 2000 G po dobu 5 minut při laboratorní teplotě (20 °C).
22. Mikrozkumavkový strip byl opět odzátkován, překryt buničinou a následovně vložen do centrifugy dnem vzhůru a centrifugován při 76 G po dobu 20 sekund při laboratorní teplotě (20 °C).
23. Ke každému ze sekvenačních produktů bylo připipetováno 15  $\mu$ l deionizovaného formamidu.
24. Mikrozkumavkový strip byl dále centrifugován při 500 G po dobu 30 sekund při laboratorní teplotě (20 °C).



25. Mikrozukumavkový strip byl vložen do termocykléru a inkubován při programu DENAT (Tab. č. 5).

Počet cyklů	Teplota (°C)	délka trvání cyklu (sekundy)	Proces
1	95	120	Denaturace

Tab. č. 5: Průběh programu DENAT (teplotní profil)

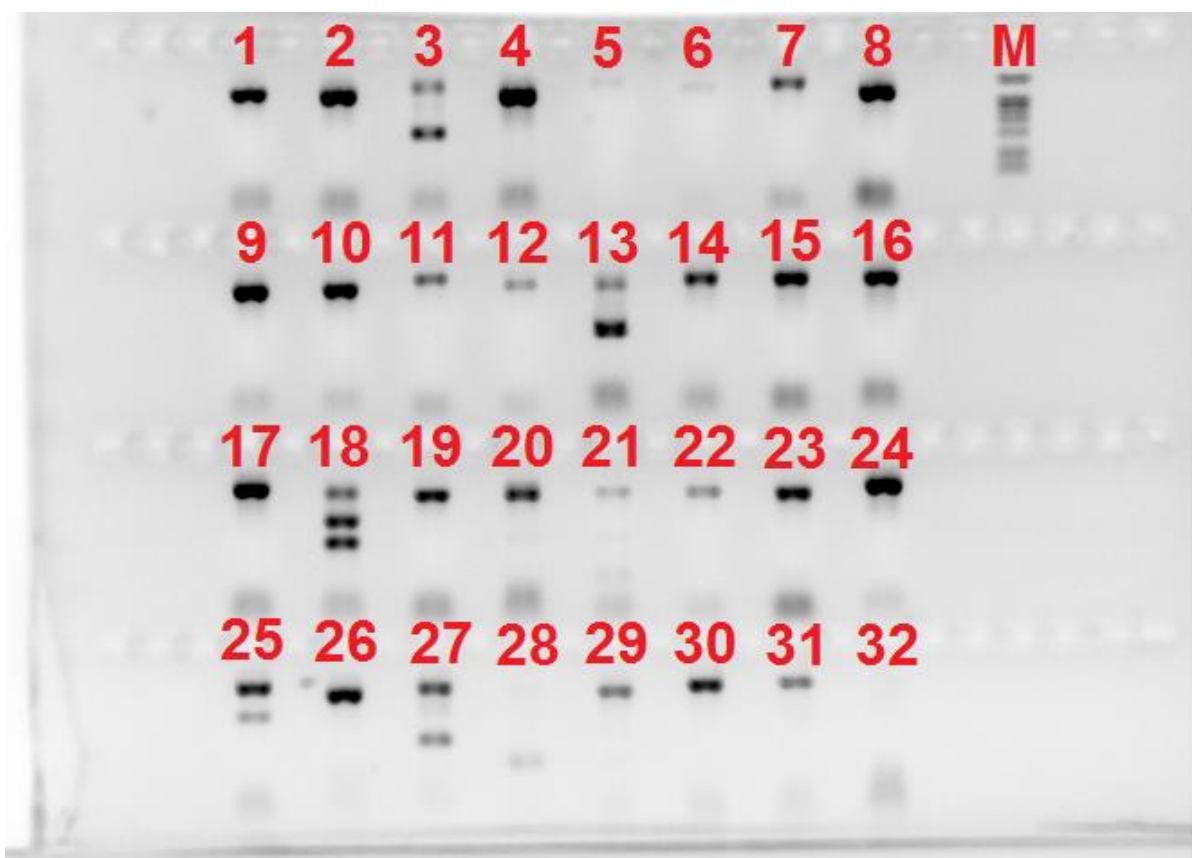
26. Po ochlazení na 4°C byl mikrozukumavkový strip vložen do sekvenátoru ABI3500 k provedení sekvenačních elektroforéz. Získané sekvence byly zpracovány pomocí softwaru Assign SBT v471, pomocí kterého byl vyhodnocen HLA genotyp.

## 7 VÝSLEDKY

Demonstrace typizace HLA genotypu byla provedena na vzorku DNA č. 23326 o známém genotypu (vzorek externí kontroly kvality) izolované z jaderných buněk periferní krve člověka. Podle pracovních postupů k jednotlivým soupravám a v souladu se standardními operačními postupy Ústavu imunologie ve Fakultní nemocnici Olomouc byly provedeny HLA typizace na úrovni nízkého rozlišení metodou PCR-SSP a na úrovni vysokého rozlišení pomocí automatického sekvenování.

### 7.1 PCR-SSP

K interpretaci metody PCR-SSP slouží obraz agarózového gelu po ukončení elektroforézy, který obsahuje DNA fragmenty získané amplifikací se specifickými a kontrolními primery. PCR produkty označené ethidium bromidem byly následně detekovány pomocí transluminátoru s vestaveným snímacím zařízením (Obr. č. 15).



Obr. č. 15: Amplifikace vzorku DNA s využitím specifických a kontrolních primerů. 1 až 31 – PCR produkty jednotlivých reakcí, 32 – negativní kontrola, M – PCR marker relativní molekulové hmotnosti.

Vizualizace PCR produktů odhalila 5 pozitivních reakcí, 23 negativních reakcí a 3 nevalidní reakce. Negativní reakce bylo možné indikovat podle přítomnosti jediného kontrolního PCR produktu o velikosti 800 či 1070 bp. K amplifikaci pomocí specifických i kontrolních primerů indikujících pozitivní reakci došlo u směsí primerů 3, 13, 18, 25 a 27. S využitím tabulky specifity přiložené k HLA-A typizační soupravě bylo možné zjistit, pro které alely jsou primery obsažené ve směsích primerů specifické (Tab. č. 6).

Směs primerů	HLA-A sérologie	Amplifikované HLA-A alely
3	A3, A32/A3, A36	*03:01:01:01-03:01:29, 03:01:31-03:01:34, 03:01:36-03:01:47, 03:01:51-03:04:03, 03:06- 03:09, 03:11N-03:17:02, 03:19-03:39, 03:41, 03:43-03:74, 03:76-03:94, 03:96-03:97, 03:99- 03:104, 03:106-03:121, 03:123:01-03:134, 03:136-03:166, 03:168N-03:176, 03:178N-03:186, 03:188-03:203, 03:205-03:207, 03:209-03:214, 03:216-03:219, 03:221, 11:130, 30:89, 32:04, 36:02
13	A1, A2, A3, A10, A25, A26, A34, A43, A66	*01:01:56w, 01:13, 02:34-02:35:03, 02:56:01- 02:56:02, 02:62, 02:103, 02:135, 03:01:01:01- 03:01:22, 03:01:24-03:07, 03:09-03:11N, 03:13- 03:31, 03:33-03:35, 03:37-03:40, 03:42-03:56, 03:58, 03:60-03:71, 03:73-03:87, 03:90-03:106, 03:109-03:110, 03:112-03:141, 03:143-03:151, 03:153-03:171, 03:174-03:175, 03:177, 03:179- 03:197N, 03:200Q-03:202, 03:204, 03:206- 03:210, 03:212-03:218, 03:221, 11:199:01, 25:01:01-25:01:08, 25:02-25:05, 25:07-25:31, 26:01:01:01-26:01:20, 26:01:22-26:01:38, 26:02:01w-26:02:02w, 26:03:01, 26:05-26:08, 26:10-26:28, 26:29w, 26:30-26:33, 26:35-26:43:02, 26:45-26:48, 26:49w, 26:50-26:72, 26:74-26:77, 26:79-26:90, 26:92-26:111, 30:55, 34:08, 43:01, 66:01:01, 66:01:03, 66:04-66:09, 66:10w, 66:11- 66:15, 66:17-66:20, 66:22, 68:71, 74:13
18	A32, A33, A68, A74	*02:243:01-02:243:02, 29:48, 32:15, 33:01:01- 33:01:07, 33:03:01-33:37, 33:39-33:52, 33:54- 33:97, 68:29, 74:04, 74:21
25	A1, A29, A30, A31, A32, A33, A74	*29:01:01:01-29:29, 29:31-29:78N, 30:01:01- 30:01:07, 30:01:09-30:04:02, 30:06-30:11:02, 30:13-30:17, 30:19-30:20, 30:22-30:30, 30:32- 30:40, 30:42-30:54, 30:56-30:59N, 30:61-30:94, 31:01:02:01-31:08, 31:10-31:27, 31:29-31:94, 32:01:01-32:03, 32:05-32:23, 32:25-32:48N, 32:50-32:72, 33:01:01-33:01:07, 33:03:01-33:37, 33:39-33:97, 74:01-74:24
27	A1, A3, A11, A30, A31, A32, A34	*01:12, 01:19, 01:21, 01:126, 02:156, 02:338, 03:01:01:01-03:01:05, 03:01:07-03:01:13, 03:01:15-03:01:46, 30:09, 30:17, 30:29, 30:46, 30:77, 30:89-30:90, 31:03-31:04, 32:04, 33:49, 34:02:01-34:04, 34:07-34:10N, 68:103:01-68:103:02, 74:2303:01:48, 03:01:50-03:01:51, 03:01:53-03:17:02, 03:19-03:49, 03:51-03:53, 03:55-03:63, 03:65, 03:67-03:74, 03:76-03:94, 03:96-03:126, 03:128-03:134, 03:136-03:139, 03:141-03:152, 03:154-03:164, 03:166-03:176, 03:178N-03:186, 03:188-03:199, 03:201-03:203, 03:205-03:214, 03:216-03:219, 03:221, 11:03, 11:20, 11:25, 11:31, 11:35, 11:60, 11:158, 11:175, 11:183, 11:209, 24:92, 30:04:01-30:04:02, 30:06,

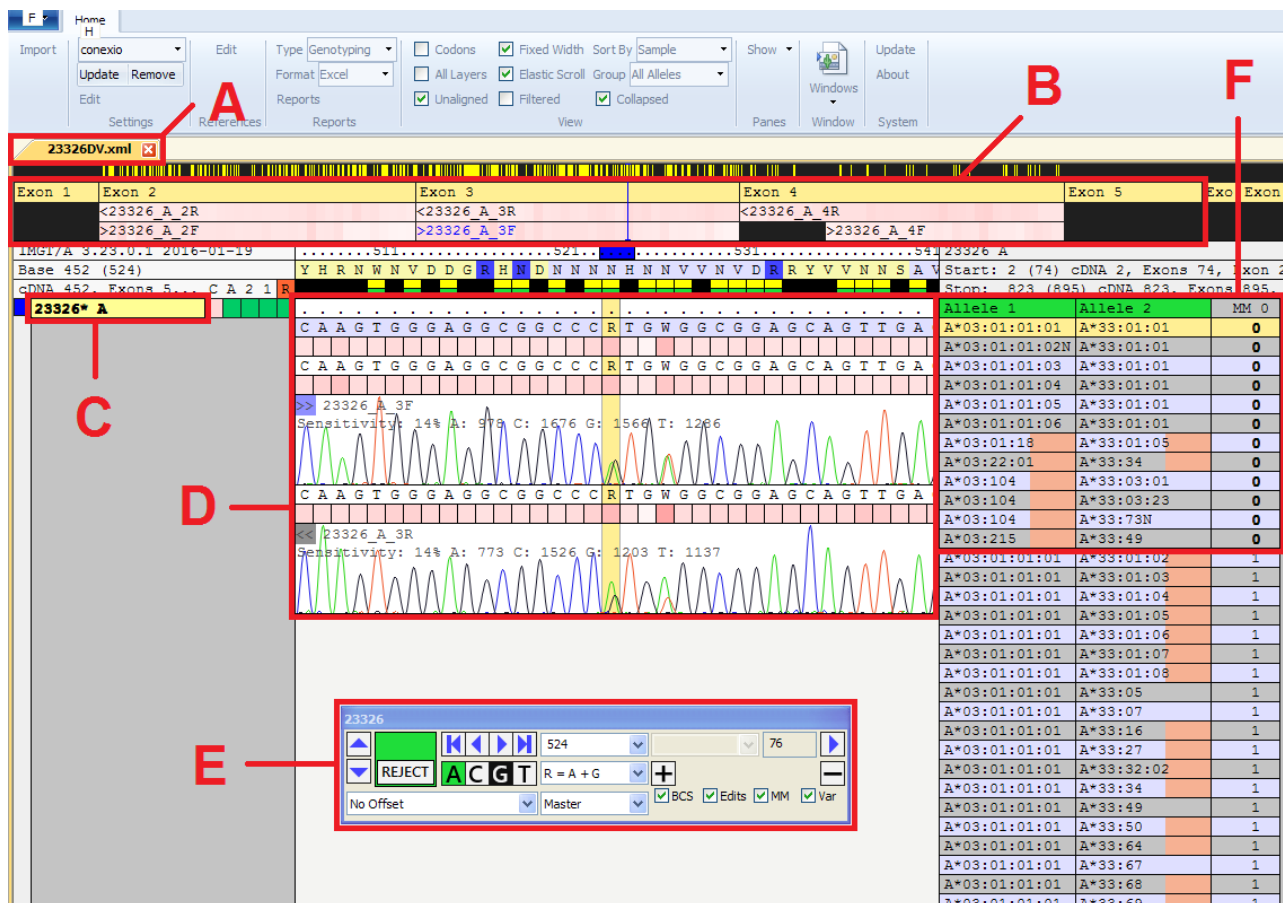
Tab. č. 6: Tabulka specifity pozitivních reakcí HLA-A typizace metodou PCR-SSP

Informace o pozitivní amplifikaci v typizačních reakčních směsích 3, 13, 18, 25 a 27 společně s informací o negativitě reakcí 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 29, 30 a 31 byly zpracovány pomocí softwaru SCORE 5.00.72.17 T. Reakce 5, 6 a 28 se

po vizualizaci nejevily přijatelně výrazné, při vyhodnocení se tedy považovaly za nevalidní (nejsou využity pro interpretaci výsledku, uvažujeme pozitivní i negativní výsledek reakce). Softwarovou analýzou byl určen genotyp vzorku 23326 pro gen HLA-A na úrovni nízkého rozlišení jako HLA-A\*03,\*33. Nevalidní reakce nebyly v tomto případě pro výsledek nezbytné. Reakce č. 32 (negativní kontrola) zůstala bez detekovatelného PCR produktu, což potvrzuje validitu výsledků.

## **7.2 Automatické sekvenování**

Výstupem metody SBT je šestice záznamů z kapilárních elektroforéz sekvenačních produktů, vždy po dvou (dopředná a zpětná sekvence) pro každý ze tří testovaných exonů HLA-A genu (exony 2-4). Tyto záznamy (elektroferogramy) byly analyzovány pomocí programu Assign SBT v471, který dovolil převedení signálů fluorescenčních značek dideoxynukleotidů navázaných na 3' koncích jednotlivých sekvenačních fragmentů na nukleotidovou sekvenci. Pro zvýšení přesnosti sekvenace byly provedeny dvě sekvenační reakce a elektroforézy pro každý exon (dopředná sekvence z jednoho DNA vlákna a zpětná sekvence z komplementárního vlákna), které jsou při interpretaci kompilovány.



Obr. č. 16: Interface programu Assign v471. A – záložka sekvenování, B – schéma kódující oblasti analyzovaného genu (exony 2-3), C – číslo vzorku a název genu, D – záznam fluorescenčních signálů (barevné kódování – A-zeleně, T-červeně, C-modře, G-černě), E – detail zvolené pozice v genu, F – možné kombinace alel genu na základě vyhodnocení sekvence.

Po kontrole výstupu sekvenační elektroforézy testovaného vzorku č. 23326 byla zjištěna následující sekvence nukleotidů:

```
GCTCCCACTCCATGAGGTATTTTCWYCACATCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGC
TTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAG
CCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGACCRGR
ASACACGGAATGTGAAGGCCASTCACAGAYTGACCGAGTGGACCTGGGGACCCTGCGCGGC
TACTACAACCAGAGCGAGGCCGGTTCTCACACCATCCAGATRATGTATGGCTGCGACGTGGG
GTCGGACGGGCGCTTCCTCCGCGGGTACCRGCAGGACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCG
CCYTGAACGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGGGCGGACATGGCGGCTCAGATCACCMAGCGC
AAGTGGGAGGCGGCCRTGWGGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGAKGGCACGTGCGTGGA
GTGGCTCCGCAGAYACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACCCCCCARGA
CRCATATGACYCACACSCYRTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGRGC
TTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCAGGACAC
GGAGCTCGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGKCTGTGGTGG
TGCCTTCTGGASAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTCTSCCCAAGCCC
CTCACCCCTGAGATGGG
```

Jedná se o kombinovanou nukleotidovou sekvenci druhého, třetího a čtvrtého exonu genu HLA-A z obou chromozomů vyšetřovaného jedince. Písmena A, T, C a G korespondují s odpovídajícími bázemi – adeninem, thyminem, cytosinem a guaninem. Pokud se báze na určité pozici mezi sekvencemi z obou chromozomů liší (heterozygotní pozice), jsou označeny písmeny R (G + A), Y (T + C), K (G + T), M (A + C), S (C + G) nebo W (A + T).

Porovnáním této sekvence s referenční databází HLA alel IMGT/A 3.23.0.1 (19. 1. 2016) bylo zjištěno, že se s největší pravděpodobností jedná o kombinaci alel HLA-A\*03:01:01 a HLA-A\*33:01:01. Alternativně se může jednat o kombinaci některých ze vzácnějších HLA alel HLA-A\*03:01:16, 33:01:05; \*03:22:01, 33:34; \*03:104, 33:03:01; \*03:104, 33:03:23; \*03:104, 33:73N nebo \*03:215, 33:49 (Obr. č. 16). Pravděpodobnost, že se jedná o jednu z těchto vzácných kombinací alel, je sice velice malá, ovšem i tyto vzácné možnosti musí být vyloučeny doplňkovým vyšetřením (např. subtypizace alel A\*03 nebo A\*33 metodou PCR-SSP). Výsledek HLA-A typizace na úrovni vysokého rozlišení (HLA-A\*03:01,\*33:01) je zcela v souladu s dříve uvedeným výsledkem typizace téhož vzorku na úrovni nízkého rozlišení (HLA-A\*03,\*33).

## 8 DISKUZE

Prvním z cílů praktické části bakalářské práce bylo určení genotypu pro gen HLA-A anonymizovaného vzorku lidské DNA č. 23326 na úrovni nízkého a vysokého rozlišení využitím standardních typizačních metod. Při porovnání výsledků získaných z užitých typizačních metod lze snadno konstatovat, že metoda PCR-SSP poskytuje výrazně méně informací o genotypu vyšetřovaného jedince. Tento fakt je ještě zdůrazněn tím, že s každou nevalidní reakcí se může dále snížit rozlišení metody – v našem případě byly takové reakce tři. Rozlišení metody PCR-SSP lze však podstatně zvýšit provedením tzv. „subtypizace“ alelických skupin zjištěných na úrovni nízkého rozlišení (zde A\*03 a A\*33), kdy je třeba užít sadu speciálních primerů. Tento přístup bude také sdílet nevýhody typizace na úrovni nízkého rozlišení (klesající rozlišení s každou nevalidní reakcí). Velkou výhodou tohoto přístupu je ovšem jeho velice jednoduché provedení a malá časová náročnost. Ve většině případů není možné ani pomocí PCR-SSP subtypizace dosáhnout v současné době úrovně vysokého rozlišení, což je dáno enormně rychlým růstem známého polymorfismu HLA systému.

Typizace s využitím automatického sekvenování dokázala počet možných genotypů HLA-A genu zredukovat na 12 možných kombinací alel, z nichž většina kóduje identický HLA-A protein (varianty kombinace běžných alel HLA-A\*03:01 a HLA-A\*33:01). V porovnání s metodou PCR-SSP je rozlišení výrazně vyšší, přesto polymorfismy v oblastech intronů většinou nedovolují jednoznačné určení kombinace alel vyšetřovaného jedince. Tyto polymorfismy však ve většině případů nemají klinický význam, s výjimkou nulových alel, které se musejí před vydáním výsledku vyloučit. Metoda se rovněž vyznačuje vyšší časovou náročností a je citlivější na přesnost provedení.

V celkové strategii vyšetření genotypu HLA genů na úrovni vysokého rozlišení HLA laboratoř Ústavu imunologie ve Fakultní nemocnici Olomouc však užívá oba tyto přístupy v kombinaci. Jako první je použita technika SBT s využitím typizačních souprav např. od firmy GenDx či Innotrain pro lokusy HLA-A, B, C, DRB1, DQB1. Výsledek je vyhodnocen a podle jeho charakteru se postupuje následovně: Pokud je výsledek z SBT typizace pro konkrétní lokus jednoznačný a odpovídá definici vysokého rozlišení podle standardů EFI (nejsou obsaženy nesynonymní nejednoznačnosti z exonů 2 a 3 pro lokusy HLA-A/B/C, nejednoznačnosti z exonu 2 pro lokusy HLA-DRB1/DQB1 a nejednoznačnosti s nulovou alelou), který zahrnuje dvě alely, lze ho uvolnit. V případě, že výsledek SBT na konkrétním lokusu odpovídá jedné alele (nebo kombinaci alel identických ve vyšetřované

oblasti), je provedeno potvrzení metodou PCR-SSP a tím i vyloučení nerozpoznání druhé alely při SBT. Pokud obsahuje výsledek SBT více možností (nejednoznačností), jsou provedena dodatečná vyšetření technikou PCR-SSP pro vybrané alelické skupiny na úrovni vysokého rozlišení. Finálním výsledkem je průnik výsledků možných kombinací z technik PCR-SSP a SBT, při čemž vyloučení každé kombinace musí být jednoznačné.

Výběr dodatečných vyšetření je prováděn tak, aby výsledkem byla jediná kombinace alel na úrovni vysokého rozlišení nebo případné nejednoznačnosti byly obsaženy mimo oblasti exonu 2 a 3 pro HLA-A/B/C a exonu 2 pro HLA-DRB1/DQB1 a aby neovlivňovaly expresi genu (nulové alely). Pokud výsledky techniky SBT nedosahují dostatečné úrovně, či jsou zcela nepoužitelné, lze užít alternativně techniku PCR-SSP na úrovni nízkého rozlišení následovanou subtypizací za užití téže techniky. Všechny nejednoznačnosti ve výsledku HLA typizace, které mohou podmiňovat rozdíl ve struktuře nebo expresi HLA proteinu, jsou vydávány indikujícímu lékaři, alternativně je na jejich existenci upozorněno ve výsledkovém protokolu.



## 9 KAZUISTIKA

### 9.1 Somatická mutace HLA-B genu

Pacient ve věku 57 let, trpící akutní myeloidní leukémií, byl indikován k HLA typizaci pro hledání vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk. Jediný dostupný příbuzný byl jeho bratr. Předběžná typizace na úrovni nízkého rozlišení tohoto pacienta i jeho bratra byla provedena v externí laboratoři a poukazovala na 100% shodu HLA znaků mezi těmito sourozenci na úrovni nízkého rozlišení. Problém nastal při typizaci pacienta a jeho bratra s využitím sérologických metod, specificky u genu HLA-B. Zatímco výsledek typizace pacientova bratra odpovídal typizaci z externí laboratoře HLA-B8, 35, pacient samotný se jevil jako homozygot pro antigen HLA-B35. Absence znaku HLA-B8 v sérotypu pacienta byla objasněna provedením typizace na úrovni vysokého rozlišení s využitím metody SBT, kde byla zjištěna abnormalita ve 4. exonu genu HLA-B. Touto anomálií byla inserce dvou nukleotidů, což vedlo k posunutí čtecího rámce, vzniku stop kodonu a ztrátě exprese znaku. Vysvětlení této zvláštní situace bylo získáno provedením dodatečné typizace na úrovni vysokého rozlišení metodou SBT, tentokrát byl ovšem analyzován vzorek DNA pocházející z bukální sliznice pacienta. V tomto případě byl výstupem vyšetření genotyp HLA-B\*08:01, \*35:02 bez jakéhokoliv náznaku mutace, která byla přítomná v buňkách krevního vzorku.

V tomto případě bylo zřejmé, že inserční mutace genu HLA-B byla zastoupena výlučně v krevním vzorku s převahou nádorových buněk a ve zdravé tkáni se nevyskytovala. S nejvyšší pravděpodobností se jednalo o somatickou mutaci v nádorových buňkách, která přinesla těmto buňkám selekční výhodu ztrátou exprese HLA antigenu B8. Takovéto mutace v nádorových buňkách mohou ovlivňovat rutinní HLA typizaci a musí se brát v úvahu, především pak u pacientů trpících hematologickými malignitami. Riziko typizační chyby v důsledku somatických mutací však lze omezit prováděním rodinných studií, zjištěním informací o parametrech vzorku, HLA typizací z alternativního biologického materiálu nebo strategií verifikační typizace.

## 9.2 Detekce vzácné alely bez exprese HLA-B\*51:11N

V druhém případě šlo o 29letého pacienta hospitalizovaného opět s akutní myeloidní leukémií, jehož jediným dostupným příbuzným byla jeho matka. První byla provedena předběžná analýza na úrovni nízkého rozlišení s využitím sérologických metod. Výsledek byl poněkud překvapivý – v genu HLA-B se jevil syn jako homozygotní pro antigen HLA-B7, ovšem matka se jevila jako homozygotní pro HLA-B13. Pokud by se u obou testovaných jedinců tato HLA výbava potvrdila (rozdílný homozygotní status pro daný gen), znamenalo by to, že se nejedná o matku a dítě. Situace se vysvětlila provedením HLA typizace na úrovni vysokého rozlišení metodou SBT u pacienta a jeho matky (u matky byla provedena pouze analýza genu HLA-B). Takto byl určen genotyp pacienta pro sporný gen jako HLA-B\*07:02,\*51:11N a genotyp matky pro tentýž gen HLA-B\*13, 51:11N. Přítomnost vzácné nulové alely HLA-B\*51:11N bylo potvrzena subtypizací metodou PCR-SSP.

Tento výsledek vysvětluje zajímavou situaci vzniklou při sérologické typizaci – syn zdědil od matky vzácnou nulovou alelu HLA-B\*51:11N, která se neprojevuje expresí HLA-B51 znaku v sérotypu (nelze ji sérologicky detekovat), a od otce alelu HLA-B\*07:02. V tomto případě tedy není alela HLA-B\*51:11N produktem somatické mutace. Zajímavostí je i to, že se tato alela vyskytuje velice vzácně a k jejímu prvnímu pozorování došlo před 15 lety ve stejné typizační laboratoři (Ústav imunologie FN Olomouc).

## 10 ZÁVĚR

V teoretické části této práce jsem popsal strukturu, fyziologii a způsob prezentace antigenů MHC molekul I. a II. třídy. Dále jsem se věnoval klíčovým charakteristikám MHC systému, které podmiňují jeho nepostradatelné uplatnění při reakci proti různorodým nebezpečným molekulám a organismům, jeho význam v medicínských disciplínách a komplexní systém nomenklatury. Rovněž jsem přiblížil principy běžně užívaných metod typizace MHC genů se zaměřením na molekulárně genetické techniky.

V experimentální části práce jsem provedl typizaci zvoleného genu MHC I. třídy HLA-A metodami PCR-SSP a automatickým sekvenováním. Využitím obou metod jsem došel k závěru, že genotyp testovaného vzorku 23326 je HLA-A\*03:01:01, \*33:01:01. Dále jsem rozvedl využití obou metod pro strategii vyšetření genotypu HLA genů na úrovni vysokého rozlišení. V poslední části jsem popsal dva zajímavé příklady nestandardních výsledků HLA typizace pacientů indikovaných k vyhledávání dárce pro transplantaci krvetvorných kmenových buněk.

## SEZNAM UŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

APC	antigen prezentující buňka
$\beta_2m$	mikroglobulin $\beta_2$
CD1	cluster of differentiation 1
CD4	cluster of differentiation 4
CD8	cluster of differentiation 8
CLIP	class II associated invariant chain peptide
dNTPs	deoxyribonukleosidtrifosfáty
ddNTPs	dideoxyribonukleosidtrifosfáty
EFI	European Federation for Immunogenetics
GVL	graft versus leukemia
GVHD	graft versus host disease
HLA	human leukocyte antigens
Ii	invariabilní řetězec
INF	interferon
KIR	killer immunoglobulin-like receptors
LMP2	podjednotka proteazomu
LMP7	podjednotka proteazomu
MHC	major histocompatibility complex
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
MiHA	minor histocompatibility antigens
MIIC	MHC class II compartment
NGS	new (next) generation sequencing
NK	natural killer
PCR	polymerase chain reaction
PCR-SSP	polymerase chain reaction with sequence specific primers
PCR-SSOP	polymerase chain reaction with sequence specific oligoprobes
SBT	sequencing based typing
TAP	transporters associated with antigen processing
TNF	tumor necrosis factor
WHO	World Health Organization

## 11 LITERATURA

- Arber W., Linn S.:** DNA Modification and Restriction. Annual review of biochemistry. 1969. 38: 467-500.
- Buckingham S. D.:** Bench philosophy: Next generation sequencing software. Labtimes [online]. 01/2010.
- Casamitjana N., Faner R., Santamaria A., Colobran R., Ribera A., Pujol-Borrell R., Juan M., Palou E.:** Development of a new HLA-DRB real-time PCR typing method. Human Immunology. 2005. 66(1): 85-91.
- Cresswell P., Ackerman A. L., Giodini A., Peaper D. R., Wearsch P. A.:** Mechanism of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. Immunological Reviews. 2005. 207(1): 145-157.
- Dellabona P., Peccoud J., Kappler J., Marrack P., Benoist C., Mathis D.:** Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. Cell. 1990. 62(6): 1115-1121.
- Doherty P. C., Zinkernagel R. M.:** Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. Nature. 1975. 256: 50-52.
- Driscoll J., Brown. M. G., Finley D., Monaco J.J.:** MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. Nature. 1993. 365: 262-264.
- EMBL-EBI** [online]. Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire. 1998. [cit. 10. 3. 2017]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>
- European Federation for Immunogenetics:** Standards for histocompatibility & immunogenetics testing. 2015. Verze 6.3.
- Fremont D. H., Matsumura M., Stura E. A., Peterson P. A. Wilson I. A.:** Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. Science. 1992. 257: 919-27.
- Hořejší V., Bartůňková J., Brdlička T., Špíšek R.:** Základy imunologie. TRITON, Praha 2013. 5. vydání ISBN 978-80-7387-713-2.

- Imanishi J.:** Interferon-alpha, beta, gamma. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1994. 21(16): 2853-2858.
- IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®** [online]. 1995-2017. [cit. 12. 4. 2017]. Dostupné z [http://www.imgt.org/IMGTrepertoireMHC/LocusGenes/exon-intron/human/MHC/Hu\\_superfamily.html](http://www.imgt.org/IMGTrepertoireMHC/LocusGenes/exon-intron/human/MHC/Hu_superfamily.html)
- Itoh Y., Mizuki N., Shimada T., Azuma F., Itakura M., Kashiwase K., Kikkawa E., Kulski J. K., Satake M., Inoko H.:** High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics*. 2005. 57(10): 717-729.
- Janeway C. A. Jr, Travers P., Walport M., Shlomchik M. J.:** *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science. 2001. 5. vydání ISBN-10: 0-8153-3642-X.
- Jindra P.:** Praktický pohled na význam HLA shody pro transplantaci krvetvorných buněk od dospělých nepříbuzných jedinců. *Transfuze a hematologie dnes*. 2013. 19: 70-75.
- Klein J., O’Huigin C.:** MHC polymorphism and parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994. 346(1317): 351-357.
- Kropshofer H., Hämmerling G. J., Vogt A. B.:** The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunological Reviews*. 1999. 172(1): 267-278.
- Larhammar D., Hyldig-Nielsen J. J., Serenius B., Andersson G., Rask L., Peterson P. A.:** Exon-intron organization and complete nucleotide sequence of a human major histocompatibility antigen DCβ gene. *PNAS*. 1983. 80: 7313-7317.
- Lee S. J., Klein J., Haagenson M., Baxter-Lowe L. A., Confer D., Eapen M., Fernandez-Vina M., Flomenberg N., Horowitz M., Hurley C. K., Noreen H., Oudshoorn M., Petersdorf E., Setterholm M., Spellman S., Weisdorf D., Williams T. M., Anasetti C.:** High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007. 110: 4576-4583.

- Malissen M., Malissen B., Jordan B. R.:** Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. PNAS. 1982. 79(3): 893-897.
- Mamedov A. E., Ponomarenko N. A., Belogurov A. A. Jr, Gabibov A. G.:** Heterodimer HLA-DM Fused with Constant Fragment of the Heavy Chain of the Human Immunoglobulin Accelerates Influenza Hemagglutinin HA306-318 Loading to HLA-DR1. Bull Exp Biol Med. 2016. 161(1): 92-95.
- Marsh S. G. E., Albert E. D., Bodmer W. F., Bontrop R. E., Dupont B., Erlich H. A., Fernández-Viña M., Geraghty D. E., Holdsworth R., Hurley C. K., Lau. M., Lee K. W., Mach B., Maiers M., Mayr W. R., Müller C. R., Parham P., Petersdorf E. W., Sasazuki T., Strominger J. L., Svejgaard A., Terasaki P. I., Tiercy J. M., Trowsdale J.:** Nomenclature for factors of the HLA systém. Tissue Antigens. 2010. 75: 291-296.
- McCluskey J., Rossjohn J., Purcell A. W.:** TAP genes and immunity. Curr Opin Immunol. 2004. 16(5): 651-659.
- Mehra N. K., Kaur G.:** Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. Expert Reviews in Molecular medicine. 2003. Volume 5.
- Moretta L., Moretta A.:** Killer immunoglobulin-like receptors. Curr Opin Immunol. 2004. 16(5): 626-633.
- Morrison L. A., Lukacher A. E., Braciale V. L., Fan D. P., Braciale T. J.:** Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II- restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. JEM. 1986. 163: 903-921.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.:** Apecific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986. 51: 263-273.
- Murphy K. M.:** Janeway's Immunobiology. Garland Science, 2012. 8. Vydání. ISBN 978-0815342434.
- Neefjes J., Jongsma M. L. M., Paul P., Bakke O.:** Towards a systems understanding of HMC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Immunology. 2011. 11: 823-836.

- Neefjes J., Ovaa H.:** A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. *Nature Chemical Biology*. 2013. 9: 769-775.
- Olerup O., Zetterquist H.:** HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practise including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *HLA Immune Response Genetics*. 1992. 39(5): 225-235.
- Rudensky A. Y., Preston-Hurlburt P., Hong S., Barlow A., Janeway C. A. Jr.:** Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*. 1991. 353: 622-7.
- Sanger F., Nicklen S. a Coulson A. R.:** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS*. 1977. 74: 5463-5467.
- Smith L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Hughes P., Dodd C., Connell C. R., Heiner C., Kent S. B., Kent S. B., Hood L. E.:** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986. 321: 674-679.
- Snell G. D.:** Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* 1948. 49: 87-108.
- Stites D. P., Terr A. I.:** Základní a klinická imunologie. Victoria Publishing, 1994. ISBN 80-85605-37-6.
- Van der Linden S. M., Valkenburg H. A., de Jongh B. M., Cats A.:** The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis and Rheumatism*. 1984. 27(3): 241-249.
- Takahata N.:** MHC diversity and selection. *Immunological Reviews*. 1995. 143: 225-247.
- Yewdell J. W., Neefjes E. R., Neefjes J.:** Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 2003. 3: 952-961.
- Zinkernagel R. M.:** The discovery of MHC restriction. *Immunology today*. 1997. 18: 14-17.
- Zinkernagel R. M., Doherty P. C.:** H-2 compatability requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for H-2K or H-2D. *JEM*. 1975. 141(6): 1427-1436.