Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Molekulární metody typizace HLA alel

Bakalářská práce

2021 Andrea Vodáková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Andrea Vodáková**
Osobní číslo:	**C18194**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Klinická biologie a chemie**
Téma práce:	**Molekulární metody typizace HLA alel**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Prostudujte a popište systém HLA antigenů a jejich úlohu v organismu, jakou roli hrají v medicíně.

2. Vypracujte přehled využívaných metod, které jsou využívány k typizaci HLA.

3. Prostudujte a popište současné možnosti a překážky ve využívání metody NGS pro HLA typizaci.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Profaizer, T., Lázár-Molnár, E., Close, D. W., Delgado, J. C., & Kumánovics, A. (2016). HLA genotyping in the clinical laboratory: Comparison of next-generation sequencing methods. HLA, 88(1-2), 14-24. https://doi.org/10.1111/tan.12850

Liu, C., Duffy, B. F., Weimer, E. T., Montgomery, M. C., Jennemann, J. E., Hill, R., Phelan, D., Lay, L., & Parikh, B. A. (2020). Performance of a multiplexed ampliconbased next-generation sequencing assay for HLA typing. PLoS ONE, 15(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232050

Liu, C. (2020). A long road/read to rapid high-resolution HLA typing: The nanopore perspective. Human Immunology. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.04.009

Profaizer, T., & Kumánovics, A. (2018). Human Leukocyte Antigen Typing by Next-Generation Sequencing. In Clinics in Laboratory Medicine (Vol. 38, Issue 4, pp. 565-578). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.07.006

Osoegawa, K., Vayntrub, T. A., Wenda, S., De Santis, D., Barsakis, K., Ivanova, M., Hsu, S., Barone, J., Holdsworth, R., Diviney, M., Askar, M., Willis, A., Railton, D., Laflin, S., Gendzekhadze, K., Oki, A., Sacchi, N., Mazzocco, M., Andreani, M., ? Fernandez-Vi?a, M. A. (2019). Quality control project of NGS HLA genotyping for the 17th International HLA and Immunogenetics Workshop. Human Immunology, 80(4), 228-236. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.01.009

Databáze: IMGT/HLA (http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/nomenclature/), The HLA Adverse Drug Reaction Database (http://www.allelefrequencies.net/hla-adr/default.asp), PharmGKB (https://www.pharmgkb.org)

Vedoucí bakalářské práce: **PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.**
Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Molekulární metody typizace HLA alel jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 06. 2021

Andrea Vodáková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto upřímně poděkovat vedoucímu bakalářské práce, panu PharmDr. Antonínu Librovi, Ph.D., za ochotu, připomínky, trpělivost, vedení a pomoc při tvorbě tohoto díla.

ANOTACE

Práce je věnována hlavnímu histokompatibilnímu komplexu člověka a jeho metodám pro typizaci. V úvodu práce je stručně popsána charakteristika HLA systému, jeho úloha v organismu a rozdělení HLA antigenů do jednotlivých tříd. Další část je věnována metodám typizace, od nejstarších sérologických metod, po novější genetické metody, např. PCR. Poslední úsek práce se zabývá sekvenováním nové generace (NGS) a budoucím vývojem technologií pro typizaci HLA systému.

KLÍČOVÁ SLOVA

HLA systém, metody, typizace, PCR, NGS

TITLE

Molecular Methods for HLA Typing

ANNOTATION

The work is devoted to the main histocompatible human complex and its methods for typing. The introduction briefly describes the characteristics of the HLA system, its role in the body and the division of HLA antigens into individual classes. The next part is devoted to typing methods, from the oldest serological methods to the newer genetic methods, such as PCR. The last part of the thesis deals with next generation sequencing (NGS) and future development of technologies for HLA system typing.

KEYWORDS

HLA system, methods, typing, PCR, NGS

OBSAH

ÚVOD 13
1 Systém HLA 14
1.1 Stručná historie 14
1.2 Definice HLA systému 15
1.3 Nomenklatura 16
1.4 Úloha HLA v organismu 17
1.5 Lokalizace a rozdělení struktur HLA 18
1.5.1 Molekuly a geny HLA I. třídy 18
1.5.2 Molekuly a geny HLA II. třídy 19
1.5.3 Molekuly a geny HLA III. třídy 20
1.5.4 Dědičnost HLA 20
1.6 Role HLA v medicíně 21
1.6.1 Imunogenetika 21
1.6.2 Systémová biologie 21
1.6.3 Farmakogenetika 22
1.7 Onemocnění spojené s HLA 22
2 Metody využívané k typizaci HLA 24
2.1 Sérologické metody 24
2.1.1 Lymfocytotoxický test 25
2.1.2 MLC 25
2.2 Molekulární metody 26
2.2.1 CML 26
2.3 Biochemické metody 27
2.3.1 1D-isoelectric focusing 27
2.4 Genotypizace (DNA metody) 28
2.4.1 PCR-SSP 28
2.4.2 PCR-SSOP 30
2.4.3 PCR-RFLP 31
2.4.4 SBT 32
2.4.5 Metoda mikročipu 33
2.5 Metoda Luminex 34

3 NGS 36
3.1 Popis 36
3.2 Kontrola kvality IHIW 37
3.3 Používané platformy NGS technologie 38
3.3.1 Přístroj 454 GenomeSequencer FLX 38
3.3.2 Genomový Analyzér Illumina (Solexa) 39
3.3.3 ABI SOLiD systém 40
3.3.4 Přístroj HeliScope 41
3.3.5 Ion Torrent 41
3.4 Výhody a překážky ve využívání metody NGS 42
3.5 Perspektiva nanopórů 42
3.5.1 Výhody a nevýhody sekvenování nanopórů 43
3.6 Techniky sekvenování DNA 44
3.7 Budoucí vývoj 46
ZÁVĚR 48
POUŽITÁ LITERATURA 49

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: *Nomenklatura HLA*……17

Obrázek 2: *HLA komplex v chromozomu*……18

Obrázek 3: *Struktura molekuly HLA I. třídy a HLA II. třídy*……19

Obrázek 4: *Princip metody MLR*……..26

Obrázek 5: *Princip metody PCR-SSP*……..29

Obrázek 6: *Princip metody PCR-SSOP*……....31

Obrázek 7: *Princip metody PCR-RFLP*……32

Obrázek 8: *Princip metody SBT*……....33

Obrázek 9: *Princip metody Luminex*……35

Obrázek 10: *Princip metody NGS*……41

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ASHI	American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (Americká společnost pro histokompatibilitu a imunogenetiku)
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (štěpené amplifikované polymorfní sekvence)
CCD kamera	Charge-coupled device (zařízení s vázanými náboji)
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
CML	Cell-mediated lympholysis (test buněčně zprostředkované lymfolýzy)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EcoRI	Enzym restrikční endonukleázy izolovaný z druhu Escherichia coli
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer (fluorescenční rezonanční přenos energie)
HARP	Heterozygous ambiguity primer (heterozygotní nejasnosti rozlišující primer)
HD	High definition (plné rozlišení)
HLA	Human Leukocyte Antigen (lidský leukocytární antigen)
HLA-A	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-A2	Název konkrétní HLA alely
HLA-B	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-B1502	Název konkrétní HLA alely
HLA-B27	Název konkrétní HLA alely
HLA-B5701	Název konkrétní HLA alely
HLA-B5801	Název konkrétní HLA alely
HLA-C	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-DP	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DPB1	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQ	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DQ2	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQ8	Název konkrétní HLA alely

HLA-DQB1	Název konkrétní HLA alely
HLA-DR	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DR4	Název konkrétní HLA alely
HLA-DRB	Název konkrétní HLA alely
HLA-DRB1	Název konkrétní HLA alely
HLA-DRB3	Název konkrétní HLA alely
HLA-DRB4	Název konkrétní HLA alely
HLA-DRB5	Název konkrétní HLA alely
HLA-E	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy
HLA-F	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy
HLA-G	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy
IEF	Isoelectric focusing (isoelektrická fokusace)
IgG	Imunoglobulin G
IHIW	International HLA and Immunogenetics Workshop (Mezinárodní Workshop HLA systému a imunogenetiky)
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptors
LCT	Lymphocyte cytotoxicity test (lymfocytotoxický test)
MHC	Major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
MIRC	Major immune response complex (hlavní komplex imunitní odpovědi)
MLC	Mixed lymphocyte culture (smíšené lymfocytární kultury)
MLR	Mixed lymphocyte reaction (smíšená lymfocytová reakce)
NGS	Next-generation sequencing (sekvenování nové generace)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (periferní krevní mononukleární buňky)
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PCR-RFLP	Restriction fragment length polymorphism PCR (PCR polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

PCR-SSOP (SSO)	Sequence specific oligonucleotide probe PCR (PCR sekvenčně specifických oligonukleotidových sond)
PCR-SSP	Sequence-specific primer PCR (PCR sekvenčně specifický primer)
RNA	Ribonukleová kyselina
SAG	Single antigen bead (jeden antigenový korálek)
SBT	Sequence-based typing (sekvenční typizace)
SNP	Single nucleotide polymorphism (polymorfismus jednotlivých nukleotidů)
Tc lymfocyty	Cytotoxic T cell (cytotoxický T lymfocyt)
Th lymfocyty	T helper cell (pomocný T lymfocyt)
UK	United Kingdom (Spojené království Velké Británie a Severního Irska)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

ÚVOD

HLA komplex je hlavním lidským histokompatibilním systémem, který je primárně zaměřený na rozeznávání vlastních molekul od těch cizorodých. Můžeme ho charakterizovat jako soubor genů, který se vyskytuje v plazmatických membránách somatických buněk, dělíme ho do tří tříd, ty se od sebe liší strukturou i funkcí. Kvůli své rozsáhlé polymorfnosti zajišťuje organismu originalitu, ale na druhou stranu tak určuje tkáňovou neslučitelnost mezi jedinci. Komplex má výraznou roli při transplantacích, kdy na něm závisí přijetí nebo rejekce transplantovaného štěpu, ať už se jedná o orgán nebo krevní elementy. HLA systém je také důležitý v imunitním systému, konkrétně imunitní reakci, kde předkládá antigeny T-lymfocytům. V první části práce je charakterizován HLA systém a jeho rozdělení do jednotlivých tříd, jeho úloha v organismu, nomenklatura HLA alel a asociace s různými chorobami.

Druhý segment se zabývá přehledem využívaných metod pro typizaci HLA alel. K jejich rozpoznávání slouží dnes několik metod, které můžeme rozřadit do skupin. Nejpoužívanější sérologickou metodou k typizaci je lymfocytotoxický test. Dalšími rozšířenějšími metodami jsou genotypizace, které fungují na principu polymerázové řetězové reakci.

Poslední úsek práce popisuje současné možnosti a překážky ve využívání metody NGS pro HLA typizaci. Next-generation sequencing z anglického překladu znamená sekvenování nové generace, můžeme se setkat i s názvem sekvenování druhé generace nebo masivní paralelní sekvenování. V posledních letech se tato typizační metoda nejrychleji rozvíjí v oblasti diagnostik onemocnění. Metoda sekvenuje úseky nukleových kyselin i celých genomů a exomů rychleji a levněji než ostatní sekvenční metody a její podstatou je zpracování až milionů sekvencí v jednom běhu. Typicky se používá při detekci nádorových onemocnění, ale i při odhalování různých mutací. Nevýhody nebo překážky ve využívání metody závisí na typu platformy, které jsou uvedeny v textu práce. Zatím největší překážkou při používání typizace NGS je její zavedení do klinických laboratoří, z důvodu velkého množství falešně pozitivních nebo negativních výsledků, pod nimiž jsou ukryté biologicky důležité informace.

1 Systém HLA

1.1 Stručná historie

První pozorování HLA komplexu bylo uskutečněno na zvířatech, konkrétně myších. Alogenní nádorová transplantace byla obvykle používána v raných experimentech ke studii biologie tumoru. V první dekádě 20. století provedli američtí genetici, Ernest E. Tyzzer a Clarence C. Little, důležité transplantace nádorů u potomků zkřížených myší, které byly náchylné nebo imunní na alogenní tumor. Na základě výsledků, došli k závěru, že náchylnost k růstu alogenních nádorů byla geneticky podmíněna nejspíše až 15 geny. Povaha těchto genů a jejich produktů nebyla obeznámena (Thorsby, 2009).

Poté britský lékař Peter A. Gorer objevil roku 1936 antigen zodpovědný za odmítnutí orgánu. Zkoumal protilátky a jejich spojitost s krevními skupinami, které souvisely s pokusy se zvířaty (hlavně myši a králíci). Antigen sdílený mezi maligními a normálními buňkami je podle něj významným faktorem rezistence k růstu alogenního nádoru, pokud byl přítomen v dárci a naopak chyběl u příjemce (Thorsby, 2009).

V letech 1944-1945 Peter Medawar poprvé stanovil, že odmítnutí alogenních transplantací je způsobeno imunitní reakcí organismu zaměřené proti štěpu. Později za tento objev obdržel Nobelovu cenu (Thorsby, 2009).

V roce 1958 byl detekován aloantigen přítomný v lidských leukocytech, který se měl stát prvním lidským leukocytovým antigenem HLA, konkrétně se jednalo o HLA-A2. Zásluha objevení prvního HLA antigenu patří francouzskému lékaři jménem Jean Dausset. Výzkum HLA od té doby zaznamenal obrovský vývoj, posunul se od histokompatibility k jedné z nejelementárnějších oblastí základní a klinické imunologie (Thorsby, 2009).

Po roce 1970 byly nalezeny 3 základní lokusy HLA systému (HLA-A, HLA-B, HLA-C). V tomto období se se začaly rozvíjet orgánové transplantace, při kterých hraje tento systém významnou roli (Penka & Tesařová, 2012).

Další antigeny byly objeveny v 80. letech, jednalo se o antigeny HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Vědci, díky těmto objevům, pochopili význam antigenů HLA jako molekul, které regulují imunitní odpověď u člověka (Penka & Tesařová, 2012).

V 90. letech poté byly zjištěny další antigeny tzv. neklasické (HLA-E, HLA-F, HLA-G atd..) (Penka & Tesařová, 2012).

Rychlý a rozsáhlý rozvoj v problematice HLA je výsledkem nejen vynikajících individuálních příspěvků průkopníků v oboru, ale také rozsáhlé mezinárodní spolupráce, zejména prostřednictvím mnoha mezinárodních workshopů o histokompatibilitě. Současným průzkumem došli vědci k závěru, že komplex HLA a podobné u jiných druhů, které bývají označovány jako hlavní komplex histokompatibility, by měly mít jiný název, konkrétně hlavní komplex imunitní odpovědi MIRC (major immune response complex) (Thorsby, 2009).

1.2 Definice HLA systému

Histokompatibilní antigeny jsou molekuly glykoproteinového charakteru, které se nachází na povrchu buněk orgánů, a hlavně jsou součástí buněk imunitního systému. Tyto antigeny určují mezi nepříbuznými jednotlivci neslučitelnost tkání (Penka & Tesařová, 2012).

Povahu histokompatibilních antigenů stanovuje genetický systém pojmenován jako MHC, tedy z angličtiny major histocompatibility complex. Tento komplex obsahuje všechny systémy spojené s vyššími živočišnými druhy (Penka & Tesařová, 2012; Otová & Mihalová, 2012).

HLA systém je hlavní lidský histokompatibilní systém, z angličtiny human leukocyte antigens. Nachází se v něm asi 200 genů, které se řadí do tří tříd (Penka & Tesařová, 2012).

„*Geny hlavního histokompatibilního komplexu se vyznačují vysokým stupněm polymorfismu (mnohočetná alelie), vztah alel je kodominantní.“* (Otová & Mihalová, 2012, s. 149). Každý jedinec má na vnějšku vlastních buněk unikátní soustavu HLA molekul, s výjimkou jednovaječných dvojčat (Penka & Tesařová, 2012).

1.3 Nomenklatura

Nomenklaturu můžeme definovat jako systematické názvosloví založené roku 1968 Světovou zdravotnickou organizací (WHO). WHO založila Výbor nomenklatury, který se přímo zabývá pojmenováváním nových genů HLA, sekvenací alel a kontrolou kvality (Anthony Nolan Research Institute, 2019).

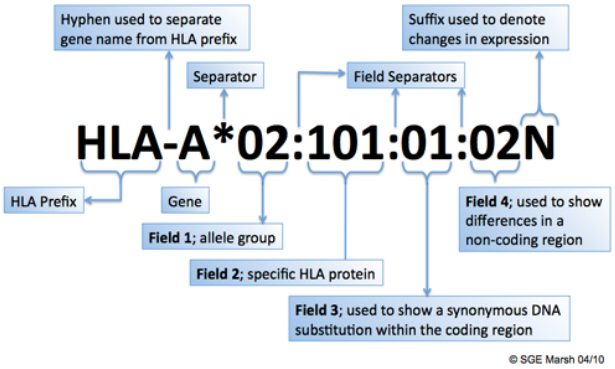
Vývoj standardizované HLA nomenklatury je zásadní pro naše chápání HLA systému a pro usnadnění klinických aplikací. Světová zdravotnická organizace WHO založila roku 1968 Výbor nomenklatury pro faktory HLA systému, aby dohlížel na rozvoj a užívání nomenklatury sestavené na sérologických specifikách, buněčných reakcích a DNA sekvencích. Dvě webové stránky poskytují upravenou databázi sekvencí více než 26 000 HLA alel (Hurley, 2020). Konkrétně najdeme tyto databáze na stránkách: www.ebi.ac.uk a www.allelefrequencies.net .

Každý název alely má unikátní číslo odpovídající až čtyřem sadám číslic oddělených dvojtečkami. Délka označení alely závisí na sekvenci a jejím nejbližším příbuzném. Všechny alely jsou uváděny pod čtyřmístným názvem, odpovídajícím prvním dvěma sadám číslic, delší pojmenování dostanou pouze v případě potřeby, viz. obrázek 1 (Anthony Nolan Research Institute, 2019).

Číslice před první dvojtečkou popisují typ, který často odpovídá sérologickému antigenu. Další sada číslic se používá k vypsání podtypů, přičemž čísla se přiřazují v pořadí, ve kterém byly určeny sekvence DNA. Alely, jejichž počet se liší ve dvou sadách číslic, se musí lišit v jedné nebo více nukleotidových substitucích, které mění aminokyselinovou sekvenci kódovaného proteinu. Alely, které se liší pouze podobnými nukleotidovými substitucemi (nazývány tiché nebo nekódující substituce) v kódující sekvenci, se odlišují použitím třetí sady číslic. Alely, které se liší polymorfismem v intronech, v 5′ nebo 3′ konci nepřeložených regionů se odlišují použitím čtvrté sady číslic (Anthony Nolan Research Institute, 2019).

Kromě jedinečného čísla alely existují i další volitelné přípony, které mohou být přidány k alele k označení stavu exprese. Alely, které nejsou vyjádřeny, se označují příponou N (Null). Alely, u nichž se prokázala alternativní exprese mohou mít příponu L, S, C, A nebo Q (Anthony Nolan Research Institute, 2019).

Přípona L (Low) se používá k označení alely, u které bylo prokázáno, že má nízkou expresi na buněčném povrchu ve srovnání s normálními hladinami. Přípona S (Secreted) se používá k označení alely specifikující protein, který je exprimován jako rozpustná sekretovaná molekula, ale není na povrchu buňky. Přípona C (Cytoplasm) je přiřazena alelám, které produkují proteiny, které jsou přítomny v cytoplazmě, a mimo povrch buněk. Přípona A (Aberrant) označuje aberantní výraz, pokud existují určité pochybnosti o tom, zda je protein skutečně exprimován. Přípona Q (Questionable) se používá, když je exprese diskutabilní. V alele je totiž prokázána mutace, která ovlivňuje normální hladiny exprese v jiných alelách (Anthony Nolan Research Institute, 2019).



Obrázek 1 Nomenklatura HLA (Anthony Nolan Research Institute, 2019)

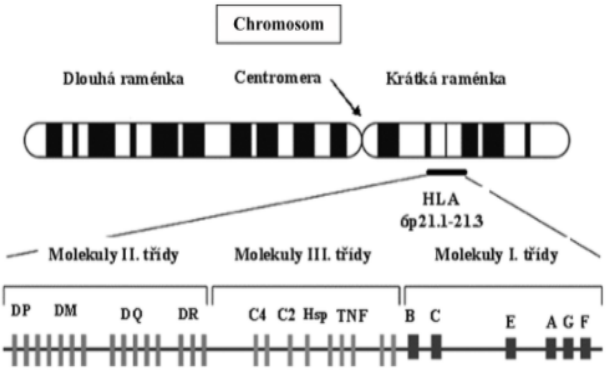
1.4 Úloha HLA v organismu

HLA rozhoduje a určuje vlastní specifickou imunologickou reakci. Ve struktuře mají vazebná místa, kam se vážou cizorodé antigeny a jejich peptidy. Funkcí HLA je prezentování epitopů a možnost identifikace cizorodých prvků v organismu od těch vlastních. Při imunitní reakci rozpoznají T-lymfocyty navázané antigenní částice na molekuly HLA a v závislosti na typu cizí částice reagují určité složky specifické buněčné imunity (Otová & Mihalová, 2012; Penka & Tesařová, 2012).

Rozlišujeme dva základní druhy T-lymfocytů, a to Th a Tc lymfocyty. Tc (cytotoxic) lymfocyty rozeznávají cizorodý epitop po jeho navázání na molekulu HLA I. třídy. Naopak Th (helpers) lymfocyty reagují při vazbě cizího antigenu na molekuly II. třídy HLA. Příčinou tohoto chování můžeme HLA antigeny označit jako transplantační antigeny, protože způsobují rejekci neboli odmítnutí transplantátu při inkompatibilních transplantacích (Otová & Mihalová, 2012).

1.5 Lokalizace a rozdělení struktur HLA

HLA komplex je umístěn na krátkém raménku 6. chromozomu, konkrétně 6p2, viz. obrázek 2. Komplexu se přezdívá supergen, protože obsahuje 3 podoblasti (Otová & Mihalová, 2012).



Obrázek 2 HLA komplex v chromozomu (Otová & Mihalová, 2012)

1.5.1 Molekuly a geny HLA I. třídy

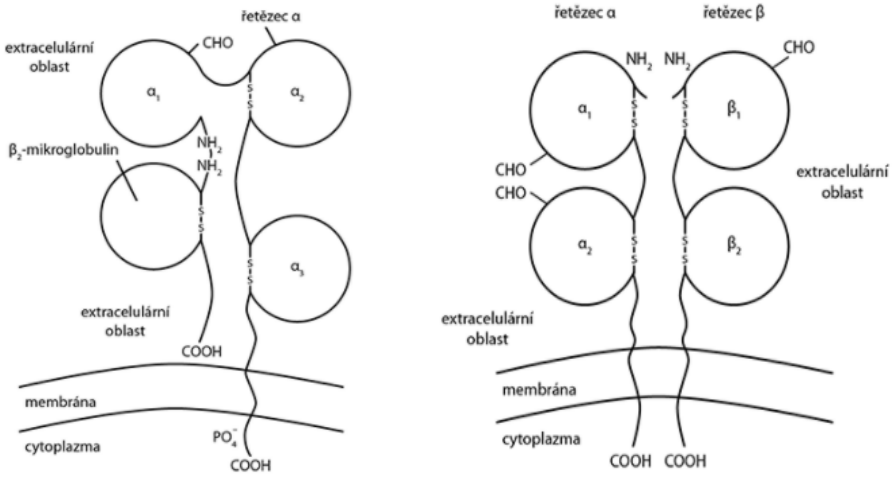
Tyto molekuly jsou součástí všech buněk obsahující jádro v organismu. Strukturou je to tzv. heterodimer, který je utvářený lehkým (β) a těžkým (α) řetězcem, viz. obrázek 3. „*Heterodimer je bílkovina složená ze dvou polypeptidových řetězců, které se liší svým složením"* (Schwab, 2011, s. 1688). Těžký řetězec můžeme dělit na 3 části, a to část extracelulární, transmembránovou a cytoplazmatickou. Dělení souvisí s orientací α řetězce v buňce, kdy v extracelulární části je aminoskupinový konec a v cytoplazmatické části se nachází karboxylový konec řetězce. Extracelulární část můžeme dále rozdělit do tří domén: α_1, α_2, α_3. Rozdíly v antigenech HLA I. třídy jsou nejvíce patrné v doméně α_1 (Penka & Tesařová, 2012).

β_2-mikroglobulin vytváří lehký řetězec, váže se nekovalentními vazbami na α řetězec a není zanořen v cytoplazmatické membráně. Mikroglobulin svou strukturou připomíná imunoglobuliny, proto se k nim také přiřazuje. Ve struktuře se navazuje na doménu α_3 a způsobuje správnou orientaci molekuly. Kóduje ho gen, který se nachází na 15. chromozomu (Penka & Tesařová, 2012).

Mezi α_1 a α_2 doménami těžkého řetězce vzniká prohlubeň, kam se následně naváže antigenní peptid. Na toto místo se vážou peptidy o délce 8-10 aminokyselin z důvodu uzavření obou konců vazebných míst u molekul HLA I. třídy (Penka & Tesařová, 2012).

V I. třídě molekul HLA je začleněno přibližně 20 genů, nejdůležitější jsou v lokusech HLA-A, B, C. Pojmenovávají se jako klasické geny a mají vysoký stupeň polymorfismu. Nalézají se v jaderných buňkách převážně slezině, lymfatické tkáni, brzlíku, menší zastoupení mají ve svalech a orgánech (Otová & Mihalová, 2012; Penka & Tesařová, 2012).

Produkty dalších lokusů, nazývány jako neklasické HLA antigeny, (HLA-E, F, G) se vyznačují menším stupněm polymorfismu a omezenou distribucí v tkáních (Penka & Tesařová, 2012).



Obrázek 3 Struktura molekuly HLA I. třídy a HLA II. třídy (Penka a Tesařová 2012)

1.5.2 Molekuly a geny HLA II. třídy

Na základě podobnosti ve struktuře jsou stejně jako molekuly HLA I. třídy přiřazovány k imunoglobulinům. Rozdílem mezi těmito třídami je ten, že u molekul HLA II. třídy se glykoproteiny objevují pouze na buňkách představujících antigen. Molekuly mají také strukturu heterodimeru, který se rozděluje na lehký (β) a těžký (α) řetězec, nekovalentně vázány k sobě, viz. obrázek 3 (Penka & Tesařová, 2012).

Penka a Tesařová (2012) dále uvádí, že extracelulární část řetězců obsahuje domény α_1, α_2, β_1, β_2. Domény α_1 a β_1 na sebe vzájemně působí a vzniká prohlubeň, která na sebe navazuje antigenní fragmenty. Místo pro navázání antigenu u molekul HLA II. třídy

je otevřené a umožňuje vazbu antigenů s delším řetězcem aminokyselin (cca 15-35 aminokyselin).

Geny molekul HLA II. třídy se vyskytují v oddílu řady HLA-D genů, které se nejvíce blíží k centromeře. Má další podjednotky HLA-DR, DQ, DP a například geny pro proteiny membránového transportu. Jmenované podjednotky kódují lehké a těžké řetězce antigenů HLA II. třídy. Prezentují se ve složkách imunitního systému, konkrétně membrány B-lymfocytů, aktivované T-lymfocyty a také makrofágy, monocyty a Langerhansovy buňky (Otová & Mihalová, 2012; Penka & Tesařová, 2012).

1.5.3 Molekuly a geny HLA III. třídy

Nacházejí se v oblasti mezi I. a II. třídou molekul a obsahuje asi 50 genů. Produkty III. třídy nemají účast v kódování antigenů HLA, nepodílí se na aktivitě HLA systému a morfologicky se liší od ostatních tříd. Zahrnuje geny pro složky komplementu (C2, C4), tumor nekrotizující faktor, lymfotoxin, cytochrom P450, stresové proteiny a další (Otová & Mihalová, 2012; Penka & Tesařová, 2012).

1.5.4 Dědičnost HLA

Díky již zmíněnému polymorfismu se antigeny HLA vyskytují v několika desítkách variant alel. K dědičnosti dochází při kombinaci alel, kdy každý jedinec má soubor 2 haplotypů od rodičů a tvoří HLA genotyp jedince (Otová & Mihalová, 2012; Penka & Tesařová, 2012).

Haplotyp je definován jako seřazení alel dílčích genů HLA na jednom párovém chromozomu. Studiemi bylo dokázáno, že asi u 2 % potomků je genotyp odlišný od rodičovského díky rekombinantnímu genotypu. Ten vzniká v meióze u homologních chromozomů při rekombinace, crossing-overu a následkem vzniká nová kombinace alel u potomků v HLA komplexu (Otová & Mihalová, 2012; Penka & Tesařová, 2012).

1.6 Role HLA v medicíně

Systém lidského leukocytového antigenu zobrazuje nejvyšší rozmanitost jakéhokoliv funkčního genetického systému na úrovni populace. Typizace HLA odhaluje polymorfní vlastnosti, které byly velmi brzy považovány za markery citlivosti nebo rezistence na nemoc a infekci. Prediktivní medicína byla původně navržena jako osobní prevence nemocí (Charron, 2011).

1.6.1 Imunogenetika

Komplex HLA je nejvíce polymorfní genetická oblast s důležitými biologickými funkcemi (tj. imunitními reakcemi, vývojem a regulací) a lékařským dopadem. Lidský komplex je spojován s více chorobami než kterákoliv jiná oblast genomu, zvláště související s infekcí a autoimunitou. Ještě pozoruhodnější je role systému HLA při transplantaci orgánů a hematopoetických kmenových buněk a jeho význam při vývoji vakcín, zejména vakcín proti rakovině (Charron, 2011).

Nová paradigmata, jak by měla být organizována a předkládána moderní biomedicínská věda, nastavila před více než 40 lety Mezinárodní Workshopy Histokompatibility. Takto kombinovaný přístup umožnil kolektivní sdílení dat a odhalil rozmanitost HLA, kterou nejlépe představuje nomenklatura HLA, jež v roku 2010 obsahovala více než 4000 alel (Charron, 2011).

1.6.2 Systémová biologie

Jedinečnou příležitost ke studiu komplexních a systémových účinků zavedení nového genomu u jedince představuje transplantace hematopoetických kmenových buněk a orgánů. Histokompatibilitu dárce a příjemce můžeme posoudit korelací biologických a fyziologických účinků, tím se identifikuje genetický přínos alel HLA, haplotypů a jejich kombinací.
Tak se otevírá, mimo jiné možnost neutralizace genetických rozdílů komplexu HLA provedením transplantace hematopoetických kmenových buněk mezi HLA neidentickými sourozenci. Takto nastavené klinické prostředí umožňuje zdůraznit účinky jiných

imunogenetických systémů, jakými jsou menší lokusy, histokompatibility, cytokiny nebo receptory, které mají podstatný vliv na výsledek transplantace (Charron, 2011).

Z biologického přístupu založeného na HLA mohou těžit, kromě transplantační a regenerativní medicíny i další důležitá onemocnění, například autoimunitní, u nichž byl HLA potvrzen, jako hlavní genetický faktor. Mezi přední kandidáty patří diabetes mellitus 1. typu, revmatoidní artritida, ankylozující spondylitida a roztroušená skleróza. Je třeba přihlédnout také k tomu, že nedávné asociační studie na celém genomu odhalily poměrně neočekávanou imunitní složku u neuropsychiatrických poruch (Charron, 2011).

1.6.3 Farmakogenetika

Farmakogenetika se v personalizované medicíně používájí k optimalizaci dávkování léčby a zamezení nežádoucích účinků léků. Nežádoucí vedlejší účinky solí zlata, penicilaminu D a Tioproninu byly uznány již brzy a byly spojeny s konkrétními alelami HLA nebo jejich haplotypy. Podle nových zjištění vyvolává několik léků HLA-dependentní nežádoucí reakci, nejtypičtějším z nich je abakavir a HLA-B5701. Typizace HLA je nyní povinná před zahájením léčby abakavirem. Farmakologická citlivost, ovlivňující hlavně kůži a játra, je často určena genotypy HLA pacienta. Toxická epidermální nekróza a syndrom Stevena Johnsona, vyvolané karbamazepinem, souvisejí s HLA-B1502, bylo také prokázáno spojení HLA-B5801 s příhodami vyvolanými alopurinolem (Charron, 2011).

1.7 Onemocnění spojené s HLA

Prvním onemocněním je celiakie, protože je stále jediným kompletně popsaným příkladem onemocnění spojeného s HLA, u kterého byl mechanismus odhalen v mimořádných detailech. V klinických laboratořích se provádí testování přítomnosti alel HLA-DQ2 a HLA-DQ8, jejichž průkaz ve vzorku umožňuje vyloučit invazivní biopsii z diagnostického procesu. Typizace DQ2 a DQ8 by měla být prováděna také u asymptomatických dětí s dalšími možnými indikátory celiakie. Pokud jsou výsledky negativní, je diagnóza celiakie prakticky vyloučena (Howell, 2014).

Dalším již výše zmíněným onemocněním je revmatoidní artritida. Je charakterizována chronickým zánětem synoviálních kloubů, přičemž nejčastěji jsou postiženy malé klouby rukou a nohou. Imunologické odpovědi jsou důležité při destrukci kloubů a systémových onemocněních zahrnujících jiné orgány. Pokud jde o genetické faktory, na náchylnosti k artritidě se pravděpodobně podílí více genů. HLA-DRB1 je však hlavním lokusem, který přispívá k náchylnosti tohoto onemocnění z 30-50 % (Howell, 2014).

Inzulín-dependentní diabetes mellitus neboli diabetes mellitus 1. typu, je chronické autoimunitní onemocnění zprostředkované T-lymfocyty, které vede ke zničení β buněk produkujících inzulín v pankreatických ostrůvcích. V tomto destruktivním procesu hrají roli také B-lymfocyty produkující autoprotilátky. Citlivost na diabetes 1. typu má silnou genetickou složku, přičemž se odhaduje, že geny HLA II. třídy přispívají až 45 % k celkové genetické náchylnosti k tomuto onemocnění. Rozsáhlé studie již dlouho naznačují, že za tuto citlivost jsou z velké části zodpovědné alely HLA-DQ (Howell, 2014).

Ankylozující spondylitida je chronické zánětlivé onemocnění, které primárně postihuje axiální kostru a sakroiliakální klouby, i když mohou být ovlivněny také periferní klouby a šlachy. Onemocnění je na rozdíl od většiny autoimunitních chorob spojena více s mužským pohlavím. Genetická dědičnost nemoci je extrémně vysoká, odhaduje se, že přesahuje 90 %. Silná asociace mezi HLA-B27 a spondylitidou byla popsána velmi brzy, a je to ve skutečnosti nejsilnější asociace HLA I. třídy s jakýmkoliv autoimunitním onemocněním. Více než 96 % pacientů s ankylozující spondylitidou je pozitivních na alelu HLA-B27 (Howell, 2014).

A v neposlední řadě je HLA polymorfismus spojen s náchylností k rezistenci a progresi řady virových a mikrobiálních infekčních chorob, včetně HIV/AIDS, hepatitidy B a C, horečky dengue, lepry, tuberkulózy, malárie a dalších (Howell, 2014).

2 Metody využívané k typizaci HLA

Pro typizaci HLA antigenů se využívá několik metod, z nichž nejzákladnější jsou sérologické metody a genotypizace.

Typizace se používají zejména u dárců krve, kostní dřeně a dárcovských orgánů. HLA antigeny mohou mít úzkou vazbu s některými dědičnými chorobami.

2.1 Sérologické metody

Před tím, než byly k dispozici metody genotypizace pro označování HLA, používaly se metody založené na detekci protilátek a vyvíjely se s rostoucím počtem rozpoznaných HLA. Problémy detekce a identifikace I. třídy HLA byly překonány mnohem rychleji než u II. třídy. K izolaci B-lymfocytů pro typizaci HLA II. třídy byla zavedena řada inovací a přidány ještě imunofluorescenční metody pro detekci vazby protilátek a zvýšení citlivosti. Součástí omezení sérologických metod je také výzva identifikovat dárcovská séra s přijatelnou reaktivitou a specifitou protilátky a udržovat zásoby dárců tak, aby se nahradila hodnotná využívaná činidla. Velmi ceněné byly reagencie s jednou specifitou, zejména pro nízkofrekvenční antigeny. Monoklonální typizační činidla doplňovala lidská séra, ovšem přidávala na složitosti občasným rozpoznáváním epitopů nerozpoznaných lidskými protilátkami (Eisenbrey, 2021b).

Během posledních let se dosáhlo několika vylepšení, jako je účinnost a spolehlivost těchto technik. Jednou z hlavních nevýhod sérologie je však potřeba životaschopných buněk, které mohou mít výrazně narušenou životaschopnost a sníženou expresi antigenů na povrchu buněk. Sérologické metody to činí náchylné k chybám (Doxiadis & Claas, 2003).

V sérologické typizaci se využívají typizační séra získaná například z krve matek po vícečetných těhotenstvích nebo produkcí monoklonálních protilátek somatickou hybridizací buněk (Penka & Tesařová, 2012).

2.1.1 Lymfocytotoxický test

Lymfocytotoxický test, zkratkou LCT, je nejstarší test, který slouží k sérologické identifikaci molekul HLA I. a II. třídy. Metoda se zakládá na detekci anti-HLA protilátek známé specifity. Tyto protilátky označujeme jako monoklonální a mohou být získány od vícenásobných rodiček nebo příjemců vícečetných transfúzí. (Penka & Tesařová, 2012).

Test se provádí na Terasakiho deskách, kde dochází k reakci izolovaných T nebo B-lymfocytů pacienta s typizačním sérem a následným dodáním králičího komplementu. Pokud dojde k vazbě specifických protilátek vyskytujících se v typizačním séru na buňky pacienta, nastane aktivace přidaného komplementu a rozruší se buněčné membrány lymfocytů vzniklým enzymem fosfolipáza a nastává lýze buňky. Díky porušené membráně, buňky lépe přijmou vitální barvivo eozin nebo trypanovou modř. Po přidání jednoho z barviv se živé buňky nezbarví, protože dokážou pumpovat barvivo z buňky ven. Avšak do mrtvých buněk proudí barvivo otevřenými póry a zůstává tam, tím se usmrcená buňka obarví. A v mikroskopu se vykazuje jako červená nebo modrá podle užitého barviva (Penka & Tesařová, 2012).

S používáním LCT jsou spojené nepřesnosti, jako je falešná pozitivita, falešná negativita, zkřížené reakce. Také je nesnadné určování u nádorových buněk nebo buněk se sníženou životností čili staršího materiálu (Penka & Tesařová, 2012).

2.1.2 MLC

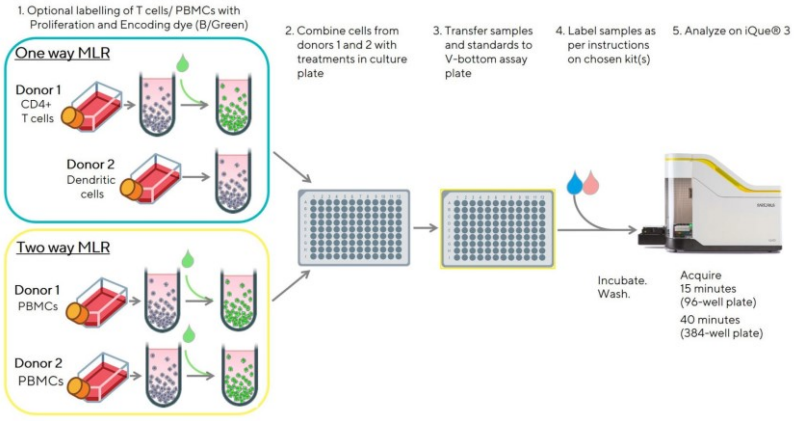
MLC (z anglického jazyka: Mixed Lymphocyte Culture) můžeme přeložit do názvu Smíšené lymfocytární kultury. Jedná se o zavedenou klinickou metodu, která slouží jako model in vitro pro alogenní reakci a transplantaci (Campo et al., 2001).

„*MLC test je funkční buněčný test, který měří odpověď T lymfocytů na stimulační determinanty asociované s HLA molekulami II. třídy (HLA-DR, -DQ, popř. -DP)*“ (Ambrůzová, 2002).

Test se připravuje smícháním lymfocytů izolovaných od dvou různých jedinců, přičemž jeden z nich je obvykle potenciální dárce a druhý je potenciální příjemce transplantátu. Protože tito dva jedinci nejsou geneticky identičtí (s výjimkou monozygotních dvojčat), různé histokompatibilní antigeny na povrchu dárcovských lymfocytů aktivují

lymfocyty příjemce a naopak. Výsledkem je aktivace syntézy DNA a buněčná proliferace lymfocytů. Měření je založeno na zabudování thymidinu, který je značen tritiem. Toto označujeme jako MLR neboli smíšená lymfocytová reakce, viz. obrázek 4 (Rovenský & Payer, 2009).

V praxi se využívá pro optimální výběr dárce související s transplantací ledvin u příbuzných, a také nepříbuzných dárců kostní dřeně. Test může varovat před eventuálním vznikem reakce štěpu proti hostiteli po vykonané transplantaci (Ambrůzová, 2002).



Obrázek 4 Princip metody MLR (Smialowicz, 2016)

2.2 Molekulární metody

2.2.1 CML

CML (z anglického jazyka Cell-mediated lympholysis) znamená v překladu test buněčně zprostředkované lymfolýzy, který se především zabývá molekulami HLA II. třídy.

Principem tohoto testu je reakce imunitního systému, kdy po expozici buněk nevlastním antigenům se začnou objevovat cytotoxické T-lymfocyty (Bílková & Korecká, 2012).

Nejprve se kultivují testované lymfocyty s typovými lymfocyty a následně se suspenze připojí do kultury dárcovských terčových buněk, které jsou značeny chromanem sodným (^{51}Cr). Pokud se bude jednat o rozdílné HLA antigeny, lymfocyty vyšetřované osoby se aktivují a cytotoxické lymfocyty zlyzují dárcovské terčové buňky a ty uvolní atomy chromanu sodného. Centrifugací a oddělení buněk se měří uvolněná radioaktivita do prostředí (Bílková & Korecká, 2012).

Pro CML se nalezl nový přístup měření pomocí kvantitativní průtokové a zobrazovací cytometrie. CML, jak je výše zmíněno, je test in vitro k detekci přítomnosti prekurzorů cytotoxických efektorových T lymfocytů. Současné metody používané při identifikaci těchto lymfocytů jsou založeny na kvantifikaci ^{51}Cr uvolněného z cílových buněk. Za účelem přizpůsobení testu průtokové cytometrii byly primární prasečí PBMC (periferní krevní mononukleární buňky) označeny pomocí eFluor670 a inkubovány s MHC s neshodnými cytotoxickými lymfocyty. Pomocí této metody jsme byli schopni detekovat cílovou specifickou lýzu, která byla srovnatelná s tou, která byla pozorována při použití ^{51}Cr. Kromě použití kvantitativního buněčného zobrazování prokazuje i přítomnost pomocných buněk zapojených do cytotoxické dráhy. Tato inovativní technika vylepšuje standardní test ^{51}Cr eliminací radioizotopů a poskytuje vylepšenou charakterizaci interakcí mezi efektorovými a cílovými buňkami (La Muraglia et al., 2015).

2.3 Biochemické metody

2.3.1 1D-isoelectric focusing

Z anglického překladu jedno-dimenzní isoelektrická fokusace, zkratkou IEF. IEF je elektroforetická technika pro separaci proteinů na základě jejich isoelektrického bodu. Tento bod můžeme označit jako pH, při kterém protein nemá žádný náboj a nemigruje dále do elektrického pole (Garfin, 1990).

Separace se provádí na desce polyakrylamidového nebo agarózového gelu, který obsahuje směs amfolytů, které putují v gelu a pokud jsou vystaveny elektrickému poli, vytváří stupeň pH. Důležitost analýzy spočívá v molekulách distribuovaných v médiu se stanoveným pH. Elektrický proud prochází médiem a vytváří pozitivní náboj na anodě a negativní na konci katody. Negativně nabité molekuly putují skrz stupeň pH v médiu směrem k pozitivnímu konci, zatímco kladně nabité molekuly se pohybují k negativnímu konci. Pokud se částice pohybuje směrem k pólu naproti svému náboji, je znehybněna v gradientu pH, blíží-li se svému specifickému isoelektrickému bodu (Garfin, 1990).

Výsledkem je zaostření proteinů, do stacionárních pásů, přičemž každý protein je umístěn v bodě gradientu pH, odpovídajícím jeho isoelektrickému bodu. Technika IEF je schopna extrémně vysokého rozlišení, a dokonce i proteiny, které se liší pouze jedním nábojem, lze rozdělit do samostatných pásů (Garfin, 1990).

Nejběžnější konfigurací pro IEF je vodorovná gelová deska. Deska poskytuje dobrou účinnost chlazení a umožňuje relativně snadnou aplikaci vzorků (Garfin, 1990).

2.4 Genotypizace (DNA metody)

Užitečnost genotypizace HLA při transplantaci pevných orgánů a hematopoetických kmenových buněk byla dobře prokazatelná. Časná typizace HLA spočívala v nízkém rozlišení nebo přiřazení na úrovni antigenu, ale ukázalo se, že pro úspěch transplantace kmenových buněk je důležité genotypování s vysokým rozlišením, protože může snadněji identifikovat dárce pro vysoce senzibilizované kandidáty na transplantaci (Profaizer & Kumánovics, 2018).

Genotypizace HLA se také používá k testování asociace nemocí. Více než 100 onemocnění bylo spojeno s různými alelami HLA. Sdružení s infekčními chorobami byly identifikovány a zahrnují infekce virem lidské imunodeficience, hepatitidu a tuberkulózu (Profaizer & Kumánovics, 2018).

Vývoj metod sekvenování nukleových kyselin umožnil předpovědět sekvence nukleových kyselin genů lidského leukocytového antigenu HLA. Testy využívající restrikční endonukleázy ukázaly omezení metod typizace založených na protilátkách (Eisenbrey, 2021a).

Objev PCR neboli polymerázové řetězové reakce, přinesl revoluci v HLA typizaci založené na sekvenci. Tyto metody se staly nákladově a časově konkurenceschopnými sérologickými typizačními metodami a byly výhodné, protože nevyžadovaly životaschopné lymfocyty. Genotypizace zlepšila přesnost čtení, zejména pro HLA II. třídy a složitější rodiny cross-reaktivních HLA-B. Sekvenční typizace HLA přesunula typizaci z rozlišování antigenů na rozlišení alel na všech lokusech (Eisenbrey, 2021a).

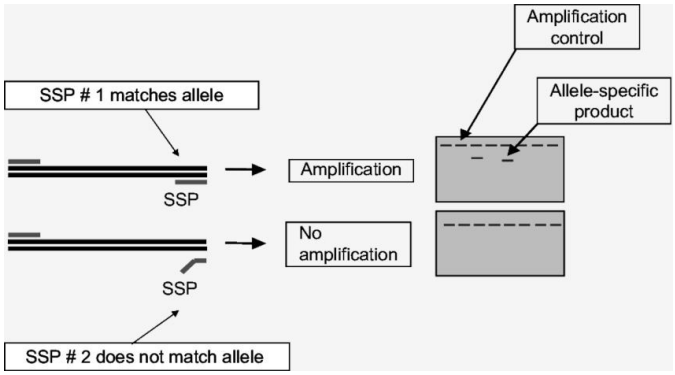
2.4.1 PCR-SSP

PCR-SSP (SSP = sequence-specific priming) je jednoduše forma polymerázové řetězové reakce, která zahrnuje návrh jednoho nebo obou primerů tak, aby umožňovaly nebo neumožňovaly amplifikaci, viz. obrázek 5 (Welsh & Bunce, 1999).

V roce 1988 popsala skupina z Guy´s Hospital v Londýně formu PCR-SSP pro detekci HLA-DR4 a ve stejném roce popsala skupina Upjohn její použití v Americké společnosti pro histokompatibilitu a imunogenetiku (zkratkou ASHI). Princip nesouladu 3´ konce je možné použít k rozpoznání jakékoliv mutace jednoho nukleotidového bodu v rámci jedné nebo dvou reakcí PCR-SSP. První recenzované výroky k této problematice jsou známé od roku 1989. Ačkoli používání PCR-SSP pravděpodobně začalo kolem roku 1990, bylo to 5 let předtím, než vypukla jeho popularita, hlavně díky práci Olerup & Zetterquist, kteří definovali jeho potenciál pro transplantaci pevných orgánů. V mnoha laboratořích je nyní PCR metodou volby pro typizaci HLA s vysokým rozlišením (Welsh & Bunce, 1999).

Odpovídající oligonukleotidové primery, bez neshody 30 konců jsou termostabilní DNA polymerázou, jsou efektivněji používány v PCR reakci než neshodující primery. Páry primerů jsou navrženy tak, aby hybridizovaly se všemi alelami nebo rodinami podobných alel. S přesně kontrolovanými podmínkami PCR umožňují párované primery amplifikovat sledovanou sekvenci (Nowak et al., 2012).

Po PCR jsou amplifikované fragmenty DNA odděleny elektroforézou na agarózovém gelu, vizualizovány barvením ethidiumbromidem nebo barvivo SYBR Green a expozicí UV záření, dokumentovány fotografiemi a interpretovány. Interpretace výsledků PCR-SSP je založena na přítomnosti nebo nepřítomnosti specifických produktů PCR v reakčních zkumavkách s primery známé alelové specifity. V každé reakci je zahrnut pár primerů vnitřní pozitivní kontroly. Tato dvojice odpovídá konzervovaným oblastem genu lidského růstového hormonu nebo β-globinu, které jsou přítomny ve všech vzorcích lidské DNA. Kvůli rozsáhlému polymorfismu lokusů HLA, jsou soupravy PCR-SSP prodávány jen jako sady mikrozkumavek PCR s předem uloženými specifickými primery, přesně popsané alelické specifity a umístěním mikrozkumavek (Nowak et al., 2012).



Obrázek 5 Princip metody PCR-SSP (Creative Biolabs, 2021a)

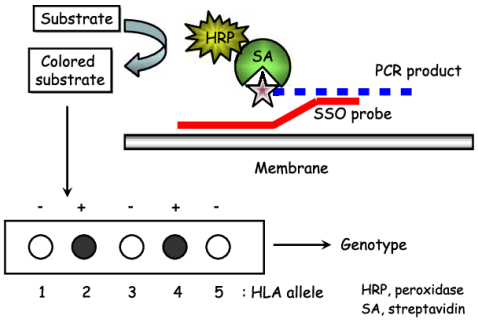
2.4.2 PCR-SSOP

PCR-SSOP (SSOP = sequence specific oligonucleotide probe) někdy označováno jako PCR-SSO přeloženo do češtiny jako polymerázová řetězová reakce sekvenčně specifických oligonukleotidových sond.

Existuje několik komerčních souprav pro typizaci HLA pomocí metody PCR-SSOP. Protože tyto soupravy jsou lokusově specifické, cílová DNA se amplifikuje pomocí PCR za použití směsí primerů lokusu, exonu 2 nebo exonu 2 a 3 pro genotypizaci I. a II. třídy HLA. Produkt PCR je biotinylován, což umožňuje jeho detekci pomocí R-fykoerythrin-konjugátu strepavidinu (zkratkou SAPE). Produkt PCR je denaturován a hybridizován s různými komplementárními sondami DNA konjugovanými každou s jednou ze 100 druhů polystyrenových kuliček obarvených určitým podílem infračervených a červených fluoroforů s ochrannou známkou. Důležitý je průtokový analyzátor, který slouží k identifikaci fluorescenční intenzity mikrosfér procházejících skrz červený laser, který excituje vnitřní barviva, k odlišení sady mikrosfér, a poté prochází zeleným laserem, který excituje R-fykoerythrin na reportérové molekule, viz obrázek 6. Přiřazení genotypu HLA se zakládá na reakčním vzoru ve srovnání se vzory spojenými se zveřejněnými sekvencemi genu HLA. Mezi nejběžnějšími výsledky metody PCR-SSOP jsou závěry s nízkým až středním rozlišením s častými alelickými a heterozygotními cis/trans nejednoznačnostmi (Nowak et al., 2012).

Rozšíření metody na HD postup je založeno na použití dalších speciálních sond. Tyto průzkumy představují dvě nebo tři specifické sondy spojené krátkými nehybridizujícími rozpěrkami a jsou schopné hybridizovat jen s jedním polymorfismem umístěným v řetězci DNA. Tímto způsobem část alelické a heterozygotní nejednoznačnosti lze vyřešit, a tak se rozlišení HD výrazně zlepšilo (Nowak et al., 2012).

Výhodou typizace SSOP oproti SSP je v tom, že je snazší detekovat nové alely, nákladově efektivnější a méně časově náročná (Kennedy et al., 1995).



Obrázek 6 Princip metody PCR-SSOP (Cabrera et al., 2006)

2.4.3 PCR-RFLP

PCR-RFLP (= restriction fragment length polymorphism) můžeme přeložit jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů.

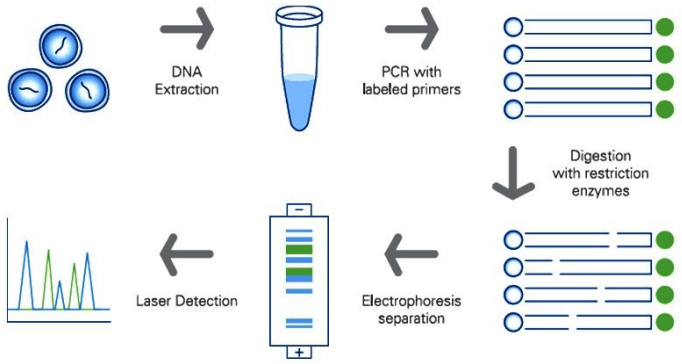
RFLP je charakterizován jako rozdíl v homologních sekvencích DNA, který lze odhalit přítomností částic různých délek po štěpení příslušných vzorků DNA specifickými restrikčními endonukleázami. RFLP jako molekulární marker je specifický pro jedinou kombinaci klon/restrikční enzym. Většina markerů je kodominantní, to znamená, obě alely budou detekovány v heterozygotním vzorku, a vysoce lokusově specifické (Mittal et al., 2013).

Sonda RFLP je značení sekvence DNA, která hybridizuje s jedním nebo více fragmenty štěpeného vzorku DNA poté, co byly odděleny gelovou elektroforézou, čímž se odhalí jedinečný blotovací vzor charakteristický pro konkrétní genotyp na konkrétním místě. Jako sondy se typicky používají klony genomu DNA nebo cDNA krátké, s jednou nebo nízkou kopií. Sondy se často používají při mapování genomu a při analýze variací (Mittal et al., 2013).

Vývoj sond je náročný proces. Ten zahrnuje celkovou DNA, která je štěpena enzymem citlivým na methylaci, čímž se obohacuje knihovna o sekvence exprimované v jedné nebo nízké kopii. Štěpená DNA je frakcionována podle velikosti na preparativním agarózovém gelu a fragmenty v rozmezí od 500 do 2 000 bp jsou vyříznuty, eluovány a klonovány do plazmidového vektoru. Trávení plazmidů se podrobí screeningu, aby se zkontrolovaly inzerty. Southern blot inzertů může být sondován celkovou stříhanou DNA, aby se vybraly klony, které hybridizují na sekvence s jednou a nízkou kopií. Sondy jsou testovány na RFLP pomocí genomové DNA různých genotypů štěpených restrikčními

endonuklázami, viz obrázek 7. Typicky se u druhů se střední až vysokou rychlostí polymorfismu používají dvě až čtyři restrikční endonukleázy, jako je EcoRI (Mittal et al., 2013).

Izolace dostatečného množství DNA pro analýzu PCR-RFLP je časově náročná a pracná. Lze však použít k amplifikaci malého množství DNA, takže můžeme analyzovat více vzorků za kratší dobu. Alternativním názvem této techniky je rozbor štěpené amplifikované polymorfní sekvence (CAPS) (Mittal et al., 2013).



Obrázek 7 Princip metody PCR-RFLP (Sagar, 2018)

2.4.4 SBT

SBT (= sequence-based typing), v překladu sekvenční typizace, je HLA typizace s vysokým rozlišením zaměřená na definici alely polymorfního plného genu (Voorter et al., 2014).

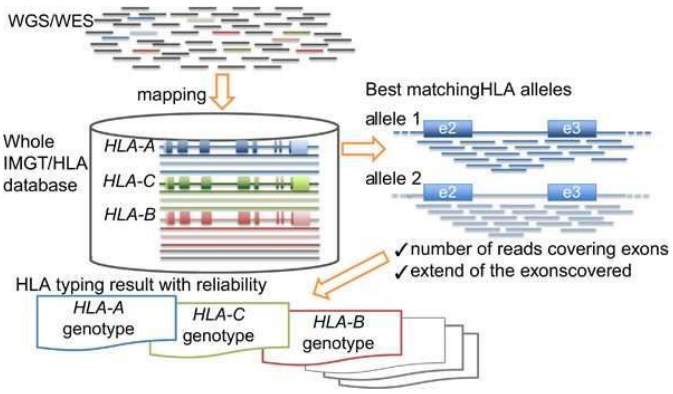
Sekvenční typizace je hlavní technikou řazená mezi metody s nejvyšší spolehlivostí při definování alel HLA (Shankarkumar et al., 2008).

Pro transplantaci kmenových buněk je rozhodující shoda s HLA na úrovni alely. Ačkoliv většina polymorfismu pro I. třídu HLA je umístěna v exonech 2 a 3 a pro II. třídu v exonu 2, je pro definici alely nutné objasnit kompletní kódovací a intronové sekvence vedoucí k ultra vysokému rozlišení HLA typizace na úrovni alely (Voorter et al., 2014).

Metoda SBT pro HLA-A, -B, -C a -DQB1 je založená na hemizygotním Sangerově sekvenování plné délky alel, oddělených skupinově-specifickou amplifikací pomocí výsledku čtení s nízkým rozlišením jako referenčního výchozího bodu. Skupinově-specifická amplifikace již byla pro geny HLA-DRB zavedena. Tento způsob umožňuje nákladově

efektivní a uživatelsky přívětivý přístup SBT, jehož výsledkem je včasné jednoznačné čtení HLA na úroveň ultra vysokého rozlišení s minimální dobou provedení, viz obrázek 8 (Voorter et al., 2014).

Přestože SBT je technika s nejvyšším rozlišením, může při řešení heterozygotních alelických párů narazit na nejednoznačnosti. Nejednoznačné alely se vyskytují, pokud jsou sekvenovány běžnými sekvenčními primery a analytický software nemůže rozhodnout, zda se jedná o cis nebo trans kombinaci polymorfních míst. Jindy dochází k nejasnostem, když existuje pouze jedna DNA báze odlišná ve dvou typizacích. K určení těchto nejasností se obvykle používá panel speciálně navrženého PCR-SSP nebo další skupinově specifické PCR amplifikace následovaná sekvenováním. Použití doplňkových způsobů by mohlo snížit propustnost, účinnost čtení HLA a zvýšit pravděpodobnost operační chyby, také je to časově náročné. Modifikovaná technika SBT, tzv. primer rozlišující heterozygotní nejasnosti (HARP), se používá k řešení kombinací cis nebo trans alel v jednom kroku, aby se zabránilo nevýhodám ve skupině specifické PCR nebo PCR-SSP (Perng et al., 2012).



Obrázek 8 Princip metody SBT (Creative Biolabs, 2021b)

2.4.5 Metoda mikročipu

V posledních letech otevřel vývoj technologie mikročipů novou dimenzi v molekulární biologii tím, že umožnil simultánní analýzu velkých souborů genů na malém reakčním sklíčku (Lee et al., 2008).

Oligonukleotidové mikročipy se obvykle sestávají ze skleněného čipu, na jehož povrch jsou aplikovány řady sekvenčně specifických nukleotidových sond (Sun, 2008).

Metody s vysokou přenosností, které mají být použity v nastavení vysoké propustnosti, jsou potřebné pro systematické průzkumy frekvence a přesného umístění variací sekvence a jejich vlivu na buněčné chování. Přestože experimentální účinnost a platnost výsledků z mikročipů je stále kontroverzní, znalosti a charakteristika genetického profilu pacienta povedou k pokroku v prevenci, diagnostice, prognóze a léčbě lidských onemocnění, jakož i k novému přístupu ke studiu genetické etnické rozmanitosti člověka (Palmisano et al., 2005).

Klíčovým požadavkem pro hodnocení genomových jedno nukleotidových polymorfismů (SNP) je schopnost jednoznačně rozlišovat mezi homozygotními a heterozygotními alelickými variantami v diploidním lidském genomu. Z tohoto pohledu může komplex HLA, který je charakterizován nejrozsáhlejšími vzory SNP jeho lokusů v lidském genomu, představovat platný modelový systém pro vývoj formátu DNA mikročipů pro jakoukoliv detekci polymorfů, včetně multiplexu genotypizace SNP. Pro analýzu výsledků s vysokou propustností je nutné použít specifický software (Palmisano et al., 2005).

Technologie DNA tak může pomocí mikročipů přispět k včasné detekci vysoce rizikového pacienta s poruchami autoimunitního onemocnění, také ji lze využít pro screening mutací klinického zájmu souvisejících s různými chorobami včetně rakoviny (Palmisano et al., 2005).

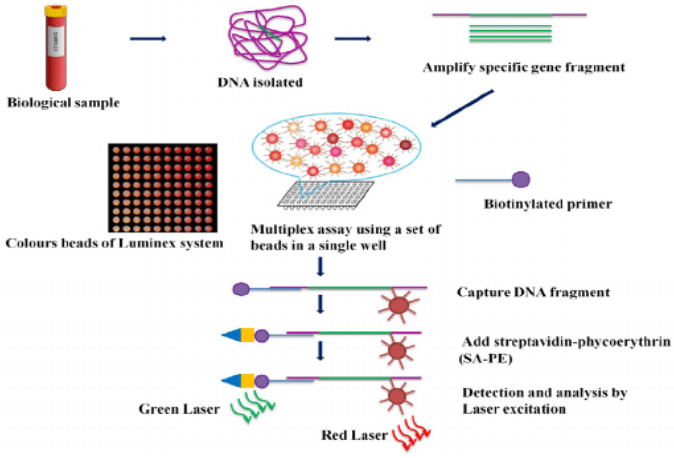
2.5 Metoda Luminex

Technologie screeningu protilátek Luminex se skládá z řady polystyrenových mikrokuliček/perliček, obsahujících fluorochromy různé intenzity vložené do kuliček, které dávají každé skupině s molekulou HLA, nebo molekulami odvozenými z buněčných linií lymfoblastoidů, připojený jedinečný signál (Tait et al., 2009).

Existují tři úrovně uchycení. První úroveň se skládá z mikrokuliček vázaných s velkým počtem molekul I. a II. třídy, což v zásadě poskytuje pozitivní nebo negativní výsledek. Na druhé úrovni je mikrokulička ekvivalentní buňce, přičemž každá mikrokulička obsahuje dvě molekuly odvozené od dvou alel v každém lokusu: HLA-A, -B, a -C v případě I. třídy a HLA-DR, -DQ v případě II. třídy. Ve třetí úrovni jsou mikrokuličky spojeny s jednou molekulou HLA (I. nebo II. třídy) označovány jako jedna antigenová kulička (SAG). Třetí úroveň je zvláště užitečná pro určení komplexních sér, a také pro přesnou definici přítomných protilátek (Tait et al., 2009).

Do směsi kuliček se přidávají testovací séra a protilátky HLA se vážou na kuličku s připojenou příslušnou molekulou HLA. Poté se přidá druhá fykoerythrinem značená protilátka proti lidskému IgG, která se váže na primární protilátku HLA. Když vzorek prochází detektorem, jeden laser excituje fluorochrom v kuličce, který vykazuje jedinečný signál a druhý laser excituje fykoerythrin navázaný na druhou protilátku. Kombinace těchto signálů definuje specifitu protilátky v testovacím séru, viz obrázek 9 (Tait et al., 2009).

Data naznačují, že platforma Luminex je nejcitlivější z technik detekce protilátek na pevné fázi. Významnou výhodou metody Luminex je zavedení SAG. SAG umožňuje pitvat komplexní séra reagující s mnoha molekulami HLA a přiřadit přesné specifity protilátek. Tyto vícečetné reakce jsou často zaměřeny na jeden nebo dva epitopy, které jsou sdíleny mezi několika molekulami HLA I. nebo II. třídy. Další výhodou při využívání SAG v metodě Luminex je možnost jasného označení protilátek namířených proti lokusům jako jsou HLA-DRB1, HLA-DRB3, -DRB4, -DRB5, HLA-DQB1 a HLA-DPB1. (Tait et al., 2009).



Obrázek 9 Princip metody Luminex (Ranjan et al., 2016)

3 NGS

3.1 Popis

NGS (next-generation sequencing), v překladu „sekvenování nové generace“, popisnější název je masivně paralelní sekvenování, protože DNA nebo RNA je purifikována, fragmentována a sekvenována jako jednotlivé řetězce nukleotidů, viz obrázek 10 (Eisenbrey, 2021c).

Pokroky v počítačové technologii, miniaturizaci a nových technologiích sekvenování umožnily provádět simultánní sekvenování nukleotidových fragmentů odvozených z cílených oblastí nebo celých genomů. Izolované klony nukleotidů jsou označené čárovým kódem a sekvenční reakce se provádějí v kapalné fázi, nebo fyzikální separací na pevné fázi. Získané sekvence jsou uspořádány porovnáním překrývajících se sekvencí z každého klonu a porovnáním s knihovnami sekvencí. Před používáním NGS zlepšila HLA rozlišení, protože v každé reakci je sekvenováno jen jedno vlákno DNA, což snižuje nejednoznačnost typování, protože lze lépe přiřadit rozdíly mezi jednotlivými nukleotidy (Eisenbrey, 2021c).

Masivní schopnost sekvenování NGS umožňuje široký výzkum molekul HLA a klinické použití v různých oblastech transplantací. Díky zahrnutí technologií NGS do rutinní klinické práce je možná hloubková charakterizace celé délky genových sekvencí HLA, tím poskytuje optimální HLA párování dárce-příjemce pro transplantaci orgánu (Yin et al., 2021).

Vyvinuty jsou již neinvazivní testy NGS ke kvantifikaci bezbuněčné DNA, odpadá u nich nutnost předchozí genotypizace dárce a příjemce a nahrazení invazivních biopsií (Yin et al., 2021).

Pokroky v NGS umožňují sekvenovat co nejvíce polymorfismů jednotlivých nukleotidů (SNP). Kromě toho lze do stejného běhu NGS začlenit detekci minimálního reziduálního onemocnění k monitorování relapsu onemocnění. NGS také nabízí možnost sekvenování MICA, MICB a KIR ke studiu jejich rolí při transplantacích (Yin et al., 2021).

3.2 Kontrola kvality IHIW

International HLA and Immunogenetics Workshop (IHIW), v překladu Mezinárodní Workshop HLA a Imunogenetiky, je organizace zabývající se typizací HLA systému a imunogenetiky v laboratorních zařízeních.

Na prvním workshopu o testování histokompatibility v roce 1964 se sešla komunita pro typizaci tkání, za účelem sdílení a hodnocení buňky, činidla i metody typizace s cílem pochopit rozdíly mezi testy a identifikovat osvědčené postupy pro typizaci tkání. Během posledních 50 let sloužilo 15 následných IHIW jako fóra pro výměnu znalostí a zkušeností, hodnocení nových metod, stanovení technologických standardů a rozvoj probíhajících projektů spolupráce. Za účelem získání vysoce kvalitních a definitivních výsledků pro každý z těchto workshopů zavedli jejich organizátoři požadavky na kontrolu kvality pro zúčastněné laboratoře. Tato kontrolní cvičení zahrnovala předběžné testování slepých vzorků nebo zahrnutí slepých reagencií. Pouze laboratoře, které splnily tyto požadavky, mohly předávat údaje pro centrální analýzu (Osoegawa et al., 2019).

Když byly metody molekulárního typování, založené na PCR, poprvé zkoumány na 11. setkání IHIW, bylo známo pouze 189 alel HLA. Do 16. setkání IHIW přibývalo metod PCR a Sangerova sekvenování založené na SBT, bylo již známo 7527 alel HLA. Avšak rozdíly v metodách typizace založených na PCR a metodách SBT znesnadňovaly pochopení toho, jak lze informace určující alely HLA nejlépe využít pro klinické a výzkumné účely. Od 16. srazu IHIW se za prostředek k řešení těchto výzev považuje technologie genotypizace založená na sekvenování nové generace (NGS), která může potenciálně sekvenovat celé HLA geny (Osoegawa et al., 2019).

V Kalifornii roku 2017 se konalo 17. setkání IHIW, které se zaměřovalo na aplikaci NGS pro histokompatibilitu, imunogenetiku a imunogenomiku. Setkání mělo být především příležitostí, zavést metody NGS do zúčastněných laboratoří. Tato pracoviště se snaží o osvojení si a dále zdokonalení jejich metody NGS, popřípadě její vylepšení. Ačkoliv uplynulo více než 50 let, cíl těchto snah je do značné míry stejný jako v prvním histokompatibilním workshopu (Osoegawa et al., 2019).

3.3 Používané platformy NGS technologie

Nové techniky sekvenování DNA poskytují vysokou rychlost a propustnost, takže projekty sekvenování genomu, které trvaly několik let Sangerovou technikou, lze nyní dokončit během několika týdnů (Ansorge, 2009).

Výhodou platforem je stanovení sekvenčních dat z amplifikovaných jednotlivých fragmentů DNA, což eliminuje potřebu klonování těchto fragmentů. Omezujícím faktorem nové technologie zůstává celková vysoká cena za generování sekvence s velmi vysokou propustností, i když ve srovnání se Sangerovým sekvenováním jsou základní náklady o několik řádů nižší. Redukce chyb sekvenování je dalším faktorem, v tomto ohledu zůstává Sangerova metoda v blízké budoucnosti konkurenceschopná. Další omezení v některých aplikacích jsou krátké délky čtení, zvláště zhoršující se kvalita 3´-sekvence v technologiích s malými délkami čtení v homopolymerních úsecích identických bází. Obrovské množství dat generovaných těmito systémy ve formě krátkých čtení přestavuje další výzvu pro vývojáře softwaru a efektivnější počítačové algoritmy (Ansorge, 2009).

3.3.1 Přístroj 454 GenomeSequencer FLX

Základem tohoto zařízení je princip detekce pyrofosfátu, který byl popsán již v roce 1985 a o tři roky později byl popsán v nové metodě pro sekvenování DNA (Ansorge, 2009).

Přístroj GS byl vyvinut společností 454 Life Sciences jako první systém nové generace na trhu a byl představen v roce 2005. V tomto systému jsou fragmenty DNA ligovány se specifickými adaptéry, které způsobují navázání jednoho fragmentu na kuličku. Emulzní PCR se provádí pro amplifikaci fragmentu, s vodními kapičkami obsahujícími jednu kuličku a PCR reagenty ponořenými do oleje. Když jsou dokončeny amplifikační cykly PCR a zároveň zdenaturovány, je každá kulička se svým jedním amplifikovaným fragmentem umístěna na horní konec vlákna v čipu optického vlákna, vytvořeného ze svazků skleněných vláken. Jednotlivá skleněná vlákna jsou vynikajícími světlovody, přičemž jejich druhý konec směřuje k citlivé kameře, což umožňuje poziční detekci vyzařovaného světla. Každá kulička tak sedí na adresovatelné pozici ve světlovodném čipu, který obsahuje několik set tisíc vláken s připojenými kuličkami. V dalším kroku se ke kuličkám přidá polymerázový enzym a primer a do reakční směsi se ke všem kuličkám na čipu přivede pouze jeden neznačený nukleotid,

aby mohla začít syntéza komplementárního řetězce. Začlenění následující báze polymerázovým enzymem do rostoucího řetězce uvolňuje pyrofosfátovou skupinu, kterou lze detekovat jako emitované světlo. Přítomnost světelného signálu naznačuje další bázi začleněnou do sekvence rostoucího řetězce DNA (Ansorge, 2009).

Metoda nedávno zvýšila dosaženou délku čtení na základní rozsah 400-500, a jako taková se aplikuje na genomové (bakteriální, lidské, zvířecí) sekvenování. Mezi několika uváděnými nevýhodami tohoto způsobu jsou relativně vysoké provozní náklady a obecně nižší přesnost čtení v homopolymerních úsecích identických bází (Ansorge, 2009).

3.3.2 Genomový Analyzér Illumina (Solexa)

Ilumina a Solexa jsou názvy společností, které propůjčily svůj název genomovému analyzéru. Společnost Illumina získala společnost Solexa v roce 2007. Jde tedy o spojení společností do jedné velké korporace (Ansorge, 2009).

Princip je založen na chemii sekvenování syntézou, s novými reverzibilními terminátorovými nukleotidy pro čtyři báze, z nichž každá je značena jiným fluorescenčním barvivem, a speciálním enzymem DNA polymerázy, který je schopen je zabudovat. Fragmenty DNA jsou ligovány na obou koncích k adaptérům a po denaturaci jsou imobilizovány na jednom konci na pevném nosiči. Povrch nosiče je hustě potažen adaptéry a doplňkovými adaptéry. Každý jednořetězcový fragment vytváří můstkovou stavbu hybridizací svým volným koncem s doplňkovým adaptérem na povrchu nosiče. Ve směsi obsahující reagenty pro amplifikaci PCR působí adaptéry na povrchu jako primery pro následující amplifikaci PCR. Je zapotřebí amplifikace, aby se získala dostatečná intenzita světelného signálu pro spolehlivou detekci přidaných bází. Po několika cyklech PCR, se na povrchu vytvoří náhodné shluky asi 1000 kopií jednořetězcových fragmentů DNA, nazývány jako „DNA polonies“, protože po amplifikaci polymerázy připomínají kolonie buněk. Reakční směs pro sekvenční reakce a syntézu DNA je dodávána na povrch a obsahuje primery, terminátorový nukleotid, značený jiným fluorescenčním barvivem a DNA polymerázou. Po začlenění do řetězce DNA je terminátorový nukleotid, stejně jako jeho poloha na nosném povrchu, detekován a identifikován pomocí svého fluorescenčního barviva CCD kamerou. Terminační skupina 3´ konci báze a fluorescenční barvivo se následně odstraní z báze a cyklus syntézy je poté opakován. Délka čtení sekvence dosažená

v opakovaných reakcích je asi 35 nukleotidů. Sekvenci nejméně 40 milionů „polonies“ lze současně určit paralelně, což vede k velmi vysoké propustnosti sekvence, řádově Gb (Ansorge, 2009).

V roce 2008 společnost Illumina představila modernizaci analyzátoru Genome Analyzer II, který ztrojnásobuje výkon ve srovnání s původním genomovým analyzátorem. Efektivněji zobrazuje shluky DNA na větších plochách a zaznamenává data z více než 50 milionů čtení na průtokovou buňku. Doba běhu cyklů se taktéž zkrátila (Ansorge, 2009).

3.3.3 ABI SOLiD systém

Sekvenční systém ABI SOLiD využívá chemii založenou na vazbách, byl představen ke konci roku 2007 (Ansorge, 2009).

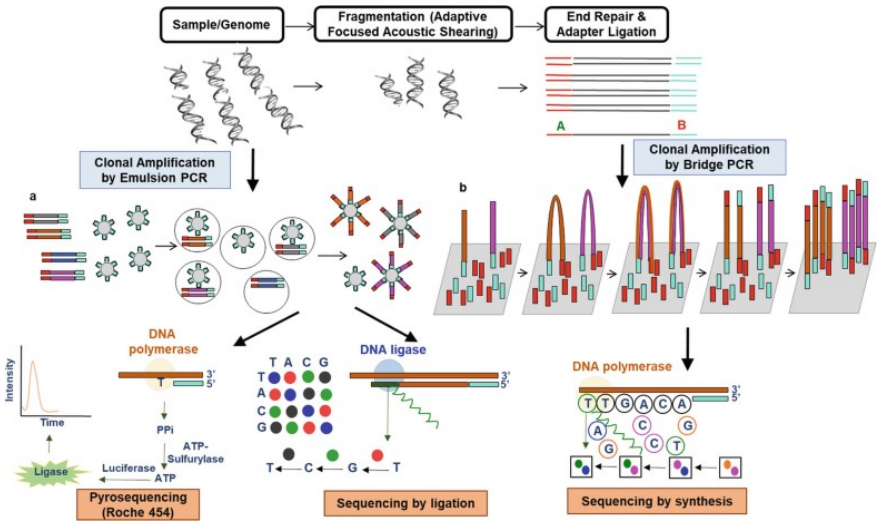
V této technice jsou DNA fragmenty ligovány na adaptéry a poté navázány na kuličky. Emulze vodní kapky v oleji obsahuje amplifikační činidla a pouze jeden fragment vázaný na kuličku. Fragmenty DNA na kuličkách jsou amplifikovány pomocí emulzní PCR. Po denaturaci DNA se kuličky ukládají na skleněný povrch. V prvním kroku je primer hybridizován s adaptérem. Dále se hybridizuje směs oligonukleotidových oktamerů s fragmenty DNA a přidá se vazebná směs. V těchto oktamerech je dublet čtvrté a páté báze charakterizován jednou ze čtyř fluorescenčních značek na konci oktameru. Po zjištění fluorescence ze značky se stanoví báze 4 a 5 v sekvenci. Ligované oktamerové oligonukleotidy se odštěpí po páté bázi odstraněním fluorescenční značky, potom se opakují cykly hybridizace a ligace, tentokrát se stanová báze 9 a 10. V následujícím cyklu jsou stanoveny základy 14 a 15 atd. Proces sekvenování může pokračovat stejně, ovšem s jiným primerem, kratším o jednu bázi, než měl předchozí, to umožňuje v následujících cyklech určit báze 3 a 4, 8 a 9, 13 a 14. Délka je v současné době asi 35 bazí. Protože každá báze je stanovena s jinou fluorescenční značkou, chybovost je snížena. Sekvence lze určit paralelně pro více než 50 milionů shluků kuliček, a to vede k velmi vysoké propustnosti (Ansorge, 2009).

3.3.4 Přístroj HeliScope

Společnost Helicos představila první komerční jedno molekulární systém sekvenování DNA HeliScope v roce 2007. Přístroj HeliScope pracuje na principu fragmentů nukleových kyselin, které jsou hybridizovány s primery kovalentně ukotvenými v náhodných pozicích na skle krycího sklíčka v průtokové komoře. Na skleněný podklad se přidá primer, enzym polymerázy a značené nukleotidy. Další báze začleněná do syntetizovaného řetězce je stanovena analýzou emitovaného světelného signálu technikou sekvenování syntézou. Tento systém také analyzuje mnoho milionů jednotlivých fragmentů DNA současně, následkem je propustnost sekvence v Gb. Systém byl testován a validován v několika aplikacích se slibnými výsledky (Ansorge, 2009).

3.3.5 Ion Torrent

Platforma Ion Torrent využívá sílu polovodičové technologie detekující protony uvolněné jako nukleotidy, které jsou začleněny během syntézy. Fragmenty DNA se specifickými sekvencemi adaptéru jsou spojeny a poté klonálně amplifikovány pomocí emulzní PCR na povrchu kuliček, známých jako částice iontových koulí. Templátové kuličky jsou vloženy do jamek pro snímání protonů, které jsou vyrobeny na křemíkové destičce a sekvenování je aktivováno ze specifického místa v sekvenci adaptéru. Každá ze čtyř bází se zavádí postupně. Pokud jsou tyto báze začleněny, uvolní se protony a detekuje se signál úměrný počtu začleněných bází (Quail et al., 2012).



Obrázek 10 Princip metody NGS (Gupta & Verma, 2019)

3.4 Výhody a překážky ve využívání metody NGS

Tradiční metody typizace HLA molekul, jako je SBT, PCR-SSO, PCR-SSOP, obvykle pokrývají pouze exony 2 až 4 pro HLA I. třídy a exony 2 a 3 pro II. třídu. Kvůli neúplnému pokrytí genů HLA jsou běžné fázovací nejednoznačnosti (cis/trans) a nejednoznačnosti způsobené polymorfními nukleotidovými rozdíly mimo sekvenční oblasti. Více než 50 % nejasností vykazuje i Sangerovo sekvenování, proto se v roce 2014 přešlo na NGS. Klíčovou výhodou NGS oproti Sangerovu sekvenování je to, že NGS může fázovat velké množství variant sekvencí v HLA genech do haplotypů s minimální cis/trans nejednoznačností (Yin et al., 2021; Liu et al., 2020).

Současné typizační přístupy NGS však pokrývají všechny exony a většinu intronů genů HLA, a proto tyto nejednoznačnosti významně snižují. Přes tyto velké výhody NGS postupovala implementace technologie v klinických diagnostických laboratořích pomalu. Mezi výzvy implementace NGS patří vysoké počáteční náklady na instalaci, výzvy ve školení kvůli složitému pracovnímu toku, delší doba obratu ve srovnání se stávajícími metodami a strmá křivka učení (Yin et al., 2021).

Kromě toho má tato nová technologie potenciál pomoci zlepšit porozumění biologii HLA, která se pohybuje daleko za rámec jednoduché charakterizace alely a v regulaci, transkripci a expresi těchto genů (Profaizer et al., 2016).

3.5 Perspektiva nanopórů

Technologie NGS způsobila v posledních letech revoluci ve čtení HLA s vysokým rozlišením. Mnoho klinických laboratoří rychle přijalo tyto technologie pro HLA typizaci pacientů a dárců ve formě komerčně dostupných testů nebo laboratorně vyvinutých testů. Tento posun v metodice typizace HLA umožnily dva typy platforem, a to ty, které generují krátké sekvenční čtení stovek základen (např. 454 Roche, Ilumina, Ion Torrent) a samostatná platforma PacBio, která generuje dlouhá čtení tisíců a více základen (Liu, 2020).

Přicházejí další inovace v biotechnologiích a postupně se vyvíjejí alternativní strategie typizace HLA, které se nespoléhají na metodu PCR, jako je hybridní zachycení genů HLA následované NGS, aby se překonala omezení vypadávání PCR a alelické nerovnováhy.

Objevují se nové a robustní nástroje pro odvození typizace pomocí dat ze sekvenování celého genu (WGS), sekvenování celého exomu a sekvenování RNA (Liu, 2020).

Sekvenování nanopórů na zařízení MinION je splněno transmembránovými proteinovými kanály s nanoskopickými otvory, které jsou dostatečně velké na to, aby mohly projít jednovláknové polymery nukleových kyselin. Pór je umístěn na elektricky odolné membráně, která odděluje dva napěťové oddíly. Během translokace jednovláknové DNA přes póry mohou být změny iontových proudů kontinuálně zaznamenávány senzory. Signály jsou následně segmentovány jako diskrétní události a výpočetně dešifrovány do posunujících se nukleotidových sekvencí zabírajících póry. Další důležitou chemickou složkou je enzym helikáza nebo motorický protein, který odvíjí dvouvláknovou DNA a táhne jednovláknovou DNA přes póry. Takto řízený proces zvýší poměr signálu k šumu, umožní pak rozlišení jedné báze v nukleotidu (Liu, 2020).

Průměrná rychlost translokace jednotlivých řetězců DNA póry je 450 bází za sekundu. Jakmile je řetězec zcela translokován, bude okamžitě k dispozici stejný pór pro sekvenování dalšího řetězce. Celkem 512 aktivních kanálů, z nichž každý se skládá ze skupiny čtyř nanopórů, a vše vloženo do průtokové kyvety MinIOn. Vysokého výkonu lze dosáhnout sekvenováním molekul DNA, které postupně procházejí stovkami aktivních pórů v průtokové cele. Pole sekvenčních kanálů na průtokové komoře je namontováno na senzorické pole a aplikačně specifický integrovaný obvod, který je připojen k základně MinION prostřednictvím konektorových kolíků. Celé zařízení váží kolem 100 gramů (Liu, 2020).

3.5.1 Výhody a nevýhody sekvenování nanopórů

Nanopórové sekvenování je jedinou technologií NGS nezávislou na syntéze DNA katalyzovanou polymerázou. Díky několika atraktivním funkcím je tato metoda slibnou volbou pro širokou škálu klinických a výzkumných aplikací. První výhodou jsou rychlé a flexibilní protokoly, které mohou účinně zkrátit čas od vzorku k samostatným datům. Druhou výhodou je produkce extrémně dlouhého čtení tisíců až milionů bází, a to je omezeno pouze velikostí fragmentů DNA. Pro analýzu genomiky jsou tato dlouhá čtení vhodná pro fázování vzdálených variant a dotazování strukturních variant a oblastí s nízkou složitostí, které byly slabostí pro platformy soustředěné na krátká čtení sekvencí. Třetí výhodou je cenová dostupnost zařízení MinION. Začtvrté, MinION je přenosné zařízení schopné

dodávat NGS bez konvenčních omezení prostoru a času. A poslední výhodou je rozlišování nejen běžné báze DNA, ale také uracilu v RNA a nukleových bázích s epigenetickými modifikacemi, jako je methylace, a tato jedinečná schopnost vede genomický výzkum do nezmapovaného území přímého sekvenování RNA a genomové molekuly DNA (Liu, 2020).

Výše uvedené vlastnosti sekvenování nanopórů mohou potenciálně řešit několik nesplněných potřeb v oblasti typizace HLA a výzkumu imunogenetiky. Na druhou stranu je míra chyb nanopórových sekvencí přibližně 10 až 15 %. Zůstává výrazně vyšší než u sekvencí pro krátká čtení. Míra chyb čtení nanopórů je ovlivněna algoritmem. Vzhledem ke složitosti genů HLA s koncentrovaně zabalenými jednonukleotidovými variantami, bude úspěch sekvenování nanopórů v typizaci HLA záviset na neustálém zlepšování přesnosti čtení a vývoji robustních nástrojů k překonání přetrvávajících chyb (Liu, 2020).

3.6 Techniky sekvenování DNA

Vývoj dalších technik sekvenování DNA probíhá po celém světě. Vědec Church vyvinul techniku podobné metodě sekvenování syntézou s technologií multiplexní polony. Několik stovek sekvenčních šablon je uloženo na tenké agarózové vrstvy a sekvence jsou stanoveny paralelně. To představuje nárůst počtu řádů, které lze analyzovat současně. Další výhodou je velké snížení reakčních objemů, menší množství potřebných činidel a výsledné nižší náklady (Ansorge, 2009).

Další slibný přístup, který se pokouší použít stanovení jedné sekvence DNA v reálném čase, vyvíjí společnost VisiGen Biotechnologies. Vyrobili speciálně konstruovanou DNA polymerázu, která funguje jako senzor v reálném čase pro modifikované nukleotidy, s dárcovským fluorescenčním barvivem zabudovaným v blízkosti aktivního místa zapojeného do selekce nukleotidů během syntézy. Všechny čtyři nukleotidy, které mají být integrovány, byly modifikovány a každý s jiným akceptorovým barvivem. Během syntézy, pokud je nalezen správný nukleotid, je vybrán a vstupuje do aktivního místa enzymu. Značka dárcovského barviva v polymeráze se dostává do těsné blízkosti s akceptorovým barvivem na nukleotidech a energie se přenáší z donorového na akceptorové barvivo, což vede ke světelnému signálu pro přenos fluorescenční rezonanční energie (zkratka FRET).

Frekvence tohoto signálu se liší v závislosti na značce zabudované do nukleotidů, takže záznamem frekvencí emitovaných signálů FRET bude možné určit sekvence bází rychlostí, jakou polymeráza může integrovat nukleotidy během procesu syntézy. Akceptorový fluorofor je odstraněn během inkorporace nukleotidů, poté nedochází k žádným modifikacím DNA, které by mohly zpomalit polymerázu během syntézy (Ansorge, 2009).

Americká společnost Pacific Biosciences oznámila, že pracuje na nástroji pro sekvenování DNA nové generace. Jedno molekulární technologie v reálném čase společnosti je založena na vlnovodech s nulovým režimem, které byly původně vyvinuty v Nanobiotechnologickém centru na Cornell University. Vlnovody s nulovým režimem jsou aperturní komory v měřítku nanometrů v kovovém filmu o síle 100 nm nanesené na čirý substrát. Vzhledem k chování světla zaměřeného na tak malou komoru je pozorovací objem pouze 20 zeptolitrů, a to umožňuje výzkumníkům měřit fluorescenci nukleotidů zabudovaných jediným enzymem DNA polymerázy do rostoucího řetězce DNA v reálném čase (Ansorge, 2009).

Následující technologií bude vývoj nanoelektronických zařízení pro vysoce výkonné sekvenování jedné molekuly DNA s potenciálem určovat dlouhé genomové sekvence. Je to na základě elektrické charakterizace jednotlivých nukleotidů, zatímco DNA prochází nanopórem s integrovanými postranními elektrodami nanotrubiček. Litograficky vyrobený nano otvor je vyroben s přesností na jeden nanometr a umožňuje charakterizovat tunelovou vodivost napříč bázemi DNA a elektrickou odezvu translokace molekuly DNA mezi dvěma uhlíkovými nanotrubičkovými elektrodami. Rychlost translokace DNA nanopórem se bude měnit optickým pinzetovým systémem s cílem dosáhnout rozlišení jedné báze. Další zdokonalení a úpravy této techniky, zvýšení počtu parametrů měřených během translokace DNA umožňující rozlišení jedné báze, by mohly vést k rychlé technice sekvenování DNA na bázi nanopóru (Ansorge, 2009).

Společnost Sequenom má licencovanou technologii z Harvardské univerzity, aby vyvinula sekvenční platformu založenou na nanopórech, která bude rychlejší a levnější než v současnosti dostupné technologie. V nejbližší době jej plánují využít pro genotypové aplikace ve velkém měřítku, RNA a epigenetické analýzy. Z dlouhodobého hlediska má potenciál poskytnout komerčně životaschopné, rychlé řešení pro sekvenování lidského genomu. Tato technologie byla také licencována společností Oxford Nanopore Technologies, UK (Ansorge, 2009).

Seskupení BioNanomatrix a Complete Genomics v roce 2007 oznámily vytvoření společného podniku a vývoj technologie pro sekvenování lidského genomu. Navrhovaná platforma využívá chemickou sekvenci Complete Genomics a nanofluidní technologii BioNanomatrix. Plánovali přizpůsobit sekvenování DNA lineárním zobrazením DNA v nanoměřítku, aby vytvořily systém, který dokáže číst sekvence DNA větší než 100 000 bází. Svým vzhledem a cenou se zaměřují na možné sekvenování mnoha genomů (Ansorge, 2009).

Nedávno byl představen velmi odlišný přístup k sekvenování jedné molekuly pomocí RNA polymerázy. V plánované metodě je RNA polymeráza připojena k jedné polystyrénové kuličce, zatímco distální konec fragmentu DNA je připojen k další kuličce. Každá kulička je umístěna v optické pasti a dvojice optických pastí zvedají kuličky. RNA polymeráza se vzájemně ovlivňuje s fragmentem DNA a transkripční pohyb RNA polymerázy podél šablony mění délku DNA mezi dvěma kuličkami. To vede k vytěsnění dvou kuliček a rozlišení jedné báze na jedné molekule DNA. Porovnáním záznamů o posunu, z nichž každý má nižší hustotu nukleotidů, roli analogické s primery použitými v Sangerově sekvenování, a použití pro kalibraci známých sekvencí lemujících neznámý fragment, který má být sekvenován, je možné vyvodit informace o sekvenci. Taková technika ukazuje, že pohyb enzymu nukleové kyseliny a metoda velmi citlivé optické pasti nabízejí možnost extrakce sekvenčních informací z jedné molekuly (Ansorge, 2009).

3.7 Budoucí vývoj

Výběr sekvenčních platforem a činidel do značné míry závisí na objemu vzorku, době zpracování, nákladech a pracovním postupu v klinické laboratoři. V současné době komerční reagencie splňují přesnou HLA typizaci navzdory fázovým nejasnostem některých genů HLA II. třídy. U NGS s krátkým čtením budou sekvence z homologních oblastí mít špatnou kvalitu mapování, a to způsobí nedostatečné pokrytí. Pro repetitivní oblasti je nutná jedinečná sekvence lemující opakující se oblast. Tento problém lze vyřešit delším přečtením sekvence. Dvě nové platformy pro sekvenování, označované jako sekvencery třetí generace, mohou poskytovat delší sekvenční čtení jedné molekuly (PacBio, SMRT, Oxford Nanopore) (Yin et al., 2021).

Sekvencer PacBio používá několik drobných jamek, z nichž každá má DNA polymerázu připojenou ke dnu jedním dlouhým fragmentem DNA. Po přidání báze k řetězci

DNA je detekován fluorescenční signál značeného nukleotidu odpovídající přídavku jednoho specifického nukleotidu (Yin et al., 2021).

Oxford Nanopore používá proteinové póry vložené do membrány k měření fluktuací iontového proudu, když jednovláknové nukleové kyseliny procházejí biologickými nanopóry. Jednotlivé nukleotidy propůjčují různým odporům úsek nukleové kyseliny v póru (Yin et al., 2021).

Důležité je, že žádná z těchto dvou platforem nevyžaduje krok zesílení, čímž se sníží hluk pozadí. Na druhou stranu mají větší chybovost ve srovnání s metodami sekvenování druhé generace. U PacBio může replikované sekvenování stejné molekuly překonat vysokou míru chyb, protože chyby jsou náhodné. Replikované sekvenování ale nemůže překonat chyby u Oxford Nanopore, protože tyto chyby jsou předpojaté. Přesnost čtení vytvořených oběma platformami se v poslední době dramaticky zvýšila. Tvrdí se, že chybovost byla snížena na méně než 1 % pro PacBio a méně než 5 % pro O. Nanopore. Přesto tyto sekvencery mají omezená přijetí v klinické laboratoři kvůli jejich vyšší ceně, nižší propustnosti a možná kvůli výzvám klinicky validujících nástrojů s vysokou mírou vnitřní chyby (Yin et al., 2021).

V budoucnosti se očekává, že implementace technologie NGS v laboratořích běžné diagnostiky bude neustále růst. Výhody sekvenování intronů a nepřekládaných oblastí genů HLA výrazně zvýší naše znalosti v transplantační imunologii a mohou vést ke zlepšeným výsledkům. S vývojem sekvenování třetí generace s dlouhým čtením bude možné lepší fázování haplotypu HLA a porozumění rolím dalších imunitních regulačních genů v oblasti HLA, které jsou nezbytné pro přesnou péči o pacienta (Yin et al., 2021).

ZÁVĚR

Bakalářská práce na téma Molekulární metody typizace HLA alel se zabývá problematikou hlavního histokompatibilního komplexu člověka (HLA) a jeho detekcí alel skrze staré i novodobé technologie typizace.

První kapitola stručně popisuje historii HLA komplexu až po současnou dobu. Uvádím zde také vědce, kteří díky výzkumu v této oblasti získali Nobelovu cenu, jeden z nich je například Peter Medawar. Kromě historie je zde popsána i funkce v organismu, celková charakteristika včetně rozdělení do tříd a v neposlední řadě asociace s chorobami.

Druhá část se věnuje konkrétním metodám typizace. Mezi nejstarší technologie pro určení HLA alel slouží sérologické metody, kam patří hlavně lymfocytotoxický test a smíšené lymfocytární kultury. Většina sérologických metod je založená na principu detekce protilátek anti-HLA. Mezi nejrozšířenější technologie typizace HLA molekul řadíme genotypizace neboli DNA metody. Jsou to metody založené na principu polymerázové řetězové reakce (PCR), jejímž hlavním úkolem je sekvence DNA. Existuje několik typů PCR, které přehledně popisuji v teoretické části práce. Uvádím i několik speciálních metod jako je metoda mikročipu a Luminex, které využívají například fluorescenční záření.

Poslední segment se zabývá sekvenováním nové generace (NGS). Je to metoda sloužící k určení HLA alel, která má slibnou budoucnost v inovaci. Momentálně není zcela využívána v klinických laboratořích kvůli falešně pozitivním nebo negativním výsledkům. Má výhody i nevýhody a časem se zdokonalí na nejvyšší úroveň bezchybnosti.

Výzkum HLA alel je významný z hlediska spojení s různými nemocemi, a především v transplantaci. I v této technologicky pokročilé době nejsou stále objeveny všechny HLA alely. Proto je zapotřebí zdokonalovat typizační metody a inovovat celý výzkum.

Dle mého názoru je výzkum v oblasti HLA systému velice důležitý. Díky aktuálním informacím, které máme, můžeme lépe zhodnotit, jestli pacient ponese pozitivní výsledky z transplantace, můžeme dát do souvislosti vážná onemocnění způsobená konkrétní alelou a dojít tak k léčebným procesům. Velice mě zaujala složitost HLA komplexu a kolik typizačních metod skutečně existuje. O některých metodách jsem se dozvěděla teprve z výzkumu, tudíž předpokládám, že nejsou všem známé.

POUŽITÁ LITERATURA

AMBRŮZOVÁ, Zuzana, 2002. OSN-SAbstraktOSN-E MLC test. *ČLS-Společnost alergologie a klinické imunologie* [online] [vid. 2021-04-12]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/ILACK.htm

ANSORGE, Wilhelm J., 2009. *Next-generation DNA sequencing techniques* [online]. 1. duben 2009. B.m.: Elsevier. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2008.12.009

ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE, 2019. *Nomenclature for Factors of the HLA System* [online]. Dostupné z: http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html

BÍLKOVÁ, Zuzana a Lucie KORECKÁ, 2012. Antigen. *Univerzita Pardubice - projekt INCHEBIO* [online] [vid. 2021-04-12]. Dostupné z: doi:CZ.1.07/2.2.00/07.0139

CABRERA, C. M., F. COBO, A. NIETO, J. L. CORTÉS, R. M. MONTES, P. CATALINA a A. CONCHA, 2006. *Identity tests: Determination of cell line cross-contamination* [online]. 2006. [vid. 2021-06-27]. ISSN 09209069. Dostupné z: doi:10.1007/s10616-006-9013-8

CAMPO, C. A., N. WELLINGHAUSEN, C. FABER, A. FISCHER a L. RINK, 2001. Zinc inhibits the mixed lymphocyte culture. *Biological Trace Element Research* [online]. **79**(1), 15–22 [vid. 2021-04-11]. ISSN 01634984. Dostupné z: doi:10.1385/BTER:79:1:15

CHARRON, D., 2011. *HLA, immunogenetics, pharmacogenetics and personalized medicine* [online]. 1. leden 2011. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd. [vid. 2021-05-08]. ISSN 00429007. Dostupné z: doi:10.1111/j.1423-0410.2010.01438.x

CREATIVE BIOLABS, 2021a. *Sequence-specific Primer (PCR-SSP) Technology - Creative Biolabs* [online] [vid. 2021-06-27]. Dostupné z: https://www.creative-biolabs.com/sequence-specific-primer-pcr-ssp-technology.html

CREATIVE BIOLABS, 2021b. *Sequencing-based Typing (PCR-SBT) Technology - Creative Biolabs* [online] [vid. 2021-06-27]. Dostupné z: https://www.creative-biolabs.com/sequencing-based-typing-pcr-sbt-technology.html

DOXIADIS, Ilias I.N. a Frans H.J. CLAAS, 2003. *The short story of HLA and its methods.* [online]. 2003. B.m.: Dev Ophthalmol. [vid. 2021-04-11]. ISSN 02503751. Dostupné z: doi:10.1159/000067651

EISENBREY, Arthur Bradley, 2021a. HLA typing by molecular methods. In: *HLA from Benchtop to Bedside* [online]. B.m.: Elsevier, s. 89–110. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-823976-6.00007-x

EISENBREY, Arthur Bradley, 2021b. HLA typing by serologic methods. In: *HLA from Benchtop to Bedside* [online]. B.m.: Elsevier, s. 85–88. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-823976-6.00006-8

EISENBREY, Arthur Bradley, 2021c. Massively parallel (next generation) sequencing. In: *HLA from Benchtop to Bedside* [online]. B.m.: Elsevier, s. 111–117. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-823976-6.00008-1

GARFIN, David E., 1990. Isoelectric focusing. *Methods in Enzymology* [online]. **182**(C), 459–477. ISSN 15577988. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(90)82037-3

GUPTA, Nidhi a Vijay K. VERMA, 2019. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. In: [online]. B.m.: Springer, Singapore, s. 313–341 [vid. 2021-06-27]. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-8844-6_15

HOWELL, W. M., 2014. *HLA and disease: Guilt by association* [online]. 1. únor 2014. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd. [vid. 2021-05-08]. ISSN 17443121. Dostupné z: doi:10.1111/iji.12088

HURLEY, Carolyn Katovich, 2020. *Naming HLA diversity: A review of HLA nomenclature* [online]. 2020. ISSN 18791166. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2020.03.005

KENNEDY, L. J., K. V. POULTON, P. A. DYER, W. E.R. OILIER a W. THOMSON, 1995. Definition of HLA-C alleles using sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). *Tissue Antigens* [online]. **46**(3), 187–195 [vid. 2021-04-18]. ISSN 13990039. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0039.1995.tb03118.x

LA MURAGLIA, G. M., M. J. O'NEIL, M. L. MADARIAGA, S. G. MICHEL, K. S. MORDECAI, J. S. ALLAN, J. C. MADSEN, I. M. HANEKAMP a F. I. PREFFER, 2015. A novel approach to measuring cell-mediated lympholysis using quantitative flow and imaging cytometry. *Journal of Immunological Methods* [online]. **427**, 85–93 [vid. 2021-04-12]. ISSN 18727905. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2015.10.005

LEE, K.-R, E PARK, S H MOON, J.-M KIM, O.-J KWON, M H KIM, Y.-H SOHN, S.-Y KO a H.-B OH, 2008. Development and clinical evaluation of a microarray for HLA-A and-DRB1 genotyping [online]. ISSN 0001-2815. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01154.x

LIU, Chang, 2020. A long road/read to rapid high-resolution HLA typing: The nanopore perspective. *Human Immunology* [online]. ISSN 01988859. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2020.04.009

LIU, Chang, Brian F. DUFFY, Eric T. WEIMER, Maureen C. MONTGOMERY, Jo Ellen JENNEMANN, Rachel HILL, Donna PHELAN, Lindsay LAY a Bijal A. PARIKH, 2020. Performance of a multiplexed ampliconbased next-generation sequencing assay for HLA typing. *PLoS ONE* [online]. **15**(4), e0232050 [vid. 2021-04-25]. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0232050

MITTAL, B., P. CHATURVEDI a S. TULSYAN, 2013. Restriction Fragment Length Polymorphism. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* [online]. s. 190–193 [vid. 2021-04-18]. ISBN 9780080961569. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01314-0

NOWAK, Jacek, Renata MIKA-WITKOWSKA a Elżbieta GRACZYK-POL, 2012. Genetic Methods of HLA Typing. In: *Molecular Aspects of Hematologic Malignancies* [online]. 1. vyd. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-29467-9_21

OSOEGAWA, Kazutoyo, Tamara A. VAYNTRUB, Sabine WENDA, Dianne DE SANTIS, Konstantinos BARSAKIS, Milena IVANOVA, Susan HSU, Jonathan BARONE, Rhonda HOLDSWORTH, Mary DIVINEY, Medhat ASKAR, Amanda WILLIS, Dawn RAILTON, Sophie LAFLIN, Ketevan GENDZEKHADZE, Arisa OKI, Nicoletta SACCHI, Michela MAZZOCCO, Marco ANDREANI, Reem AMEEN, Catherine STAVROPOULOS-GIOKAS, Amalia DINOU, Margareth TORRES, Rodrigo DOS SANTOS FRANCISCO, Carles SERRA-PAGES, Damian GOODRIDGE, Sandra BALLADARES, Maria P. BETTINOTTI,

Brian IGLEHART, Zahra KASHI, Russell MARTIN, Chee Loong SAW, Jiannis RAGOUSSIS, Jonathan DOWNING, Cristina NAVARRETE, Winnie CHONG, Katsuyuki SAITO, Martin PETREK, Stana TOKIC, Karin PADROS, Ma BEATRIZ RODRIGUEZ, Viktoria ZAKHAROVA, Olga SHRAGINA, Susana R. MARINO, Nicholas K. BROWN, Takashi SHIINA, Shingo SUZUKI, Eric SPIERINGS, Qiuheng ZHANG, Yuxin YIN, Gerald P. MORRIS, Ana HERNANDEZ, Phillip RUIZ, Seik Soon KHOR, Katsushi TOKUNAGA, Aviva GERETZ, Rasmi THOMAS, Fumiko YAMAMOTO, Kalyan C. MALLEMPATI, Sridevi GANGAVARAPU, Uma KANGA, Shweta TYAGI, Steven G.E. MARSH, Will P. BULTITUDE, Xiangjun LIU, Dajiang CAO, Maarten PENNING, Carolyn K. HURLEY, Anne CESBRON, Claudia MUELLER, Joannis MYTILINEOS, Eric T. WEIMER, Mats BENGTSSON, Gottfried FISCHER, John A. HANSEN, Chia Jung CHANG, Steven J. MACK, Lisa E. CREARY a Marcelo A. FERNANDEZ-VIÑA, 2019. Quality control project of NGS HLA genotyping for the 17th International HLA and Immunogenetics Workshop. In: *Human Immunology* [online]. B.m.: Elsevier Inc., s. 228–236. ISSN 18791166. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2019.01.009

OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ, 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. B.m.: Karolinum Praha. ISBN 978-80-246-2109-8.

PALMISANO, Giulio Lelio, Laura DELFINO, Monica FIORE, Anna LONGO a Giovanni Battista FERRARA, 2005. Single nucleotide polymorphisms detection based on DNA microarray technology: HLA as a model. In: *Autoimmunity Reviews* [online]. B.m.: Elsevier, s. 510–514. ISSN 15689972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2005.04.011

PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ, 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3460-6.

PERNG, Cherng Lih, Lei Fa CHANG, Wen Chun CHIEN, Tsung D. LEE a Jin Biou CHANG, 2012. Effectiveness and limitations of resolving HLA class I and class II by heterozygous ambiguity resolving primers (HARPs)-a modified technique of sequence-based typing (SBT). *Clinical Biochemistry* [online]. **45**(16–17), 1471–1478. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.05.023

PROFAIZER, T., E. LÁZÁR-MOLNÁR, D. W. CLOSE, J. C. DELGADO a A. KUMÁNOVICS, 2016. HLA genotyping in the clinical laboratory: Comparison of next-generation sequencing methods. *HLA* [online]. **88**(1–2), 14–24 [vid. 2021-05-08]. ISSN 20592310. Dostupné z: doi:10.1111/tan.12850

PROFAIZER, Tracie a Attila KUMÁNOVICS, 2018. *Human Leukocyte Antigen Typing by Next-Generation Sequencing* [online]. 1. prosinec 2018. B.m.: W.B. Saunders. ISSN 15579832. Dostupné z: doi:10.1016/j.cll.2018.07.006

QUAIL, Michael A., Miriam SMITH, Paul COUPLAND, Thomas D. OTTO, Simon R. HARRIS, Thomas R. CONNOR, Anna BERTONI, Harold P. SWERDLOW a Yong GU, 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* [online]. **13**(1), 341 [vid. 2021-05-08]. ISSN 14712164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-13-341

RANJAN, Koushlesh, Prasad MINAKSHI a Gaya PRASAD, 2016. Application of Molecular and Serological Diagnostics in Veterinary Parasitology. *The Journal of Advances in Parasitology* [online]. **2**(4), 80–99 [vid. 2021-06-27]. Dostupné z: doi:10.14737/journal.jap/2015/2.4.80.99

ROVENSKÝ, J. a J. PAYER, 2009. MLC (mixed-lymphocyte culture). In: *Dictionary of Rheumatology* [online]. Vienna: Springer Vienna, s. 134–134 [vid. 2021-04-11]. ISBN 978-3-211-79280-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-211-79280-3_718

SAGAR, Aryal, 2018. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) | Molecular Biology | Microbe Notes* [online] [vid. 2021-06-27]. Dostupné z: https://microbenotes.com/restriction-fragment-length-polymorphism-rflp/

SCHWAB, Manfred, 2011. *Encyclopedia of Cancer - Knihy Google* [online]. 3rd vyd. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg [vid. 2021-05-11]. ISBN 978-3-642-16482-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-16483-5

SHANKARKUMAR, U., A. PAWAR a K. GHOSH, 2008. *Implications of HLA sequence-based typing in transplantation* [online]. 1. leden 2008. B.m.: Medknow Publications. [vid. 2021-04-20]. ISSN 00223859. Dostupné z: doi:10.4103/0022-3859.39192

SMIALOWICZ, Ralph J., 2016. Mixed Lymphocyte Reaction. In: *Encyclopedia of Immunotoxicology* [online]. s. 621–622 [vid. 2021-06-27]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-54596-2_1006

SUN, Da-wen, 2008. DNA-Based Technique: Polymerase Chain Reaction (PCR). In: *Modern Techniques for Food Authentication* [online]. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-08-088616-9. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMTFA000D/modern-techniques-food/modern-techniques-food

TAIT, Brian D., Fiona HUDSON, Linda CANTWELL, Gemma BREWIN, Rhonda HOLDSWORTH, Greg BENNETT a Matthew JOSE, 2009. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology* [online]. **14**(2), 247–254 [vid. 2021-04-25]. ISSN 13205358. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1797.2008.01074.x

THORSBY, E., 2009. *A short history of HLA* [online]. 1. srpen 2009. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd. [vid. 2021-04-09]. ISSN 00012815. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x

VOORTER, Christina E.M., Fausto PALUSCI a Marcel G.J. TILANUS, 2014. Sequence-based typing of HLA: An improved group-specific full-length gene sequencing approach. *Methods in Molecular Biology* [online]. **1109**, 101–114 [vid. 2021-04-20]. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-9437-9_7

WELSH, K. a M. BUNCE, 1999. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP - PubMed. *Rev Immunogenet.* [online] [vid. 2021-04-18]. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11253945/

YIN, Yuxin, Carrie BUTLER a Qiuheng ZHANG, 2021. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Human Immunology* [online]. [vid. 2021-04-25]. ISSN 01988859. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2021.03.011