

## POLYMORFISMUS HLAVNÍHO HISTOKOMPATIBILNÍHO SYSTÉMU ČLOVĚKA: FUNKCE – INDIKACE – DETEKCE – INTERPRETACE

MARIE DOBROVOLNÁ, MILENA VRANÁ  
a JAN EVANGELISTA DYR

Ústav hematologie a krevní transfúze Praha, U Nemocnice  
2094/1, 128 00 Praha 2  
marie.dobrovolna@uhkt.cz

Došlo 1.7.14, přijato 5.8.14.

Klíčová slova: hlavní histokompatibilní systém, systém lidských leukocytárních antigenů HLA, imunita

### Obsah

1. Úvod
2. HLA systém
  - 2.1. Klasifikace HLA a jeho biologická funkce
  - 2.2. HLA polymorfismus a jeho názvosloví
3. Klinické indikace k vyšetření
  - 3.1. Asociace s chorobami
  - 3.2. Farmakogenetika
  - 3.3. Transplantační a transfúzní problematika
4. Metody stanovování HLA polymorfismu
5. Interpretace laboratorních výsledků
6. Závěr

### 1. Úvod

Hlavní histokompatibilní systém (MHC – Major Histocompatibility Complex), u člověka představovaný HLA systémem (Human Leukocyte Antigens), je skupina těsně vázaných genetických lokusů kódujících tři různé třídy polypeptidů, které hrají výraznou roli v imunitním systému, v jeho fungování a regulaci. Produkty MHC jsou nazývány molekulami MHC a bývají také označovány jako transplantační antigeny (původně popsány při studiu přenosu tkání), ale jejich význam je mnohem širší a zásadnější. Zajišťují odlišení vlastních a cizích buněk, selekci při vývoji lymfocytů a rozpoznání intra- i extracelulárních patogenů. Geny tohoto systému, strukturně patřící do imunoglobulinové superrodiny, určují vrozené parametry imunitního systému, vnímavost k některým chorobám nebo jsou přímo asociované s onemocněním.

Odhalování molekulárně biologických příčin řady nemocí ukazuje, že jejich spouštěčem může být antigenní podnět, na který vznikne chybná imunitní odpověď. Určení vrozených forem HLA genů přispívá k hlubšímu pozná-

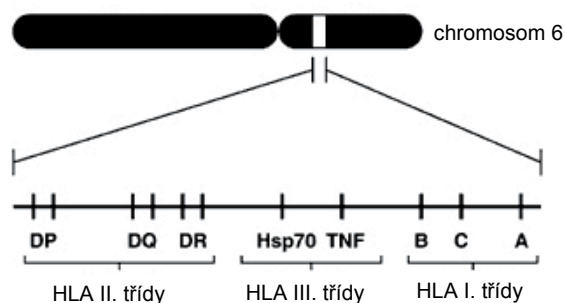
ní mechanismů imunopatogeneze onemocnění a umožňuje vývoj a aplikaci biologicky cílených terapeutických postupů „šitých pacientovi na míru“.

### 2. HLA systém

HLA systém se nachází na krátkém raménku 6. chromosomu a tvoří přibližně jednu tisícinu lidského genomu. Jedná se o oblast s vysokou koncentrací genů na relativně krátkém úseku DNA, která díky svému významu patří k nejlépe prostudovaným úsekům lidského genomu<sup>1-3</sup>. Rozděluje se do několika oblastí, tzv. tříd, ve kterých se nacházejí jednotlivé lokusy (obr. 1) a každý z genů se vyskytuje v řadě odlišných alelických forem. Celá genetická oblast HLA je ve vzájemné vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium) a přenáší se na potomstvo jako celek (maternální a paternální haplotyp). Dědičnost HLA je mendelovského typu a podle 2. Mendelova zákona je mezi sourozenci pravděpodobnost HLA shody 25 %, 50 %, že budou haploidentičtí a 25 %, že zdědí odlišný genotyp (štěpný poměr 1:2:1). Haplotypy se mohou v alelické skupině či alele vzájemně shodovat (homozygotita) nebo lišit (heterozygotní stav), což představuje výhodu pro biologickou funkci imunitního systému a obranyschopnost jedince<sup>4,5</sup>. Rekombinace (porušení vazby v rámci haplotypu) vzniká při meiotickém dělení přibližně s frekvencí 1 %. Geny HLA I. a II. třídy jsou kodominantní a s výjimkou přítomnosti tzv. nulové alely, která se neexprimuje, dochází k expresi obou alel na povrchu buňky.

#### 2.1. Klasifikace HLA a jeho biologická funkce

Úkolem HLA molekul je zajistit odlišení vlastních a cizích buněk, podílet se na výběru funkčních buněk při vývoji lymfocytů (selekcce T-lymfocytů v thymu i B-lymfocytů se řídí podle exprese MHC molekul, jejich



Obr. 1. Uspořádání HLA oblastí

funkčnosti a podle síly reakce s vlastními antigeny) a rozpoznávat intracelulárně a extracelulárně se množící mikroorganismy. Jejich další důležitou funkcí je, že zesilují mezibuněčné kontakty, vyvolané přítomností cizorodé látky. Peptidový fragment se váže svou částí (agretopem) na HLA molekulu, je vystavován na povrchové buněčné membráně a zprostředkovává reakci buňky s receptorem T-lymfocyty (oblast epitopu). Skladba peptidů (substrátů) vázaných HLA molekulou je dána jednak strukturou vazebného žlábků na HLA molekule, ale je také ovlivněna tím, jak se antigen dostává do buňky, jakými mechanismy je degradován a jaké buněčné cesty vedou k vazbě peptidu na HLA, zejména v endosomálních kompartmentech. Proto většinu navázaných peptidů tvoří ty, které pocházejí z exogenně endocytovaných bílkovin nebo z endogenních bílkovin, které se mohou dostat do endosomů. HLA molekuly jsou (nejenom v imunitním systému) jedinečné tím, že mají poměrně vysokou afinitu a přitom nevelkou specificitu ke svým ligandům.

#### HLA I. třídy (tzv. klasické) – geny HLA-A, HLA-B, HLA-C

Molekula HLA I. třídy (obr. 2) je heterodimer skládající se z polymorfního transmembránového řetězce  $\alpha$  a s ním nekovalentně asociovaného nepolymorfního  $\beta$  řetězce tvořeného  $\beta_2$ -mikroglobulinem ( $\beta_2m$ ), který není zakotven v cytoplasmatické membráně. Oba řetězce se řadí do rodiny imunoglobulinů. V  $\alpha$  řetězci rozlišujeme 3 domény, z nichž dvě N-terminální ( $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ ) tvoří vazebné místo pro peptidy ve tvaru rýhy na povrchu proteinu, třetí doména  $\alpha_3$  leží v rovině pod nimi a spolu s  $\beta_2m$  tvoří dno vazebného žlábků. Jeho struktura určuje specificitu molekuly HLA I. třídy při vazbě rozpoznávaného peptidového fragmentu (heptapeptidu), důležitou roli hraje přítomnost koncových aminokyselinových zbytků. V místě vazby N-terminální části peptidu se na HLA molekule nacházejí hlavně tyrosinové zbytky. V místě vazby C-terminální části peptidu jsou na HLA molekule tyrosinové a lysinové zbytky. Postranní aminokyselinové řetězce jsou zodpovědné za vznik vodíkových můstků a iontových interakcí, které stabilizují komplex MHC-peptid. Geny pro HLA I. třídy mají celkem 6 exonů, ale pouze sekvence 2. a 3. exonu, kódujících  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  doménu, určuje strukturu vazebného žlábků a je tedy důležitá pro určení HLA alely<sup>2</sup>.

HLA molekuly I. třídy vystavují peptidy, které vznikly štěpením bílkovin vzniklých v cytosolu (např. množním viru), tj. endogenní peptidové fragmenty vzniklé degradací intracelulárních proteinů. K tomu stačí i malé množství fragmentů, které produkují proteolytické enzymy v proteosomu závislé na ATP a ubiquitinu. Aby peptidové fragmenty pronikly membránou do endoplasmatického retikula (ER) k nově syntetizovaným HLA molekulám, musejí zdolat energetickou bariéru. O přechod membránou se stará pumpa z rodiny ABC transportérů. Vazba peptidových fragmentů v ER chrání HLA molekuly před proteolytickou degradací. Enzymy proteosomu i bílkoviny transportéru jsou také kódované v oblasti MHC a jsou tak regulovány společně. Komplex peptidu s HLA molekulou I. třídy je pak vystavován na buněčné membráně CD8+

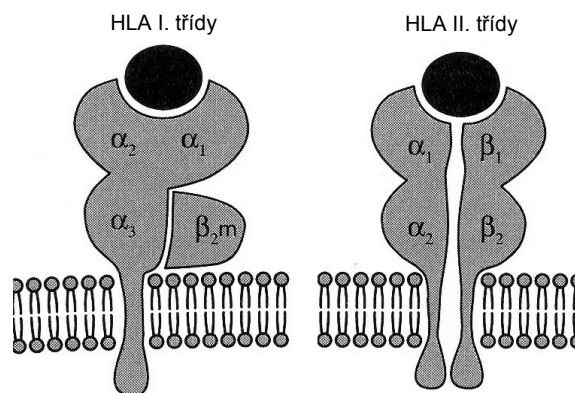
cytotoxickým T-lymfocytům (CD – Cluster of Differentiation, číslo označuje danou povrchovou molekulu). Uvedené klasické HLA I. třídy se exprimují na všech somatických jaderných buňkách, nejvíce ale na buňkách imunitního systému. Jejich exprese na ostatních buněčných typech je snížena a podléhá změně pod vlivem cytokinů<sup>2</sup>.

Tzv. neklasické HLA I. třídy se exprimují tkáňově specificky (např. HLA-E, -G na buňkách trofoblastu) a hrají roli v nastolení imunotolerance mezi matkou a plodem<sup>6,7</sup>. Exprese HLA-F je omezena na B-buňky a lymfoidní tkáně. Neklasické HLA I. třídy pravděpodobně hrají roli v imunotoleranci vůči maligně transformovaným buňkám<sup>8</sup>.

#### HLA II. třídy

HLA II. třídy obsahuje tzv. -D region, který se rozděluje do 3 podoblastí označovaných -DR, -DQ a -DP. V -DR podoblasti je 10 HLA genů, ze kterých jen 5 kóduje na membráně exprimované HLA molekuly. Molekula HLA II. třídy je heterodimer složený ze dvou nekovalentně asociovaných transmembránových podjednotek ( $\alpha$  a  $\beta$ ) přibližně stejné délky (obr. 2). Každá podjednotka se skládá z 2 extracelulárních domén a transmembránové kotvící sekvence. N-terminální domény obou řetězců (tj.  $\alpha_1$  a  $\beta_1$ ) společně vytvářejí vazebné místo pro peptidy. Tyto geny mají pouze 5 exonů, a z hlediska funkčnosti je nejdůležitější analýza polymorfismu oblasti vazebného žlábků kódovaného 2. exonem. Vazebná doména je sice podobná vazebné doméně HLA I. třídy, ale je mělčí a na koncích otevřená, takže umožňuje vazbu delších peptidových fragmentů (15–35 aminokyselin)<sup>4</sup>.

Molekuly HLA II. třídy váží fragmenty bílkovin extracelulárního původu, které se dostanou do buňky v endosomu a jsou degradovány v jeho kyselém prostředí. Nemusí být „pumpovány“ přes žádnou membránu. Protože jsou molekuly HLA II. třídy velmi labilní a snadno agregují, jsou stabilizovány vazbou s invariantním řetězcem (nepolymorfní bílkovina), která zabraňuje navázání endogenních peptidů v ER a dále v sekretorické dráze. Invariantní řetězec se váže na HLA molekuly se strukturálně odlišnými vazebnými žlábků, protože kotvící aminokyseli-



Obr. 2. Struktura molekul HLA I. třídy a II. třídy (cit.<sup>4</sup>)

nové zbytky tvoří buď flexibilní methionin, nebo aminokyseliny, které mohou poskytnout minimální nevhodné kontakty, např. alanin. Intracelulární protein HLA-DM katalyzuje v endosomech výměnu invariantního řetězce za peptidový fragment antigenu. K prezentaci peptidů může dojít i bez účasti těchto dvou přídatných faktorů, které ale pravděpodobně mají výraznou úlohu ve výběru prezentovaných peptidů.

Molekuly HLA II. třídy váží uvedeným mechanismem heterogenní soubor peptidů, vystavují je na povrchu antigen prezentujících buněk (APC – Antigen Presenting Cells), jako jsou B-lymfocyty, dendritické buňky a makrofágy, pomocným T-lymfocytům CD4+. Jsou exprimovány také na některých střevních epiteliálních buňkách.

Receptory CD8+ cytotoxických T-lymfocytů a CD4+ pomocných T-lymfocytů rozpoznávají pouze antigen vázaný v komplexu s HLA molekulou na APC, což má zajistit, aby „zdravý“ T-lymfocytární systém rozvíjel odpověď pouze na ty podněty prostředí, které vyžadují imunitní reakci a vedou k produkci odpovídajících protilátek proti antigenu<sup>9</sup>.

#### HLA III. třídy a minoritní histokompatibilní antigeny (mHAg)

Mezi oblastmi HLA I. a II. třídy leží oblast HLA III. třídy s geny kódujícími solubilní faktory jako složky komplementu a cytokiny. Studium jejich polymorfismu a funkce je předmětem výzkumu, stejně jako významu mHAg (cit.<sup>2</sup>), které jsou peptidovými fragmenty buněčných bílkovin prezentovanými HLA molekulami na povrchu buněk.

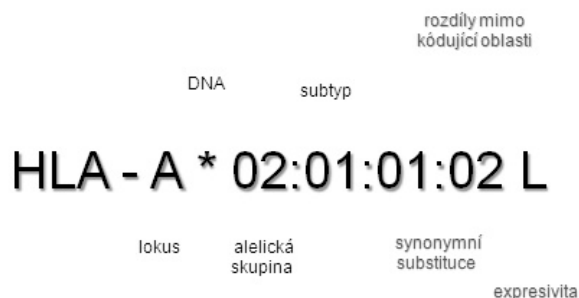
### 2.2. HLA polymorfismus a jeho názvosloví

Genetický polymorfismus znamená existenci více než jedné normální alely v jednom genetickém lokusu (v případě HLA až stovek alel) s populačním výskytem vyšším než 1 %. V průběhu evoluce vznikl mutacemi, delecemi nebo inzercemi při zachování sekvenční a strukturální homologie. S počtem dostupných genotypizačních dat (bezmála 24 miliónů dárců kostní dřeně, vyšetřovaní pacienti) neustále vzrůstá počet známých HLA alel a podrobné údaje jsou aktuálně dostupné na internetu (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>).

Potřeba přehledného názvosloví vedla již v roce 1968 k založení Nomenklaturního výboru světové zdravotnické organizace (WHO) pro faktory HLA a postupně bylo názvosloví dále zdokonalováno, ale nárůst počtu známých alel vedl v roce 2010 k nutnosti změny HLA nomenklatury<sup>10</sup>, aby bylo vůbec možné nové alely systematicky zařazovat a pojmenovávat podle sekvenční podobnosti. Hlavním přínosem bylo zavedení rozdělovačů (:) do názvu alel, čímž byla odstraněna dříve omezená alelická čtyřčíselná řada „4-digit“ a stala se tak v podstatě nekonečnou (obr. 3).

Pro nejednoznačné výsledky nalezeného polymorfismu bylo aplikováno v roce 2010 také řazení alel do P skupin (mají identickou proteinovou sekvenci kódova-

### HLA nomenklatura – označení alely



Obr. 3. Ukázka tvorby názvu HLA alely podle současného názvosloví

nou u HLA I. třídy exony 2 a 3, u HLA II. třídy exonem 2) a G skupin (v uvedených exonech mají identickou nukleotidovou sekvenci). Aplikace zařazování alel do P skupin umožňuje racionálně vyjadřovat výsledek podle biologické specifity.

Příklad: HLA-C\*07:02P = \*07:02:01:01/07:02:01:03/07:50, kdy se uvedené alely od sebe liší mimo sekvenci 2. a 3. exonu.

### 3. Klinické indikace k vyšetření HLA

#### 3.1. Asociace s chorobami

Známé asociace HLA polymorfismu s onemocněním nebo zvýšenou predispozicí k němu jsou dostupné na internetu (<http://geneticassociationdb.nih.gov>) a bývají důvodem ke klinické indikaci vyšetření.

Mezi nejčastější indikace izolovaného HLA znaku je testování HLA-B27 pozitivitu u ankylosující spondylitidy<sup>11</sup> (Bechtěrevova nemoc) a u spondyloartrapatií (chronická systémová zánětlivá revmatická onemocnění pohybového aparátu nebo dalších tkání). Základní příčina těchto onemocnění není zcela známá, ale zdá se, že tkví v porušeném imunitním systému jako reakci na infekci (např. Salmonella, Shigella, Yersinia, Campylobacter a Chlamydia)<sup>12</sup>. Průkaz rizikového antigenu HLA-B27 u revmatoidních onemocnění je prováděn jen pro vyloučení diagnózy a není součástí doporučených vyšetřovacích schémat (<http://www.revmatologicka-spolecnost.cz/doporucene-postupy-crs>).

Z neurologických onemocnění je pravděpodobně nejznámější asociace mezi HLA-DQB1\*06:02 alelou jako dědičnou dispozicí s narkolepsií s kataplexií<sup>13</sup>. U nemocných dochází autoimunitním procesem k destrukci budivých hyporetinových neuronů v hypotalamu. V letech 2009–2010 byl pozorován vzestup incidence onemocnění u dětí v Číně po pandemii chřipky H1N1 a ve Skandinávii po vakcinaci proti tomuto chřipkovému viru

vakcínou Pandemrix<sup>14</sup>. Vyšetření HLA-DQB1\*06:02 pozitivita a -DQB1\*06:03 negativita u narkolepsie je součástí klinického standardu pro diagnostiku a léčbu narkolepsie (<http://www.czech-neuro.cz/data/1/0/O/KS-pro-diagnostiku-a-lecby-nar.pdf>).

Dalším druhem neurologického onemocnění autoimunitní povahy je roztroušená skleróza (RS), kdy imunitní systém způsobuje rozpad myelinových pochv izolujících neuronové výběžky, takže nervové vzruchy nejsou přenášeny efektivně<sup>15</sup>. HLA typizace zde není standardně prováděna, ale při léčbě je aplikována imunomodulační léčba nebo transplantace kostní dřeně<sup>16,17</sup>.

Až 70 % imunologicky aktivních buněk se nachází na slizničním povrchu střev, kde interagují s antigenními podněty z potravy. Nejčastější poruchou trávení je celiakie, geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění spojené s přítomností specifických HLA epitopů, které vážou gliadinové zbytky z lepku přijímaného v potravě, a tím spouštějí vlastní onemocnění<sup>18</sup>. Kromě neprospívajících dětí, dnes bývají vyšetřováni i dospělí s nejasnými příznaky onemocnění (zažívací potíže, únavový syndrom, kožní problémy, neurologické potíže)<sup>19</sup>. Jsou identifikovány HLA genotypy pacientů, z nichž 95 % má HLA-DQA1\*05/HLA-DQB1\*02 (označováno nepřesně jako DQ2), dalším je HLA-DQA1\*03:01 a DQB1\*03:02 (někdy nepřesně označováno DQ8). Uvedené genotypy HLA se vyskytují i u zdravých osob (cca 20 % zdravé populace ČR), takže přítomnost uvedených haplotypů nelze interpretovat jako potvrzení této diagnózy bez dalších vyšetření. Indikace a postupy vyšetření jsou popsány v platných léčebných standardech (<http://lekari.cgs-cls.cz/guidelines>).

### 3.2. Farmakogenetika

Příkladem již standardně prováděného testování interakce mezi léčivem a vrozeným HLA znakem je vyšetření HLA-B\*57:01 pozitivita u HIV+ před zahájením antivirotické léčby<sup>20</sup>, protože u pacientů s touto HLA alelou byl zjištěn rozvoj hypersenzitivní reakce při podání léčiva abacavir.

### 3.3. Transplantační a transfúzní problematika

Nejčastější komplexní HLA testování je prováděno pro transplantační programy solidních orgánů (ledviny, játra, srdce, plíce, slinivka břišní a tenké střevo), kdy je nejdůležitější, aby nedošlo k odmítnutí tkáně imunitním systémem pacienta<sup>21</sup>, čemuž se předchází výběrem co nejšhodnějšího dárce (typizace HLA transplantačních lokusů, křížová zkouška, tzv. cross-match). Imunosupresní léčba umožňuje i transplantace orgánů, u kterých je hlavním parametrem výběru jejich dostupnost a fyzické parametry (např. srdce).

Maximální míra HLA shody<sup>22</sup> je požadována při transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT – Hematopoietic Stem Cell Transplantation), která je jediným způsobem vyléčení některých hematologických ma-

lignit, metabolických poruch a imunodeficiencí<sup>23</sup>. Transplantace následuje po přípravném režimu (eliminace krvetvorby a imunity příjemce) jako převod multipotentních dospělých kmenových buněk (CD34+) od příbuzného nebo nepříbuzného dárce (alogenní transplantace). Po převodu začne štěp dárce buněk uplatňovat svůj geneticky vrozený funkční program s cílem obnovit krvetvorbu a zajistit adopci imunitního systému dárce. Po provedené HSCT je žádoucí brzká obnova antiinfekční imunity (GvI – Graft versus Infection), u maligních onemocnění reakce štěpu proti zbytku nádorových buněk (GvL – Graft versus Leukemia)<sup>24</sup>. Vzhledem ke komplexnosti imunogenicity štěpu však transplantované buňky mohou vyvolat také reakci štěpu proti hostiteli (GvHD – Graft versus Host Disease)<sup>25</sup>, která v různé intenzitě může postihovat různé tkáně a může se demonstrovat podobně jako autoimunitní onemocnění (sklerodermie, Sjögrenův syndrom). HLA shoda a rozvoj potransplantačních reakcí je hodnoceným parametrem úspěšnosti HSCT a jsou dostupná celosvětově hodnocená data ([www.cibmtr.org](http://www.cibmtr.org), [www.ebmt.org](http://www.ebmt.org)).

V transfúzním lékařství je indikováno serologické vyšetření HLA spolu s testem kompatibility séra/plazmy příjemce a lymfocytů/trombocytů dárce u pacientů refrakterních na podání trombokoncentrátů.

## 4. Metody stanovování HLA polymorfismu

Metody pro stanovování HLA antigenů nebo alel jsou voleny podle účelu vyšetření<sup>26</sup>. Serologické metody založené na fungování buněk v podmínkách testu jsou sice nenáročné na vybavení laboratoře a materiálové náklady, ale mají vysoké požadavky právě na kvalitu a stav testovaných buněk.

Základní metodou pro detekci HLA polymorfismu na DNA úrovni je řetězová polymerasová reakce (PCR) jako enzymatické *in vitro* zmnožení vybraného úseku DNA a následnou detekcí po elektroforéze v agarózovém gelu použitím interkalačního fluorescenčního činidla (např. ethidium bromidu) nebo jiným způsobem. DNA je izolována vyšetřované osobě zpravidla z periferní krve, stěru bukalních sliznic, slin nebo jiných tkání. V současnosti jsou rozšířené metody založené na separaci DNA pomocí magnetických partikulí (prováděné ručně, na poloautomatických či automatických). V případě dodatečného nároku na množství DNA lze použít metodu celogenomové amplifikace (WGA – Whole Genome Amplification) pro namnožení zbytkového vzorku DNA<sup>27</sup>. Biologický materiál lze archivovat na kartách FTA (Fast Technology for Analysis of Nucleic Acids)<sup>28</sup>.

Metody genotypizace HLA polymorfismu prošly od 80. let 20. století významným vývojem<sup>29</sup>. Volba vhodné PCR metody se odvíjí především od požadovaného stupně rozlišení stanovovaného genotypu (alelická skupina/alela).

Pro případy, kdy je sledován pouze polymorfismus vybraných alelických skupin nebo pouze vybrané alelické formy, je vhodná metodika PCR, kdy jsou namnožené amplicony po denaturaci hybridizovány se sekvenčně spe-

cifickými nukleotidy (PCR-SSO) nebo sekvenčně specifickými sondami (PCR-SSOP) vázanými na membránách (stripy) a po odmytí jsou specificky navázané fragmenty vizualizovány barevnou enzymatickou reakcí a je provedeno vyhodnocení barevného vzoru. Jednou z prvních široce používaných metod je i v současnosti rozšířená PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP). Při ní jsou používány primery specifické přímo pro daný lokus či alelickou skupinu (odlišné sety primerů) a je založena na detekci bodových mutací (SNPs – Single Nukleotide Polymorphisms). Jestliže 3' konec PCR primeru odpovídá pozici báze polymorfního genu, dojde k amplifikaci, jestliže shodné nejsou, amplifikace selže. Používaná Taq polymerasa nemá 3', 5' exonukleasovou aktivitu, takže tyto rozdílné amplifikace neopraví. Použitím této metody lze upřesňovat nejednoznačné výsledky HLA genotypizace získané zejména přímým sekvenováním (SBT). Výhodou PCR-SSP diagnostických kitů je, že ke každé primerové směsi je přidán další primerový pár jako vnitřní pozitivní kontrola úspěšné amplifikace.

Přesné určení sekvence (pořadí) nukleotidů testovaného úseku DNA se provádí metodou přímého sekvenování (SBT – Sequence Based Typing) Sangerovou metodou<sup>30</sup>. Výsledkem je určení sledu jednotlivých bází v testovaném vzorku DNA. Pro lokusy HLA I. třídy je prováděna sekvenace exonů 2 a 3 (event. i 4) v obou směrech, pro lokusy HLA II. třídy je prováděna sekvenace exonu 2 a dalších doplňkových sekvencí v závislosti na použitém kitu. Při analýze získaných sekvencí je výsledek (detegovaná alela) určen porovnáním testované sekvence s databází sekvencí jednotlivých známých alel HLA systému v daném lokusu specializovaným softwarem. Tato referenční sekvence je pravidelně aktualizována a vychází z platné verze alelové databáze (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>).

V poslední době se začínají pro vyšetření HLA využívat i nové technologie založené na pyrosekvenování (NGS – Next Generation Sequencing)<sup>31,32</sup>. Tato technologie se prozatím uplatňuje při řešení výzkumných projektů a v laboratorních registrech nepřibuzných dárců hematopoetických buněk, protože její předností, mezi které patří zejména ekonomičnost provozu a vysoká kapacita analýz, se projevuje až při pravidelné genotypizaci velkého počtu vzorků.

## 5. Interpretace laboratorních výsledků

Vyhodnocení vlivu jednotlivých HLA alel na zvýšené riziko onemocnění ztěžuje skutečnost, že HLA geny jsou ve vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium). Určité haplotypy jsou v populaci tedy častější, než by odpovídalo počtu jejich pravděpodobnosti z pravděpodobností jednotlivých HLA alel v populaci. Vzhledem k populačním frekvencím (<http://www.allelefrequencies.net>) a incidenci onemocnění je nutné rozlišovat mezi HLA-asociovaným rizikem získat určité onemocnění a s HLA spojenou senzitivitou k progresi patologického procesu. Proto asi největší výpovědní hodnotu má tzv. relativní riziko, které ukazuje, kolikrát častěji vzniká nemoc u jedinců s „rizikovou“ alelou ve srovnání s jedinci bez této alely. Obezřetná interpre-

tace je na místě např. v případech, kdy není nalezen celý asociovaný haplotyp.

Výsledek vyšetření HLA by kromě správného genotypu měl obsahovat i komentář opírající se o údaje o populační frekvenci a spolu s výsledky dalších vyšetření by měl umožnit lékařovi přijmout správné klinické závěry.

## 6. Závěr

Článek podává přehled o HLA jako hlavním histokompatibilním systému člověka, o jeho struktuře a funkci v imunitním systému, informuje o jeho úloze u vybraných onemocnění a seznamuje s nejrozšířenějšími způsoby jeho laboratorního vyšetření analýzou DNA. Imunita byla původně úzce chápána jako schopnost organismu nedostat určitou infekci, „nenakazit se“. Dnes víme, že se jedná o komplexní systém mechanismů namířených proti (makro)molekulárním strukturám odlišným od struktur vyskytujících se ve vlastním těle, mechanismů odstraňování nefunkčních vlastních struktur a starých či poškozených buněk, udržování homeostázy nebo regulace onkogeneze a obrany proti vlastním transformovaným buňkám nádorů.

Špatná nebo nepřiměřená funkce imunitního systému se projeví jako onemocnění, při kterém může imunitní systém reagovat přespříliš – hypersensitivně (např. alergie), nebo naopak nedostatečně, kdy je důsledkem tzv. imunodeficience. Autoimunitní onemocnění je důsledkem třetího závažného selhání imunitního systému – neschopnosti rozlišit vlastní struktury od cizích. Činnost imunitního systému je geneticky předurčena děděnými HLA geny, které se vyskytují s různými frekvencemi ve velkém množství individuálních alelických forem. HLA molekuly jsou jedinečné tím, že mají poměrně vysokou afinitu a přitom nevelkou specificitu ke svým ligandům, jak dokládá existence některých široce křížově reagujících peptidových epitopů. Z funkčního hlediska tak může být HLA polymorfismus limitován víc, než se dříve předpokládalo. Právě proto bude muset být určení individuálního genotypu doplněno o studium jeho funkčního chování v komplexním mechanismu imunitního systému, aby mohla být dále rozvíjena moderní cílená a personalizovaná imunoterapie a biologická léčba.

*Podpořeno projektem Ministerstva zdravotnictví koncepčního rozvoje výzkumné organizace IČ 023736.*

### Seznam použitých zkratk

ABC transportér	ABC transportní protein (ATP Binding Cassette)
APC	antigen prezentující buňka (Antigen Presenting Cell)
CD	diferenční skupina (Cluster of Differentiation)
FTA	Fast Technology for Analysis of nucleic acids
GvHD	nemoc štěpu proti hostiteli (Graft vs Host Disease)

GvI	reakce štěpu proti infekci (Graft vs Infection)
GvL	reakce štěpu proti leukémii (Graft vs Leukemia)
HLA	systém lidských leukocytárních antigenů (Human Leukocyte Antigens)
HSCT	transplantace krvetvorby (Hematopoietic Stem Cell Transplantation)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
NGS	sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
PCR	řetězová polymerázová reakce (Polymerase Chain Reaction)
SBT	přímé sekvenování (Sequence Based Typing)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism)
WGA	celogenomová amplifikace (Whole Genom Amplification)

## LITERATURA

- Mehra N. K. (ed.): *The HLA complex in biology and medicine: a resource book*. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi 2010.
- Browning M., McMichael A.: *HLA and MHC genes, molecules and function*. BIOS Scientific Publishers, Oxford 1996.
- Klein J., Sato A.: *N. Engl. J. Med.* 343, 702 (2000).
- Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R.: *Základy imunologie*. Triton, Praha 2013.
- Shiina T., Hosomichi K., Inoko H., Kulski J. K.: *J. Hum. Genet.* 54, 15 (2009).
- Szekeres-Bartho J.: *Int. Rev. Immunol.* 21, 471 (2002).
- Dahl M., Djuricic S., Hviid T. V.: *J. Immunol. Res.* 2014, art. no. 591489.
- Rouas-Freiss N., Moreau P., LeMaout J., Carosella E. D.: *J. Immunol. Res.* 2014, art. no. 359748.
- Hauptmann G., Bahram S.: *Curr. Opin. Immunol.* 16, 668 (2004).
- Marsh S. G.: *Tissue Antigens* 77, 362 (2011).
- Yang T., Duan Z., Wu S., Liu S., Zeng Z., Li G., Wang S., Fan D., Ye D., Xu S., Zhang L., Pan F.: *Mod. Rheumatol.* 24, 150 (2014).
- Rosenbaum J. T., Lin P., Asquith M., Costello M. E., Kenna T. J., Brown M. A.: *Clin. Rheumatol.* 33, 763 (2014).
- De la Herrán-Arita A. K., García-García F.: *Sleep Disord.* 2014, art. no. 792687.
- Partinen M., Kornum B. R., Plazzi G., Jennum P., Julkunen I., Vaarala O.: *Lancet Neurol.* 13, 600 (2014).
- Sawcer S., Franklin R. J., Ban M.: *Lancet Neurol.* 13, 700 (2014).
- Glanz B. I., Musallam A., Rintell D. J., Chitnis T., Weiner H. L., Healy B. C.: *Int. J. MS Care.* 16, 68 (2014).
- Radaelli M., Merlini A., Greco R., Sangalli F., Comi G., Ciceri F., Martino G.: *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 14, 478 (2014).
- Tronccone R., Discepolo V.: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 59, S9 (2014).
- Fernández A., González L., de la Fuente J.: *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 102, 466 (2010).
- Phillips E., Mallal S.: *Mol. Diagn. Ther.* 13, 1 (2009).
- Geneugelijk K., Thus K. A., Spierings E.: *J. Immunol. Res.* 2014, art. no. 159479.
- Petersdorf E. W.: *Curr. Opin. Immunol.* 5, 588 (2008).
- Hatzimichael E., Tuthill M.: *Stem Cells Cloning* 3, 105 (2010).
- Weisdorf D.: *Best Pract. Res., Clin. Haematol.* 3, 293 (2013).
- Petersdorf E. W.: *Blood* 122, 1863 (2013).
- Wassmuth R.: *Primer on the HLA System*. ecomed Medizin, Landsberg 2010.
- Han T., Chang C. W., Kwekel J. C., Chen Y., Ge Y., Martinez-Murillo F., Roscoe D., Težak Z., Philip R., Bijwaard K., Fuscoe J. C.: *BMC Genomics* 13, 217 (2012).
- Lange V., Arndt K., Schwarzelt C., Boehme I., Giani A. S., Schmidt A. H., Ehninger G., Wassmuth R.: *Tissue Antigens* 83, 101 (2014).
- Erllich H.: *Tissue Antigens* 80, 1 (2012).
- Adams S. D., Barracchini K. C., Simonis T. B., Stroncek D., Marincola F. M.: *Tumori* 87, S40 (2001).
- Gabriel C., Danzer M., Hackl C., Kopal G., Hufnagl P., Hofer K., Polin H., Stabentheiner S., Pröll J.: *Hum. Immunol.* 70, 960 (2009).
- Holcomb C. L., Höglund B., Anderson M. W., Blake L. A., Böhme I., Egholm M., Ferriola D., Gabriel C., Gelber S. E., Goodridge D., Hawbecker S., Klein R., Ladner M., Lind C., Monos D., Pando M. J., Pröll J., Sayer D. C., Schmitz-Agheguian G., Simen B. B., Thiele B., Trachtenberg E. A., Tyan D. B., Wassmuth R., White S., Erllich H. A.: *Tissue Antigens* 77, 206 (2011).

**M. Dobrovolná, M. Vraná, and J. E. Dyr** (*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague*): **Polymorphism of Major Histocompatibility System of Man – Its Function, Indication, Detection and Interpretation**

The major histocompatibility system of man is the genetic system of the human leukocyte antigen, the most polymorphic region of the human genome, which determines the function and individual parameters of the immune system. Faulty immune response to antigenic stimulus may manifest itself as hypersensitivity, immunodeficiency or autoimmunity. Detection of this polymorphism and study of its functional behavior can be of help in elucidation of the pathogenesis of many diseases and thus to contribute to their immunotherapeutic treatment.