

# HLA systém, jeho struktura a funkce

*HLA (Human Leukocyte Antigens) =  
Hlavní histokompatibilní systém  
člověka*

# Historie

- ❖ 1930 – 1940- MHC geny nejdříve rozpoznány u myši na základě pokusů s transplantacemi tumorů u myši
- ❖ 50. léta- charakterizováno několik geneticky podmíněných antigenů
- ❖ 60. – 70. léta- již známy 3 lokusy HLA-A, -B, -C, MHC geny se účastní v imunitní odpovědi
- ❖ 1972- k produkci protilátek B lymfocyty nutná T- buněčná aktivita a také účast HLA molekul
- ❖ 1974- fenomén HLA restrikce ( T lymfocyty rozpoznávají cizorodý antigen pouze v komplexu s HLA molekulami I. nebo II. třídy
- ❖ 80. léta- objev antigenů lokusů HLA-DR, -DQ, -DP
- ❖ další studie vedly k poznání hlavní funkce MHC molekul v imunitní odpovědi
- ❖ 90. léta- objev tzv. neklasických antigenů lokusů HLA-E, -F, -G, -H, -J, -K, -X

# Struktura HLA systému

- ❖ Nejkomplexnější a nejpolymorfnější systém, každý člověk nese unikátní sestavu HLA alel, výjimka – monozygotní dvojčata
- ❖ lokalizace na krátkém raménku 6. chromozomu ( 4100 kb, více než 200 genů )
- ❖ geny uspořádány do 3 oblastí: **HLA I., II., III. třída**

## **HLA I. třída**

- ❖ I. třída obsahuje geny **HLA –A, -B, -C** pro těžký řetězec  $\alpha$  molekul HLA-A, -B, -C
- ❖ povrchové glykoproteiny, exprimovány na téměř všech buňkách (transplantační, klasické )
- ❖ neklasické geny HLA-E, -F, -G (glykoproteiny - omezený výskyt)
- ❖ geny MICA, MICB (MHC Class I Chain-related) na endoteliální bb.
- ❖ pseudogeny

## HLA II. třída

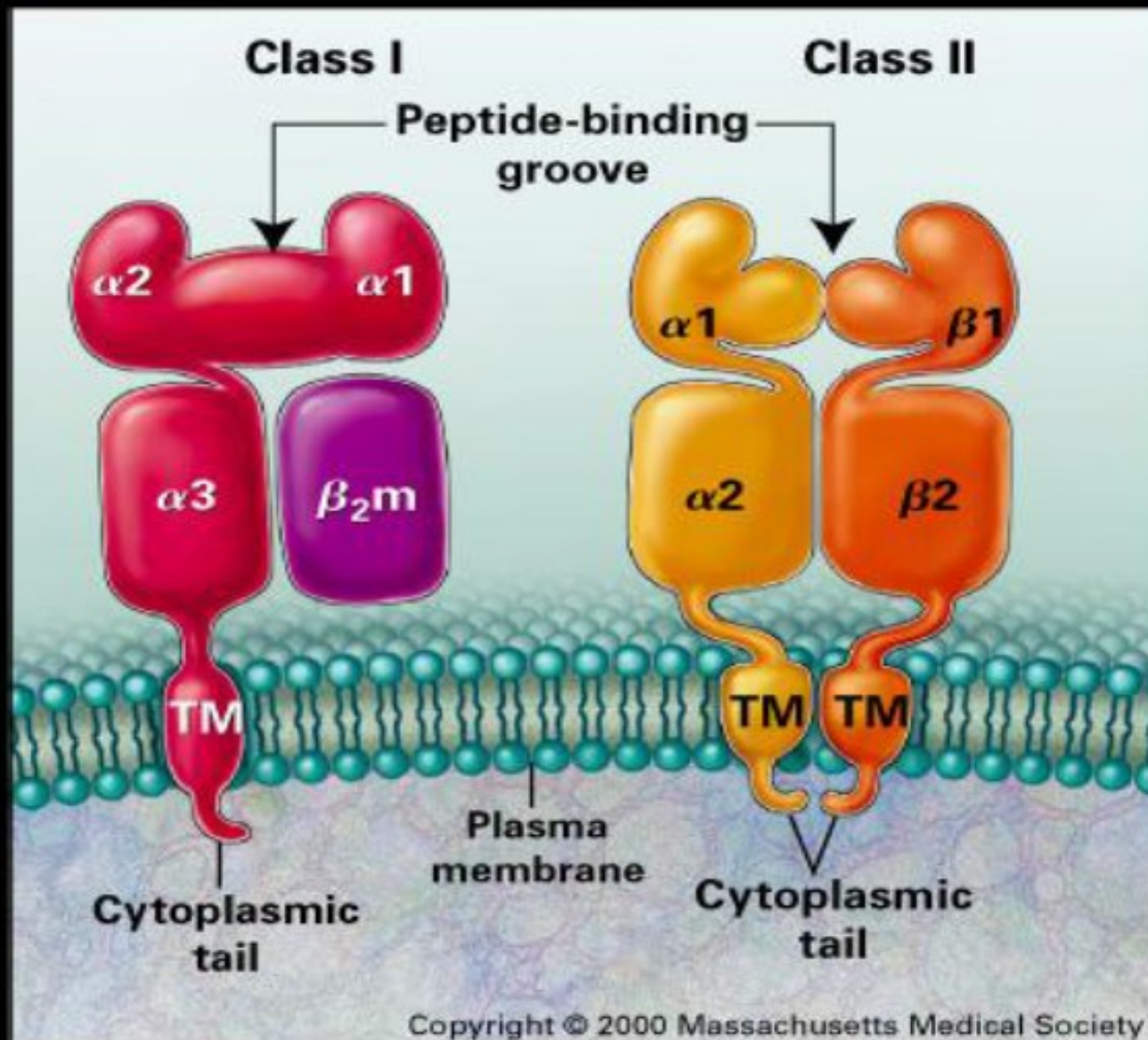
- ❖ geny pro  $-\alpha$  a  $-\beta$  řetězec HLA molekul – **DR, -DQ, -DP**
- ❖ produkty glykoproteiny exprimovány na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk (buňky imunitního systému)
- ❖ **HLA-DM, -DO** geny – produkty nejsou exprimovány na buněčné membráně, výskyt v endozomech, funkce - naložení cizorodého peptidu na HLA molekulu II. třídy)
- ❖ geny **LMP2, LMP7** kódují proteiny, které štěpí cizorodé částice na menší peptidy
- ❖ geny **TAP1, TAP2**, zahrnuty do procesu transportu peptidů do ER

## HLA III. třída

- ❖ strukturálně a funkčně odlišné proteiny
- ❖ složky komplement C4, C2, faktor B, 21-hydroxylasa, TNF, heat shock protein Hsp 70

# Struktura HLA molekul

- ❖ HLA molekuly I. a II. třídy jsou glykoproteidy složené ze 2 různých proteinových řetězců (heterodimery)
- ❖ HLA molekuly I. třídy mají těžký  $\alpha$ - řetězec nekovalentně vázaný s  $\beta$ 2- mikroglobulinem (gen pro lehký řetězec  $\beta$ 2- mikroglobulin lokalizován na chr. 15)
- ❖  $\alpha$ - řetězec vytváří 3 domény  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3;  $\alpha$ 1 a  $\alpha$ 2 obsahují polymorfní místa detekovatelná sérologickými a buněčnými technikami
- ❖ HLA molekuly II. třídy se skládají ze 2 glykoproteinových transmembránových řetězců  $\alpha$ ,  $\beta$
- ❖ Každý řetězec je složen do 2 domén ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2)

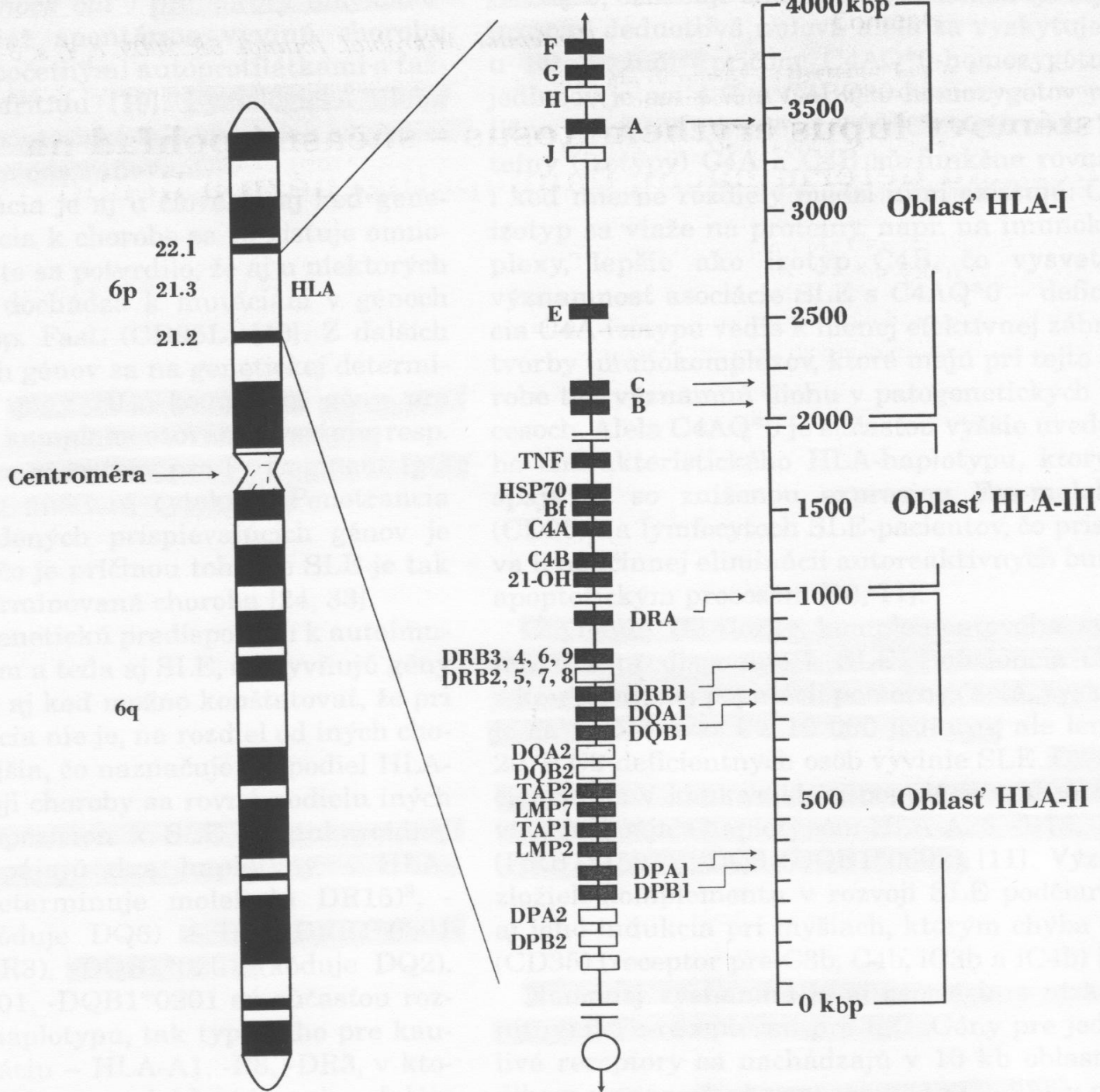


Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.



The New England Journal of Medicine





# Funkce HLA systému

- ❖ Hlavní funkcí HLA molekul je předkládat (prezentovat) cizorodé antigeny buňkám imunitního systému, především T lymfocytům
- ❖ Tato prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce a tím obrany proti napadení mikroorganismy
- ❖ imunitní systém musí **rozlišovat mezi „vlastními“ a „cizími“ antigeny**
- ❖ Primární role imunitního systému je rozpoznat a eliminovat nebezpečné cizí agens
- ❖ fenomén **HLA restrikce** - buněčné receptory T lymfocytů (TCR) rozpoznávají komplex sestávající se z cizorodého antigenního peptidu vázaného v peptidovém žlábků HLA molekuly.
- ❖ 2 způsoby prezentace antigenů T lymfocytům – endogenní (HLA I. tř.)  
- exogenní (HLA II. tř.)



## PŮVOD PEPTIDŮ

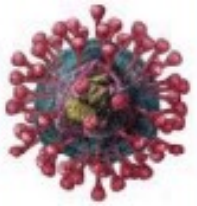
Odkud pocházejí cizorodé patogeny rozpoznávané T lymfocyty:

- ❖ replikace v cytosolu buňky (viry, některé bakterie)  
**proteiny produkované buňkou - endogenní zdroj**
- ❖ ciz. peptid + HLA I + CD8+ (Tc lymfocyty) - zabití napadených buněk

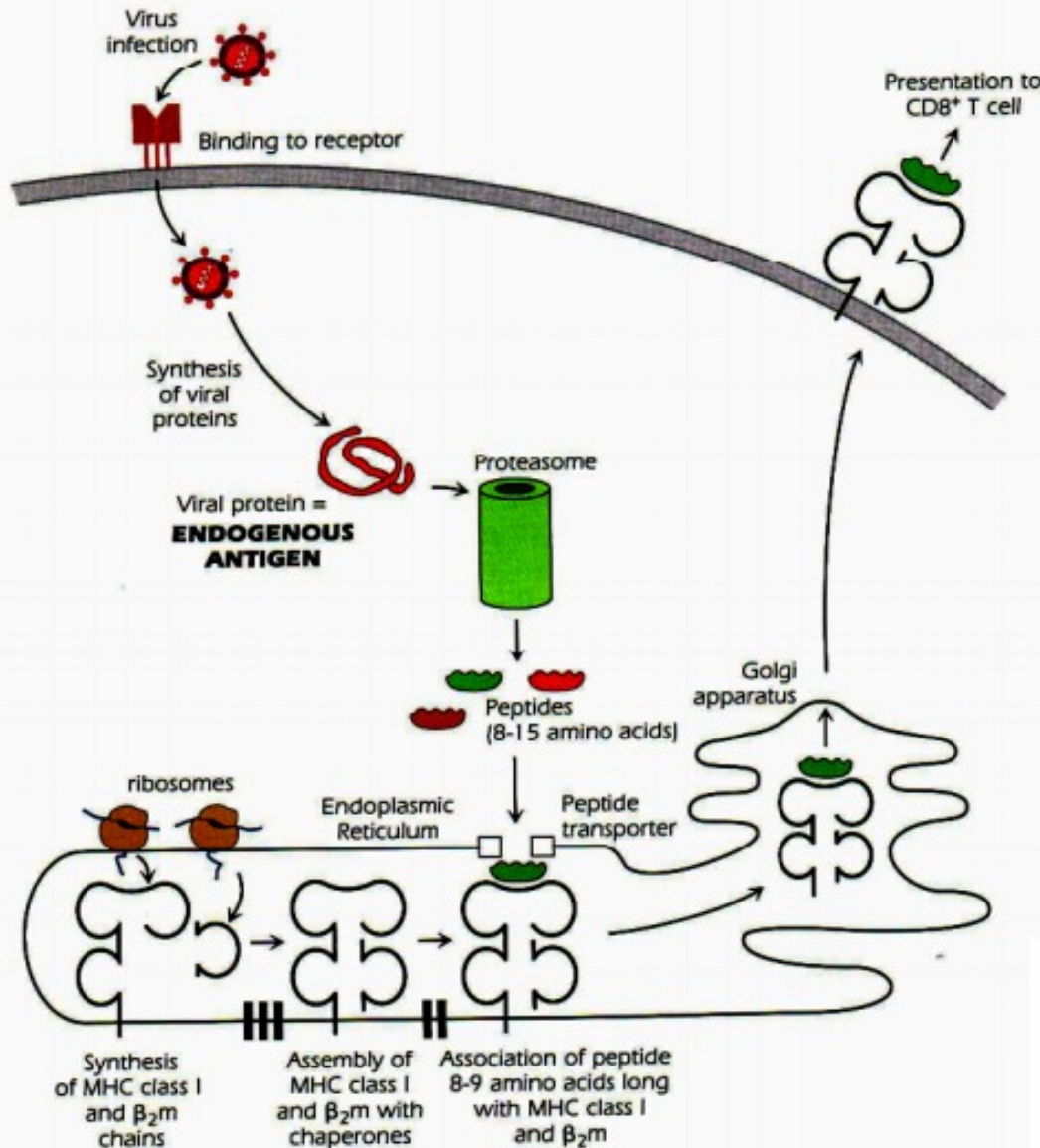
- ❖ replikace v endosomech a lysosomech (bakterie, paraziti)  
**proteiny buňkou pohlčené - exogenní zdroj**
- ❖ vesikulární systém buňky (transportní váček)
- ❖ ciz. peptid + HLA II + CD4+ (Th lymfocyty) - aktivace zánětlivé a protilátkové odpovědi

CD4+ Th1 - zánětlivé - aktivace makrofágů k zabití patogenu

CD4+ Th2 - protilátková odpověď, aktivace B buněk k produkci protilátek



# Peptidy prezentované pomocí HLA I. tř. – endogenní zdroj



1. Syntéza virových proteinů na ribosomech
2. Ubiquitin – označení proteinu k likvidaci
3. Proteasom – rozštěpení
4. TAP1/TAP2 – transport peptidů do endoplasmatického retikula
5. Naložení na molekulu HLA I a transport na povrch buňky

# Peptidy prezentované pomocí HLA II. tř. – exogenní zdroj

## EXOGENNÍ ANTIGEN

Vesikuly s kyselým

prostředím

ENDOSOMY

LYSOSOMY - proteolytické

štěpení

(katepsiny, endopeptidáza)

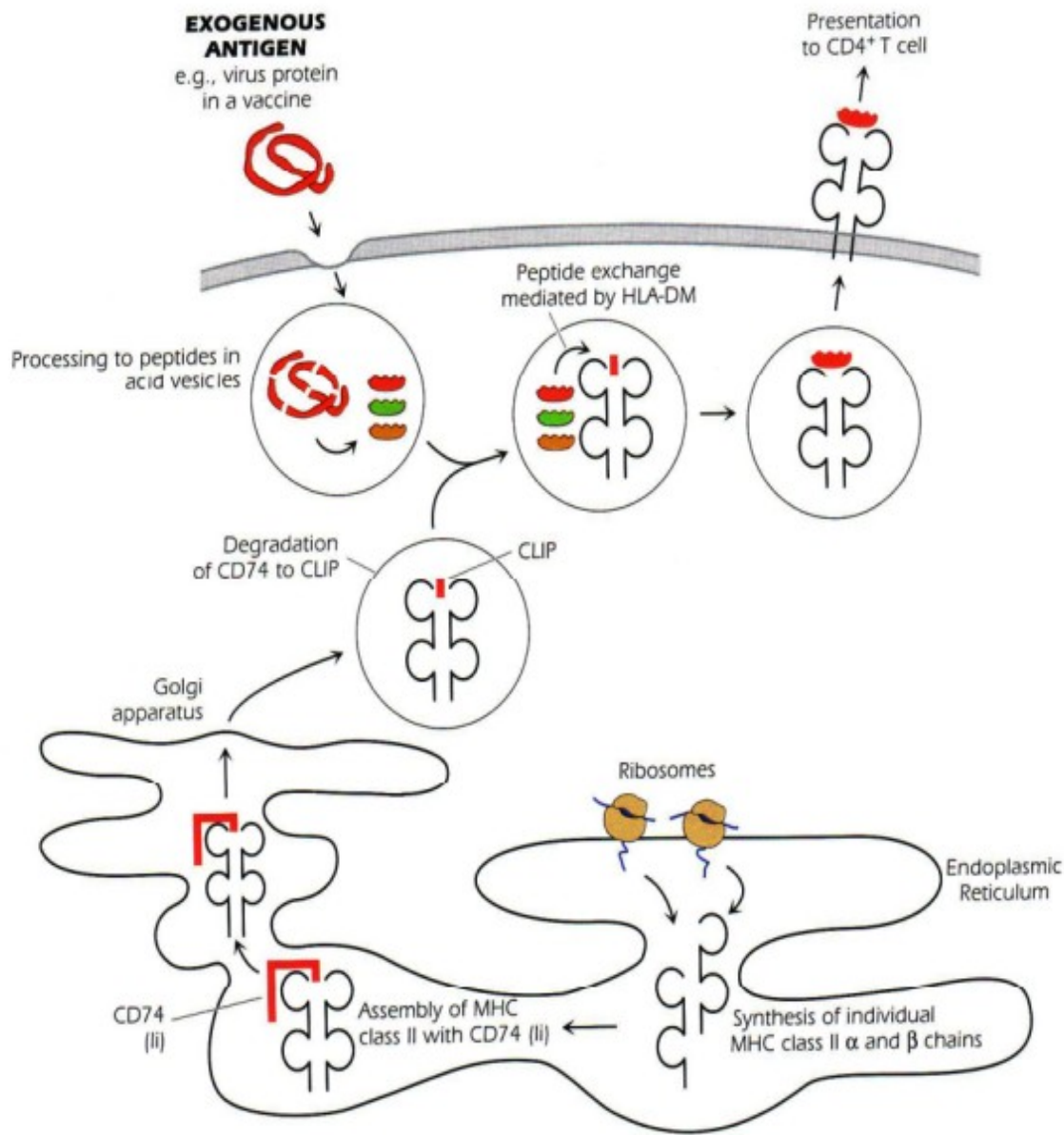
MHC II

ENDOPLASMATICKÉ  
RETIKULUM

$\alpha$  a  $\beta$  řetězec MHC II +  
invariantní řetězec (Ii, CD74)

(zabraňuje obsazení  
vazebných míst vlastními  
peptidy)  $\Rightarrow$  CLIP (CLASS II  
associated Invariant Chain  
Peptide)

$\Rightarrow$  HLA-DM  $\Rightarrow$  odstranění Ii a  
záměna za antigenní fragment



## HLA molekuly jsou ligandy pro receptory NK buněk

- ❖ NK buňky (přirození zabíječi) se vyznačují přímou cytotoxickou aktivitou
  - ❖ NK buňky mají na povrchu **aktivační a inhibiční receptory** (KIR-killer immunoglobuline-like receptor), kterými je regulována aktivita NK buněk
  - ❖ Aktivační receptory rozpoznávají běžné povrchové struktury buněk (např. Fc receptor)
  - ❖ Inhibiční receptory rozpoznávají HLA molekuly a také neklasické HLA-E a -G molekuly
  - ❖ **HLA molekuly aktivují nebo blokuji aktivitu NK buněk**
- 
- ❖ T lymfocyty rozpoznávají přítomnost HLA molekul (vlastní x cizí),
  - ❖ NK buňky rozpoznávají absenci HLA molekul
  - ❖ absence HLA molekul je u normálních buněk vzácná, ale není neobvyklá u některých nádorových b. a u virem infikovaných b.
- 
- ❖ Zatím co T buňky jsou ignorantní k nebezpečným HLA negativním buňkám, NK buňky je rozpoznávají

## ochrana fetálního allograftu

- ❖ Plod v těle matky je z poloviny cizí štěp
- ❖ Klasické HLA produkty I. třídy –A, -B, nejsou exprimovány na buňkách trofoblastu → T lymfocyty jsou k plodu ignorantní
- ❖ na trofoblastu jsou syntetizovány neklasické molekuly HLA-G, (-E) → zajišťují inhibici NK buněk
- ❖ Závěr: Neklasické HLA-G, (-E) molekuly hrají speciální biologickou roli = ochrana vyvíjejícího se fetu před mateřskými T a NK buňkami, hrají roli při potlačení imunitní odpovědi matky proti plodu

## úloha HLA molekul v transplantologii

- ❖ HLA molekuly jsou silné aloantigeny indukující rejekci štěpu
- ❖ MICA (MHC Class I Chain-related molecules) genové produkty aktivují NK buňky
- ❖ MICA jsou exprimovány na endoteliálních b.,ne na lymfocytech
- ❖ Anti-MICA protilátky nejsou detekovatelné běžnými cross-match technikami a mají pravděpodobně také velký vliv na přežívání štěpu při orgánových Tx

# Trophoblast



A. Normal HLA Tissue Distribution



B. No HLA Class I Molecules



C. Specialized HLA Class I (HLA-E, -G)





# Expresce a distribuce HLA molekul

- ❖ HLA I. tř. - nalezeny na všech jaderných buňkách
- ❖ HLA geny exprimovány kodominantně – obě alely každého HLA lokusu exprimují HLA molekuly
- ❖ na mladých červených krvinkách – atypický antigenní systém **Bga, Bgb, Bgc** (**reziduální HLA antigeny**)
- ❖ plazma – solubilní HLA antigeny
  
- ❖ HLA II. tř. – omezená distribuce: B lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky, Langherhansovy buňky kůže, (buňky imunitního systému)
  
- ❖ exprese HLA antigenů I. a II. třídy může být zvýšena během zánětu, ale také může být indukována na určitých buňkách, na kterých se normálně neexprimují (myocyty, hepatocyty ).
- ❖ Zvýšená nebo nová exprese HLA antigenů je iniciována cytokiny (interferony)
  
- ❖ Nová exprese HLA antigenů za určitých podmínek pravděpodobně hraje majoritní roli v patogenezi rejekce transplantovaného štěpu
- ❖ Snížená exprese HLA molekul - nádorové buňky, virem infikované buňky
  
- ❖ Absence HLA molekul - mechanismus, kterým nádorové buňky a virem infikované buňky obcházejí imunitní rozpoznání T buňkami.

typ buňky, tkáň	exprese	
	HLA I	HLA II
<b>BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU</b>		
<b>dendritické buňky</b>	+++	+
<b>makrofágy</b>	+++	++
<b>T lymfocyty</b>	+++	+
<b>B lymfocyty</b>	+++	+++
<b>JINÉ JADERNÉ BUŇKY</b>		
<b>neutrofilní granulocyty</b>	+++	-
<b>eosinofilní granulocyty</b>	+++	-
<b>epitelové buňky</b>	+++	-
<b>hepatocyty</b>	+	-
<b>nervové buňky</b>	+	-
<b>buňky ledvin</b>	+	-
<b>NEJADERNÉ BUŇKY</b>		
<b>trombocyty</b>	++	-
<b>erytrocyty</b>	-	-

Tab.1.: Odlišnosti v expresi molekul HLA I. a II. třídy na různých buněčných typech ( J. Krejsek a O. Kopecký, Klinická imunologie, str. 125, 2004)

# Srovnání vlastností a funkce HLA I a HLA II

Charakteristika	HLA I	HLA II
Struktura	$\alpha$ řetězec + $\beta$ 2m	$\alpha$ a $\beta$ řetězce
Domény	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a $\alpha$ 3 + $\beta$ 2m	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a $\beta$ 1, $\beta$ 2
Buněčná exprese	téměř všechny jad.buňky	APC (B buňky, dendritické buňky, makrofágy)
Peptidy vázající místo	uzavřené, váže 8-9 amk tvořené doménami $\alpha$ 1 a $\alpha$ 2	otevřené, váže 12-17amk tvořené doménami $\alpha$ 1 a $\beta$ 1
Peptidy	endogenní antigeny	exogenní antigeny
Peptidy prezentované	CD8+T buňkám	CD4+T buňkám

# Dědičnost HLA systému

- ❖ geny vázané X geny volně kombinovatelné
- ❖ HLA geny jsou vázané → děděny „en bloc“ od rodičů jako haplotyp
- ❖ někdy rekombinace v HLA oblasti (crossing-over během meiotického dělení) → výměna genetického materiálu mezi homologickými chromozómy → vznikají rekombinantní sestavy alel
- ❖ frekvence rekombinace je závislá na vzdálenosti mezi geny
- ❖ vazebná nerovnováha ( linkage disequilibrium )
  - běžná v HLA systému
  - určité kombinace alel se vyskytují častěji, než by se očekávalo na základě genových frekvencí
- ❖ evoluční základ vazebné nerovnováhy je spekulativní, určité kombinace HLA alel asi poskytují v některých populacích určitou selekční výhodu

Např. **HLA- A1 a HLA-B8** s genovými frekvencemi **0,16 a 0,1** v populaci. Očekávaná frekvence výskytu haplotypu **HLA –A1, B8** v populaci by měla být  **$0,16 \times 0,1 \times 100\% = 1,6\%$** . V některých kavkazských populacích frekvence tohoto haplotypu zdaleka přesahuje očekávanou frekvenci ( **8%** )

# Nejčastější haplotypy v různých etnických skupinách

African

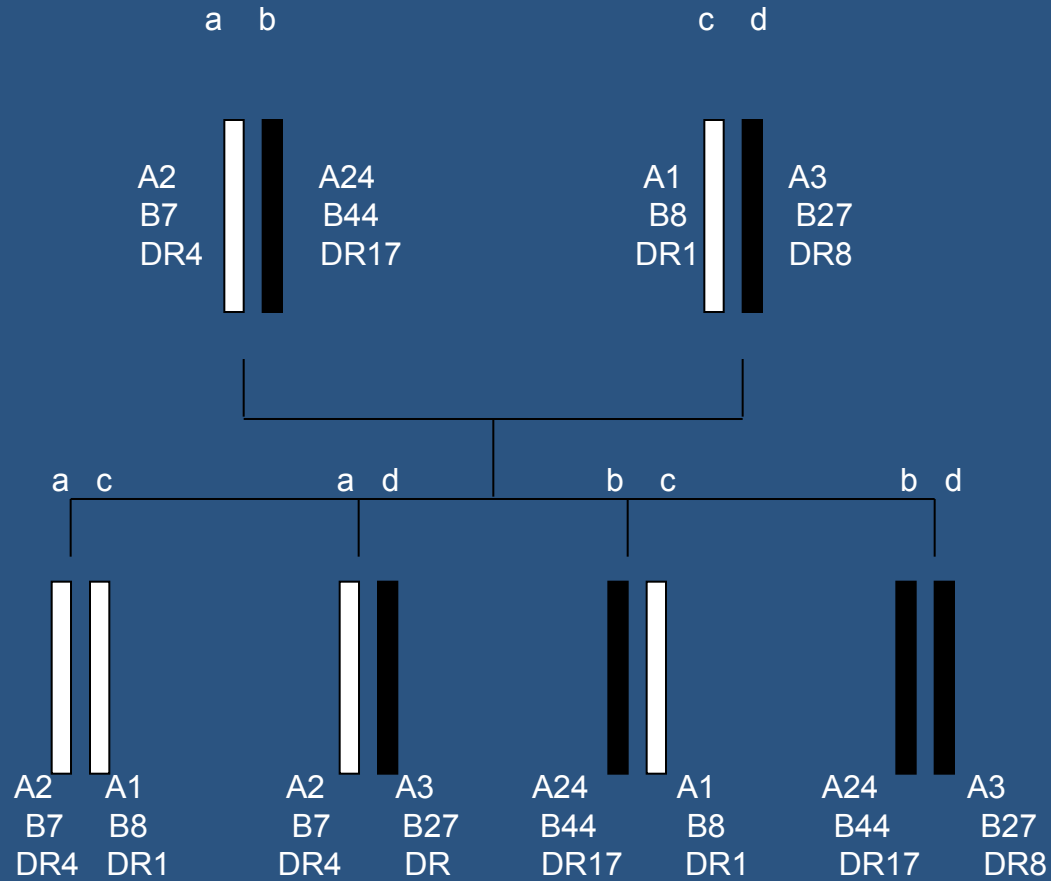
Asian

Caucasian

Haplotype (freq.%)

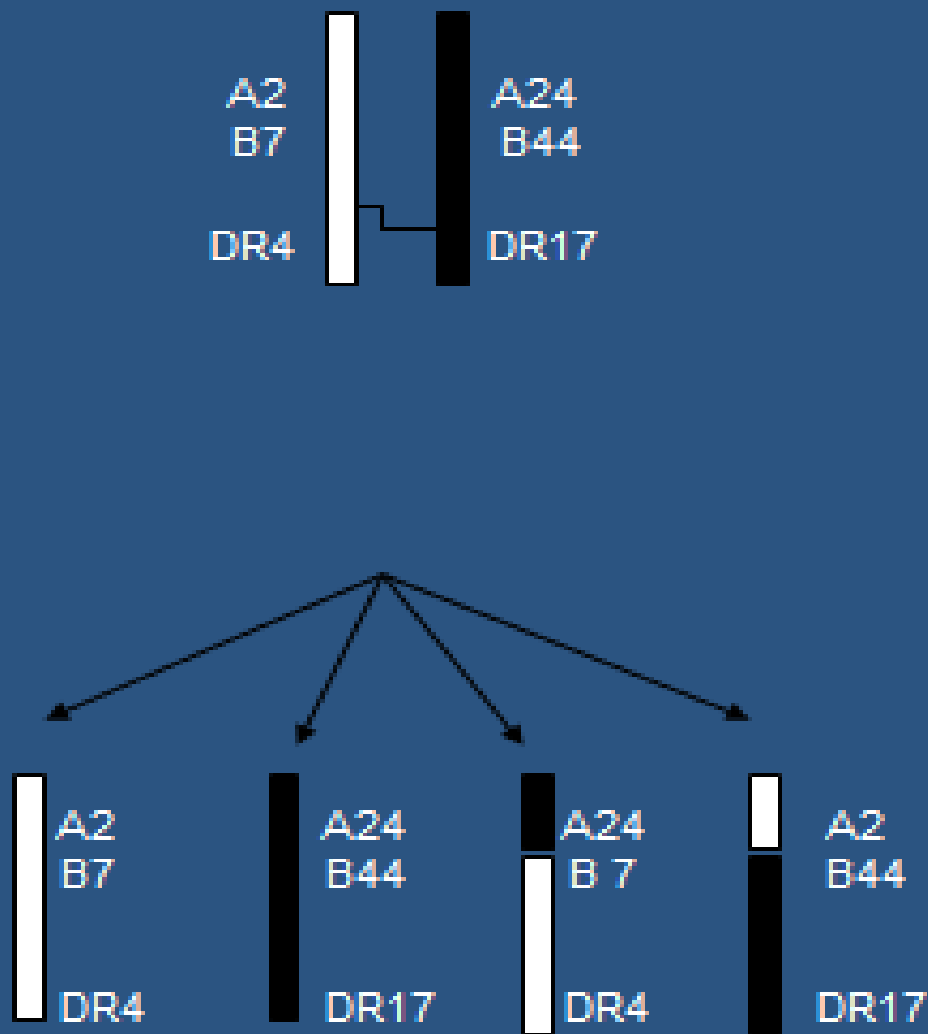
1.	A30,B42,DR3 (1,67)	A33,B58,DR3 (1,58)	<b>A1,B8,DR3 ( 5,18)</b>
2.	A1,B8,DR3 (1,25)	A33,B44,DR6 (1,46)	<b>A3,B7,DR2 (2,63)</b>
3.	A3,B7,DR2 (0,76)	A24,B52,DR2 (1,38)	<b>A2,B44,DR4 (2,15)</b>
4.	A2,B44,DR4 (0,65)	A2,B46,DR9 (1,35)	<b>A2,B7,DR2 (1,8)</b>
5.	A33,B53,DR8 (0,63)	A33,B47,DR7 (1,34)	<b>A29,B44,DR7 (1,47)</b>

# Dědičnost HLA haplotypů





# Vznik nerekombinantních a rekombinantních HLA haplotypů



## HLA a choroby

- ❖ 1967 – první zprávy o asociaci HLA systému s onemocněním u člověka
- ❖ 1973 – objevena asociace **HLA-B27 s ankylozující spondylitidou** (m. Bechtěrev)
- ❖ následně byly studovány stovky onemocnění pro možnou asociaci onemocnění s HLA systémem
- ❖ u více než 50ti onemocnění byla prokázána statisticky významná HLA asociace

### Rysy HLA asociovaných chorob:

- ❖ kromě několika málo vyjímek, choroby asociované s HLA antigeny jsou nemaligní chronická onemocnění
- ❖ převážně autoimunitní onemocnění
- ❖ většina chorob je multifaktoriálních ( geny+ environmentální složka)
- ❖ spouštěčem často environmentálním faktory (mikroorganismy, stres)

## Některé příklady asociace HLA alel s chorobou:

Birdshot retinopathy	-A29	RR=200
Ankylosing spondylitis	-B27	81,8
Narcolepsy	-DQB1*06:02	100
Psoriasis vulgaris	-B13, Cw6	4,5    7,2
Celiac disease	- DQB1*02, *03:02 DQA1*03:01, *05	13,3
Type I diabetes mellitus	-DR3, 4, -DQ2,8	10
Multiple sclerosis	-DR2, -DQ6	4
Rheumatoid arthritis	-DR4	4

# ANKYLOSING SPONDYLITIS (AS, M. BECHTĚREV)

- ❖ Asociace s HLA-B27
- ❖ zánětlivá forma artritidy, postižení ve větší míře mladí muži
- ❖ postižení začíná obvykle v dolní části páteře, kde zánět napadá kloubní spojení mezi pávní a páteří , nemoc se může postupně šířit nahoru a dolů ke kyčelním a kolenním kloubům.
- ❖ různý průběh onemocnění, může končit velmi vážnými deformitami
- ❖ průběh onemocnění dlouhodobý
- ❖ ostatní choroby asociované s HLA-B27 – Reiterova choroba (revmatické onem., často vyvolávají chlamydie, trojice obtíží: neinf.zánět kloubů, moč.trubice a spojivek)
- ❖ Anterior uveitis (přední uveitida-zánět duhovky, řasnatého tělíska)

## TYPE I DIABETES MELLITUS ( IDDM )

- ❖ silná asociace s DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 a DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 v kavkazské populaci  
DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 u amerických černochoů  
DQA1\*05:01/DQB1\*03:02, DQA1\*03:01/DQB1\*04:01, DQA1\*03:01/DQB1\*03:03 u Japonců
- ❖ protektivní účinek vůči IDDM je asociován s DQB1\*06:02 (DQA1\*01:02/DQB1\*06:02 )
- ❖ IDDM se vyvíjí postupně, dlouhá subklinická etapa spojená s postupujícím poškozením beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, které tvoří inzulin, klinický projev – zničeno asi 90% buněk
- ❖ za rozvoj onemocnění zodpovědno více faktorů – geny a negenetická složka ( infekce enteroviry = polioviry, coxsackieviry A, B, echoviry )
- ❖ většina nákaz virem je asymptomatická

# CELIAC DISEASE (CD)

-predispoziční haplotypy

**-DRB1\*03- DQA1\*05:01- DQB1\*02:01**

**-DRB1\*07- DQA1\*02:01- DQB1\*02:02**

**-DRB1\*04 -DQA1\*03:01-DQB1\*03:02**



- ❖ geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění
- ❖ intolerance na gluten (lepek), trávicí soustava pacienta není schopna trávit potraviny obsahující lepek
- ❖ chronický zánět sliznice tenkého střeva, prevalence v ČR 1 : 200-250 obyv.
- ❖ pro vývoj onemocnění nutné 3 podmínky:
  1. genetické předpoklady
  2. konzumace stravy obsahující lepek
  3. spouštěč onemocnění ( stres, trauma, virová infekce )
- ❖ dlouhodobé průjmy, únava, bolesti kostí, břicha, svalů, u dětí také problémy se zuby, růstem a vývojem
- ❖ jediná známá léčba – celoživotní dodržování bezlepkové diety



## MULTIPLE SCLEROSIS (MS)

- ❖ slabší asociace s HLA alelami DRB1\*15:01, DQB1\*06:02 a DQA1\*01:02
- ❖ vliv faktory genetické i negenetické (vliv prostředí, neznámé imunologické procesy)
- ❖ chronické zánětlivé demyelinizující onemocnění centrálného nervového systému s nejasnou etiologií a patogenezi

## NARKOLEPSIE

- ❖ neurologické **onemocnění**
- ❖ hypersomnie – zvýšená denní spavost někdy doprovázená kataplexií (ochabnutí kosterního svalstva)
- ❖ pravděpodobně autoimunitní onemocnění s dědičným sklonem nastartované vnějším faktorem (streptokoková infekce) namířené proti hypocretinovým neuronům, které mají budivou funkci

# HLA nomenklatura

## 1. Serologická definice HLA antigenů – maximálně číslíkové 2 znaky

- ❖ antigeny základní – např. **A9, A10, B51, B40, Cw3, DR2, DQ3....**
- ❖ antigeny splitové (subtypy) - sdílejí společné sérologicky definované epitopy

např. **A10** → **A25, 26, 34**

**B40** → **B60, 61**

**Cw3** → **Cw9, 10**

**DR2** → **DR15, 16**

**DQ3** → **DQ7, 8, 9**

- ❖ antigeny obecné – **DR51, DR52, DR53**
- ❖ **Bw4, Bw6 specificity** – nejedná se o genové produkty, ale o „**public**“ epitopy. Jsou to alternativní aminokyselinové sekvence přítomné na všech HLA-B molekulách a na HLA-A23, 24, 25, 32.

V r. 1987 – 10th International Histocompatibility Workshop, přijata nomenklatura založená na následujících principech:

- ❖ **HLA**= Hlavní histokompatibilní komplex člověka
- ❖ **A, B, C, DR, DQ, DP.....** lokusy
- ❖ **číslo (A1, Cw3)** = označení specificity molekuly (antigenu)

## 2. Molekulárně-genetická definice HLA alel

❖ používá číslíkové znaky dvou a vícemístné  
př. **HLA-A\*02, \*31, B\*08, \*44, C\*02, \*12, DRB1\*04, \*13, DQB1\*07, \*08**  
- úroveň „**low resolution**“

**HLA-A\*01:01, \*02:02, B\*07:01, \*35:01, C\*02:02, \*03:03, DRB1\*04:01, \*13:05, DQB1\*03:04, \*03:05**  
- úroveň „**high resolution**“

❖ Někdy více jak 4 znaky:

**C\*02:02:01, \*02:02:02**.....alely se liší v tiché nukleotidové substituci na úrovni DNA, ne v aminokyselinové sekvenci na úrovni polypeptidu (tichá mutace)

**A\*24:02:01:01**            7. a 8. pozice – polymorfismus v nekódující oblasti

**A\*24:02:01:02L**            „**low expressed**“ allele

**B\*51:11N**                „**null**“ allele

Duben 2010 – nová nomenklatura, k oddělování jednotlivých dvojčíslí v označení alel se budou používat dvojtečky.

Např.: B\*0808N→B\*08:08N

A\*9201→A\*02:101

# Polymorfismus genů HLA I. a II. třídy ([www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html))

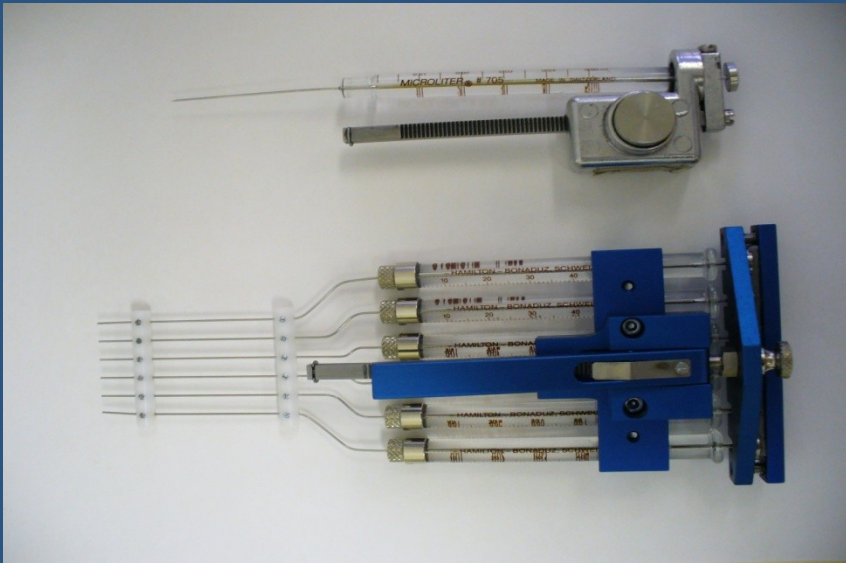
HLA I. třídy		HLA II. třídy	
lokus	počet alel	lokus	počet alel
HLA-A	893	HLA-DRB	814
HLA-B	1431	HLA-DRA	3
HLA-C	569	HLA-DPB1	136
HLA-E	9	HLA-DPA1	28
HLA-F	21	HLA-DQB1	106
HLA-G	45	HLA-DQA1	35

# Metody typizace HLA antigenů

## 1. serologické metody

### **Complement –Dependent Cytotoxicity Assay ( CDC) = Lymfocytotoxický test ( LCT )**

- ❖ lymfocyty typovaného jedince jsou nejdříve inkubovány se specifickými antiséry, která jsou rozkapána na mikrotitračních plotnách
- ❖ přidáno králičí sérum jako zdroj komplementu
- ❖ vazba protilátky se specifickým HLA antigenem na membráně lymfocytu aktivuje komplement, který poškozují buněčnou membránu
- ❖ vitální barvení (trypanová modř, eosin), mrtvé buňky se obarví
- ❖ mikroskopické hodnocení, hodnotí se procento obarvených (mrtvých) buněk, síla reakce -, 2, 4, 6, 8
- ❖ nehodnotitelný výsledek - 0







S2505/15



S2505/15



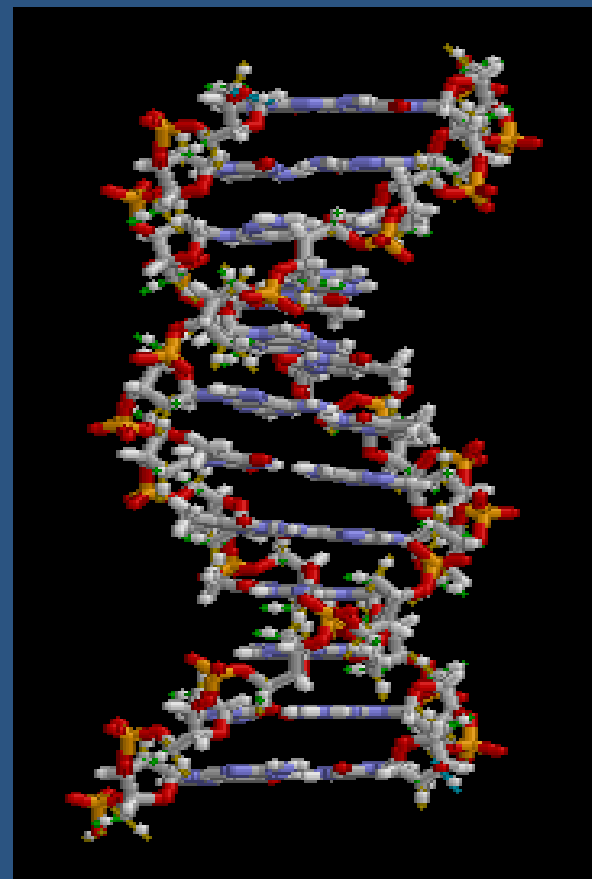
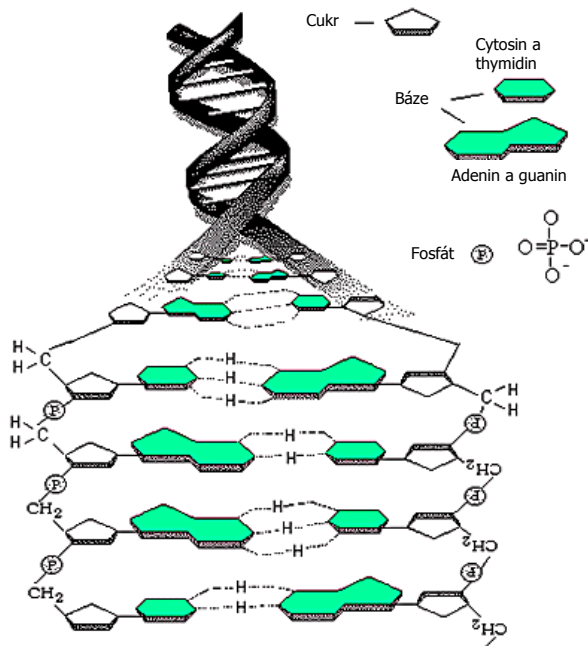
## 2. molekulárně-genetické metody

- ❖ 80. léta, technika PCR ( polymerace chain reaction )
- ❖ 90. léta, typizace HLA antigenů II. třídy
- ❖ následně typizace HLA antigenů I. třídy

**PCR** – enzymatická metoda in vitro, která slouží k namnožení ( amplifikaci ) specifického úseku DNA vymezeného párem specifických primerů.

3 kroky – **izolace DNA** ( plná krev, bukání stěry, krevní skvrny, vlasové folikuly, parafínové tkáňové bloky)

- amplifikace DNA ( PCR )
- detekce PCR produktu





# *Polymerázová řetězová reakce*

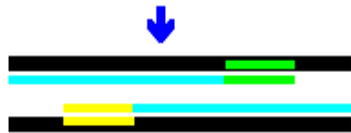


\* cílová oblast DNA ohraničená primery

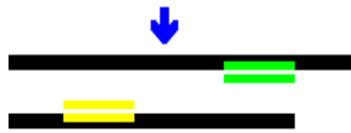


\* denaturace řetězců DNA

\* navázání primerů



\* syntéza nových řetězců DNA

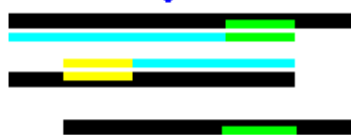


\* denaturace řetězců DNA

\* navázání primerů

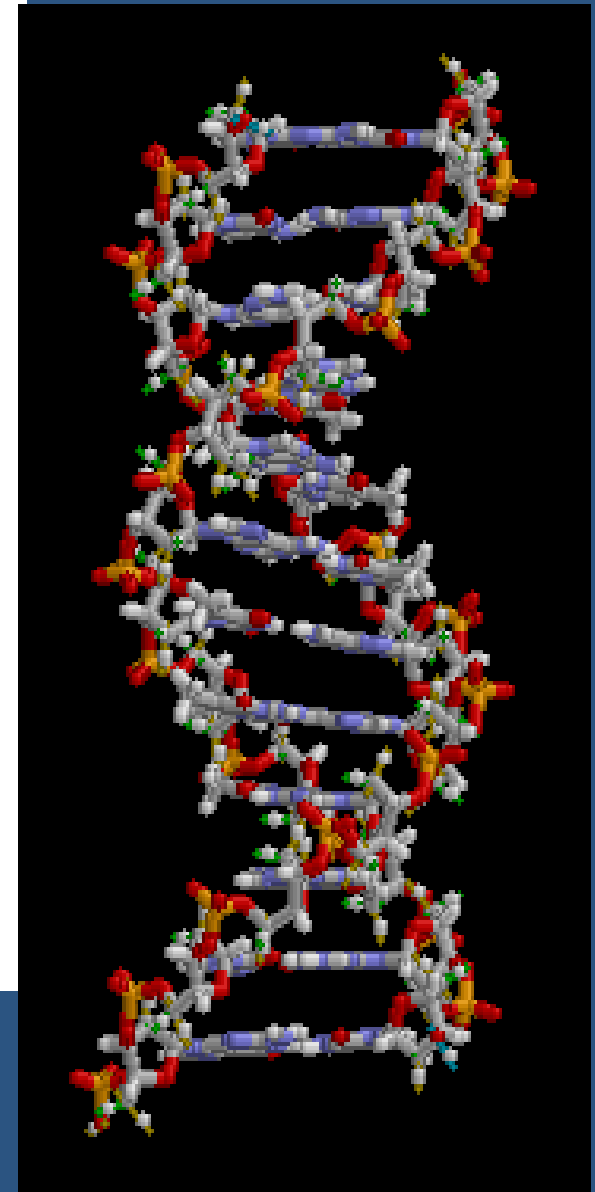


\* syntéza nových řetězců DNA

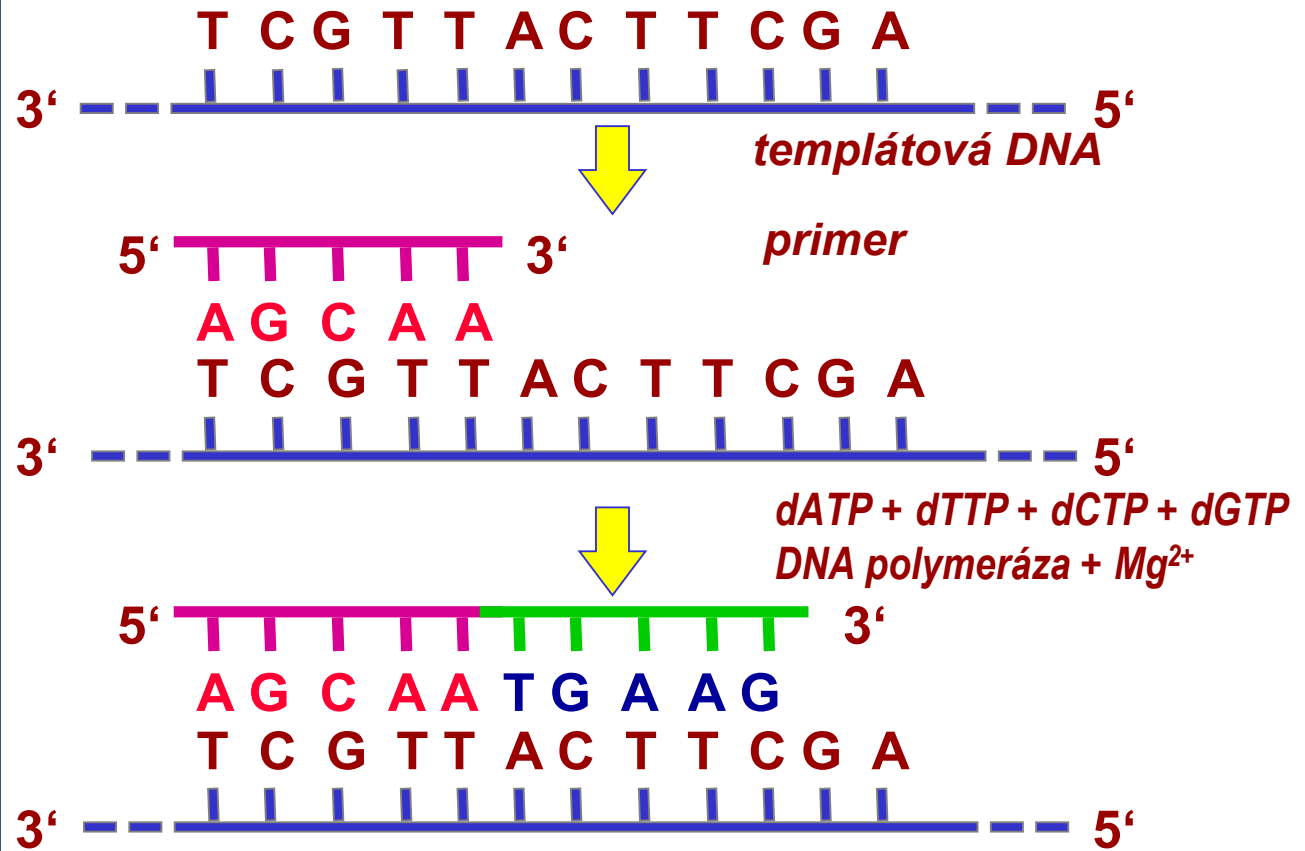


Počet kopií DNA -  $2^n$

n – počet cyklů (30 – 35)



# PCR - *elongace primerů*



## HLA typizace pomocí PCR metod

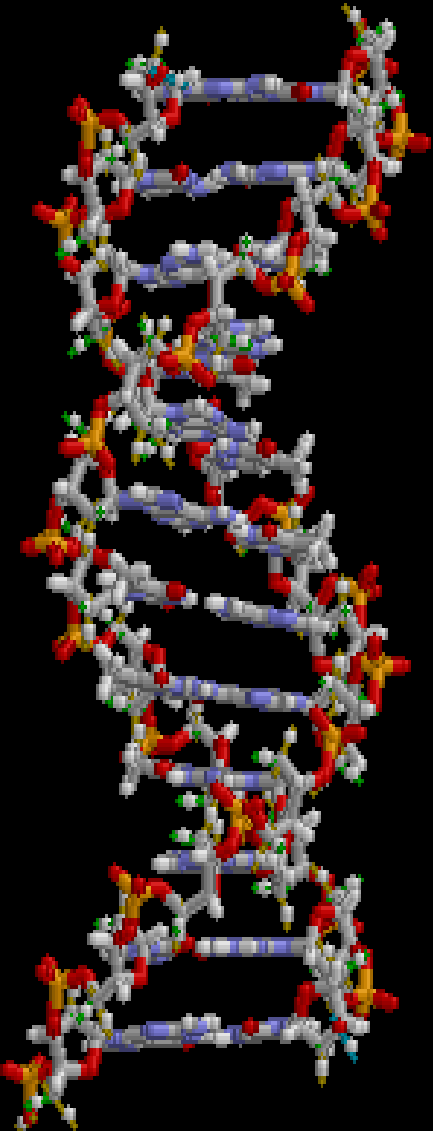
PCR – SSP (sequence – specific priming)

PCR – SSO ( sequence – specific oligonukleotide probes )

PCR – SBT (sequence based typing )

Mikročipy, Luminex (průtokový analyzátor),

FluoGene





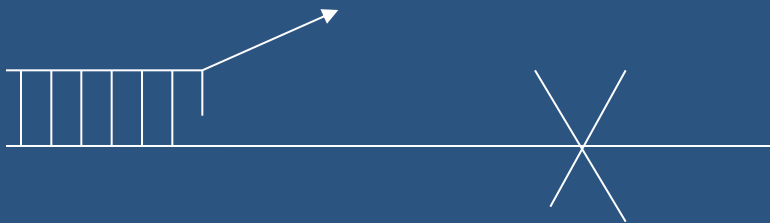
## 1. PCR – SSP

- ❖ jednotlivé páry primerů určují jednu alelu nebo skupinu alel (alelově a skupinově specifické primery), rozlišení během PCR
- ❖ tolik primerových párů, aby mohly být amplifikovány a detekovány všechny známé alely daného lokusu
- ❖ PCR – SSP může být užita pro „low resolution“ nebo „high resolution“
- ❖ HLA typizace „low resolution“ pro lokusy -A, -B, -DR, -DQ vyžaduje 95 – 100 primerových párů
- ❖ „high resolution“ - následně po serologické nebo po „low resolution“ typizaci
- ❖ v každé zkumavce tzv. interní kontrola amplifikace
- ❖ kontrola kontaminace – zkumavka obsahuje všechny reagenty pro PCR kromě templátové DNA
- ❖ Detekce elektroforeticky, amplikony s menší molekulovou hmotností migrují v gelu rychleji než amplikony s vyšší molekulovou hmotností
- ❖ vizualizace – obarvení gelu fluorescenční barvou, která se inkorporuje do DNA, expozice gelu UV světlem na transiluminátoru
- ❖ fotodokumentace

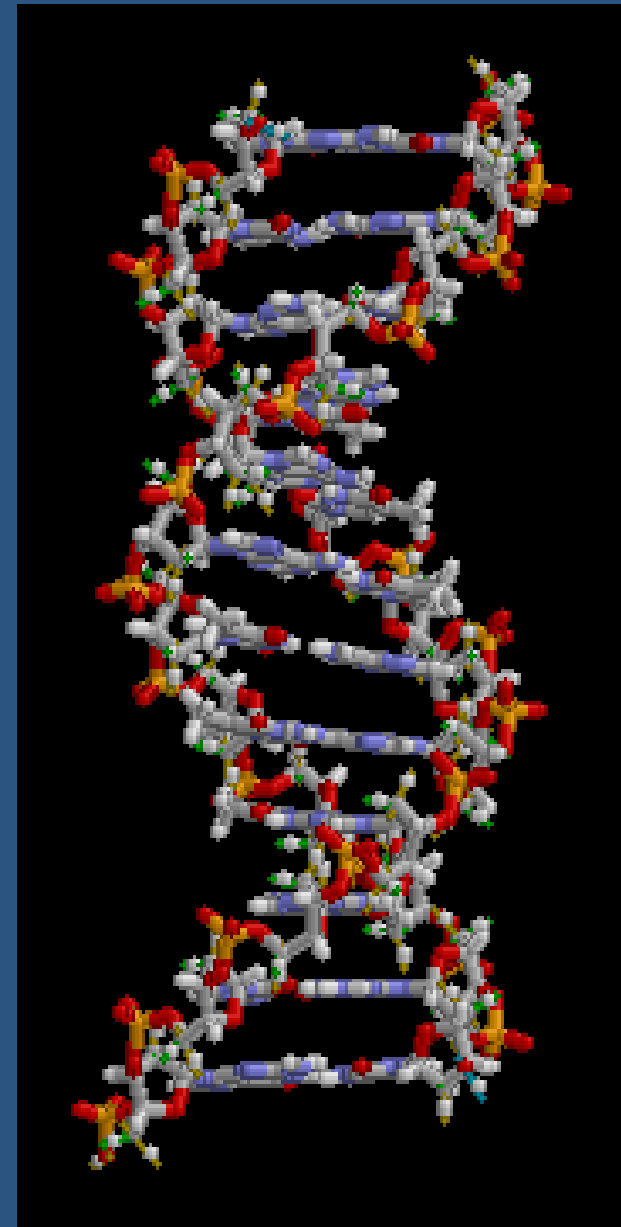
## Princip SSP-PCR



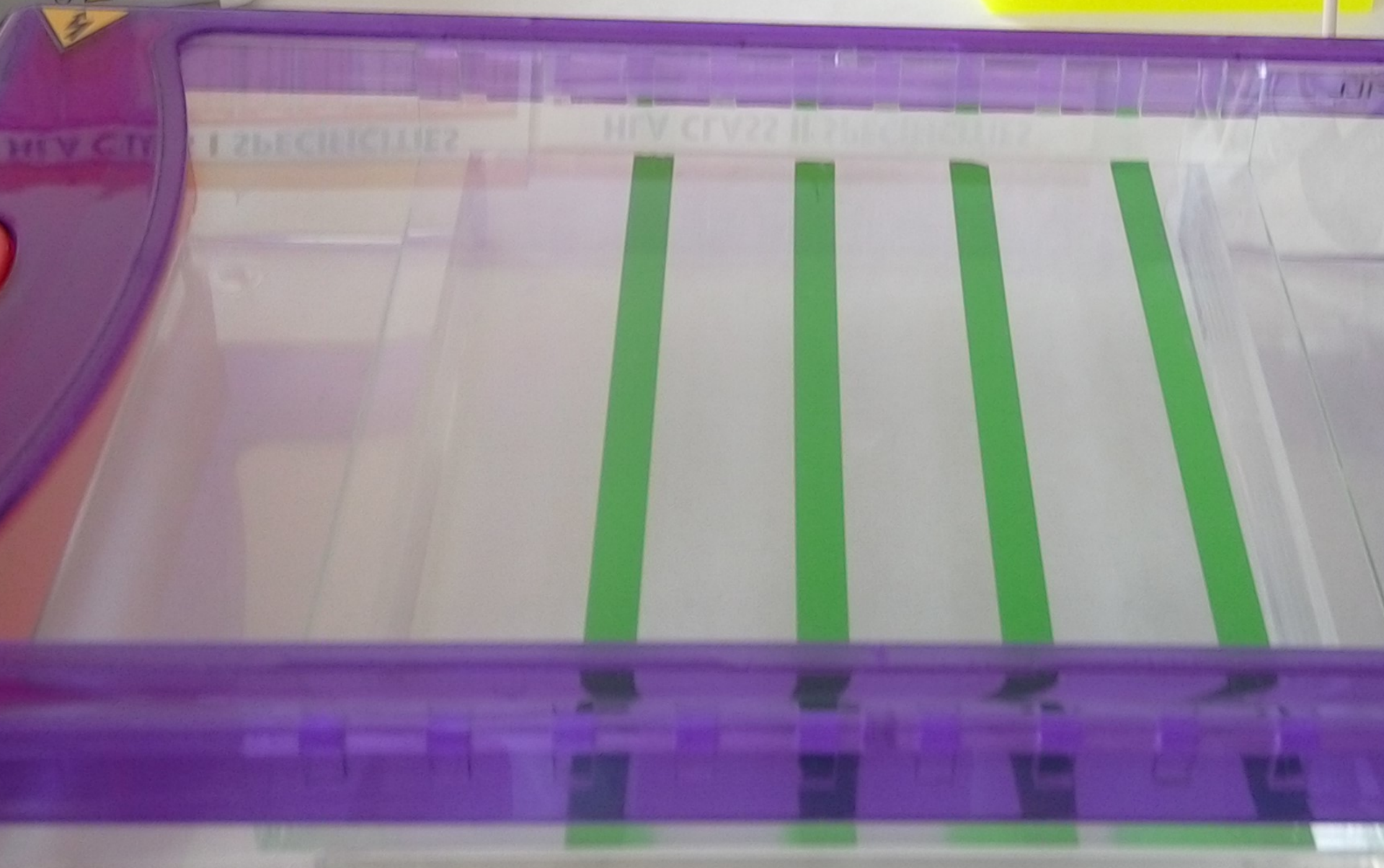
úplná shoda – amplifikace proběhne

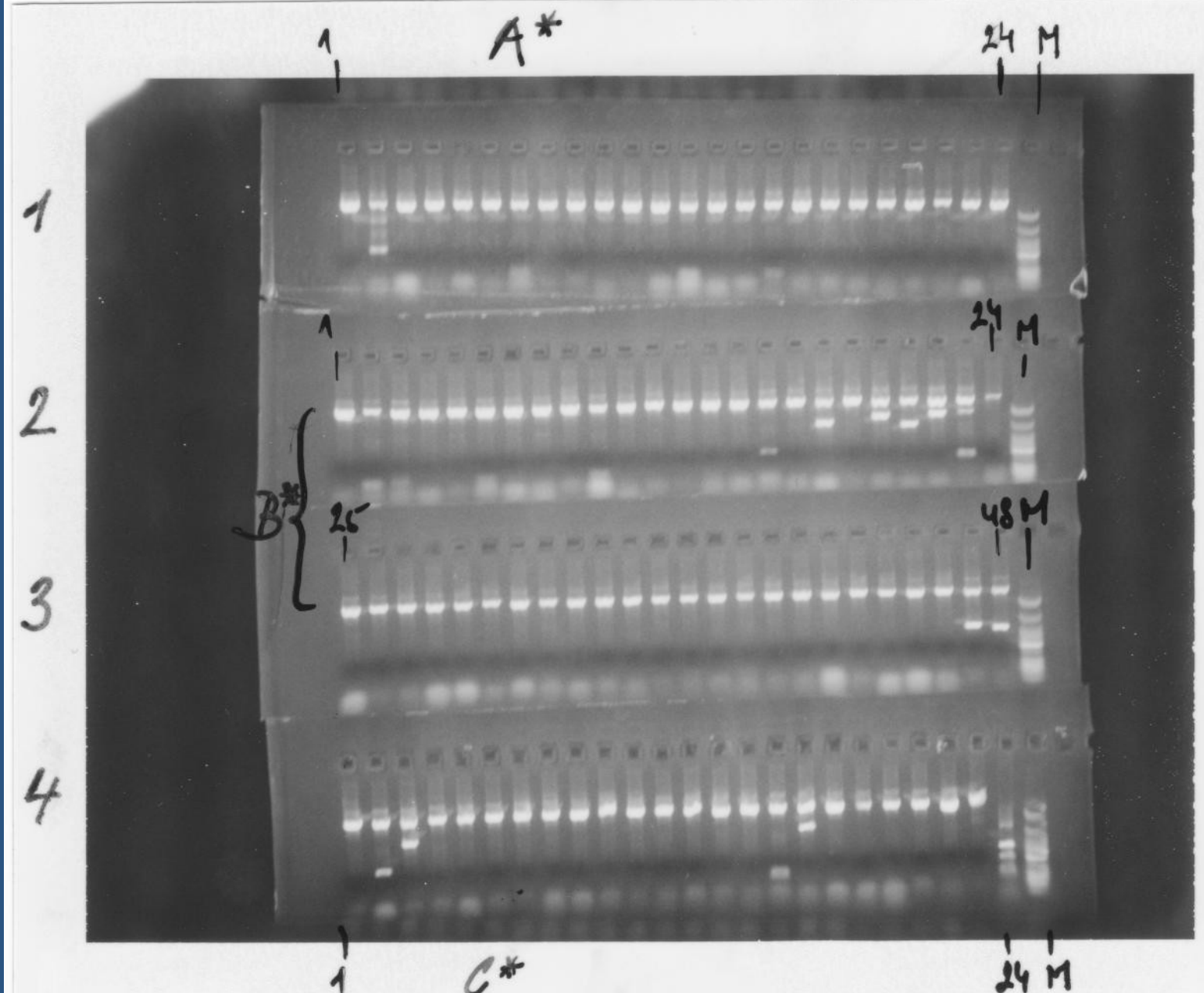


neshoda – amplifikace neproběhne







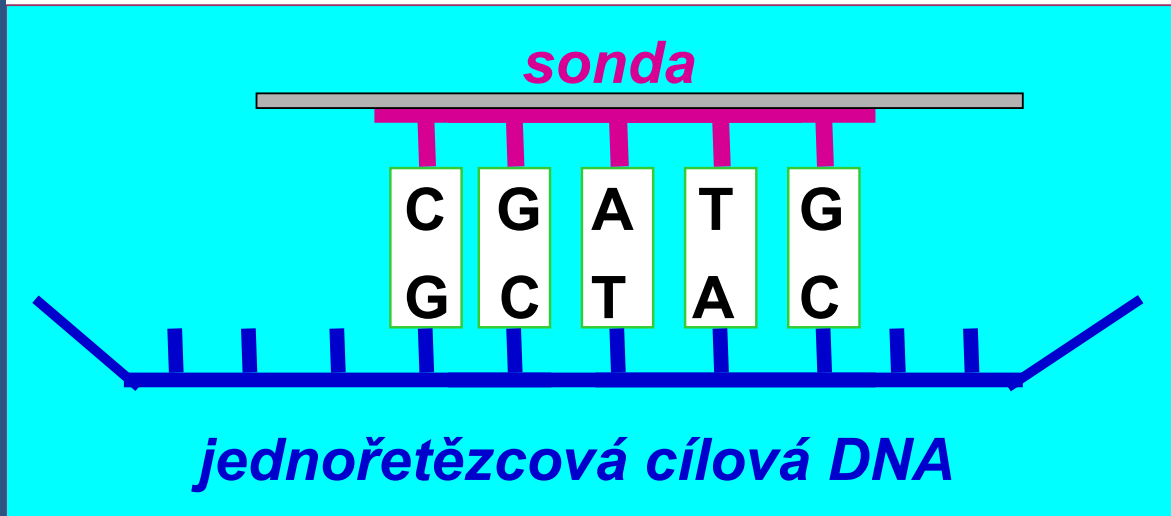


## 2. PCR – SSO (INNO – LiPA systém)

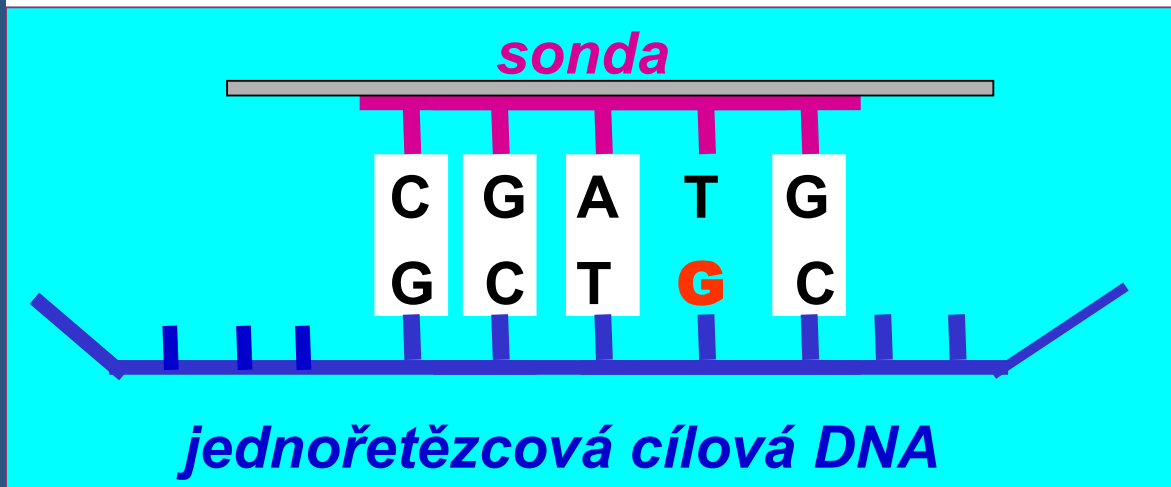
- ❖ využití lokus – specifických primerů (značené biotinem)
- ❖ amplifikuje se celá oblast kódovaná jedním lokusem (exon 2,3)
- ❖ specifické alely nebo skupiny alel jsou následně určeny reverzní hybridizací s oligonukleotidovými próbami (sondami)
- ❖ denaturace amplifikované DNA
- ❖ DNA próby (sondy) imobilizovány na nitrocelulóзовém stripu
- ❖ reverzní hybridizace denaturované DNA s DNA próbou na stripu
- ❖ vymytí nespecificky navázané DNA
- ❖ konjugát (streptavidin + alkalická fosfatáza)
- ❖ substrát, je štěpen fosfatázou a dojde k vytvoření barevného precipitátu
- ❖ odečtení pozic barevných precipitátů, vyhodnocení počítačovým programem



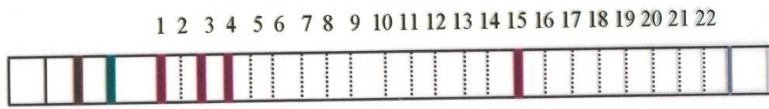
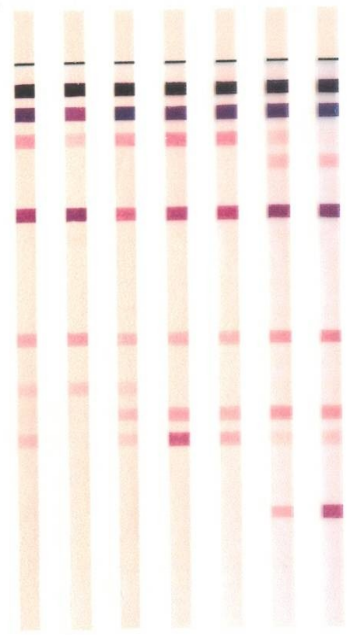
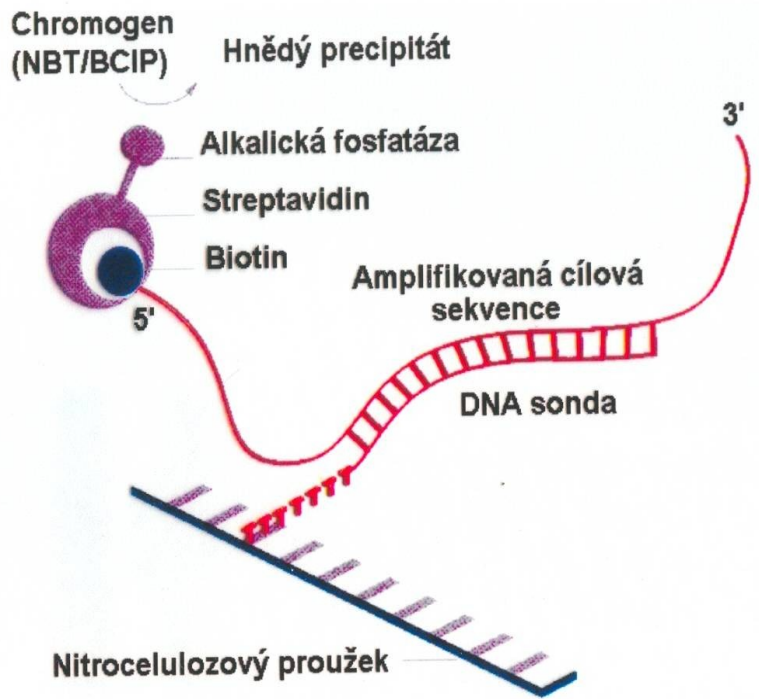
# hybridizační reakce



*perfektní shoda*  
**HYBRIDIZACE**



*1 neshoda*  
**ŽÁDNÁ**  
**HYBRIDIZACE**



**DQB typizace: DQB1\*0302 x DQB1\*0401**

### 3. PCR – SBT

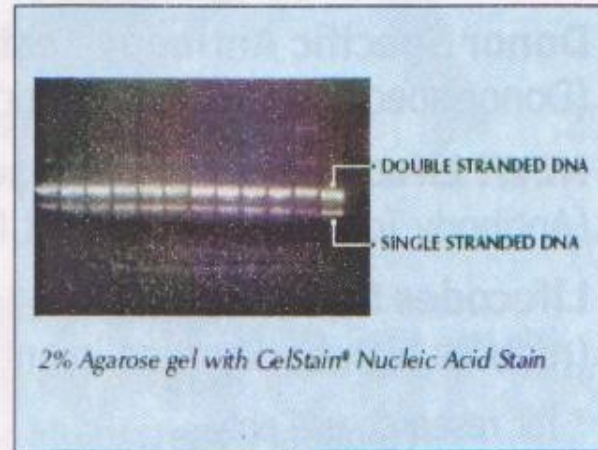
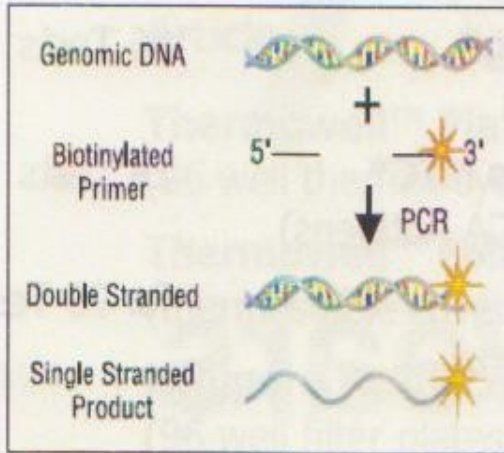
- ❖ amplifikace DNA fragmentu pomocí ddNTPs ( dideoxy nucleotide triphosphates, chybí 3'-OH skupina ), které fungují jako terminátory PCR reakce (použití pouze jednoho primeru)
- ❖ jestliže ddNTPs značeny 4 různými fluorescenčními barvivy, PCR probíhá v 1 zkumavce a elfo v 1 linii
- ❖ sekvenátor – probíhá kapilární elektroforéza, produkty rozdělovány podle velikosti (rozdíly v délce o 1 nukleotid), laserový paprsek snímá koncový fluorescenčně značený ddNTP
- ❖ interpretace výsledků pomocí softwaru

### 4. Mikročipy

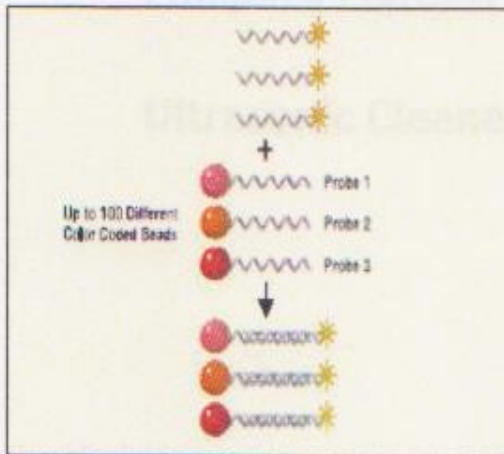
- ❖ miniaturizace systému
- ❖ na sklíčku naneseny stovky až tisíce oligonukleotidů
- ❖ plně automatizovaný systém
- ❖ kompletní HLA typizace na úrovni „high resolution“ během jedné analýzy

# PCR-SSO typizace na analyzátoru Luminex

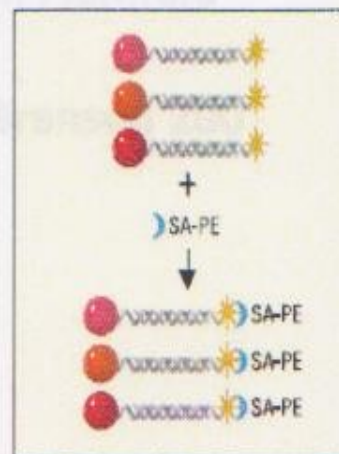
(for 100 typings)



1. Amplify with biotinylated primers



2. Hybridize with beads



3. Label with SA-PE



4. Analyze in the fluoroanalyzer



