

DNA-TYPIZÁCIA HLA-ALEL TRIEDY I

KULCSÁROVÁ E., FAZEKAŠOVÁ H.

DNA TYPING OF CLASS I HLA ALLELES

The major histocompatibility complex (MHC) in man, the HLA-complex, is for its marked significance in the regulation of immune system reactions and for its important role in clinical medicine the object of incessant interest for further studies. There is also a constant search for new methods of HLA typing. HLA antigens have been traditionally detected by serological and cellular methods. Recently HLA typing methods based on DNA typing utilising polymerase chain reaction (PCR) are being introduced. PCR-SSO (sequence-specific oligonucleotide) and PCR-SSP (sequence-specific primers) methods are most frequently used for routine typing of HLA class I alleles. We present technical details of the PCR-SSP method, recently introduced at our department and a short review of other techniques. (Fig. 1, Ref. 34).

Key words: class I HLA antigens, DNA typing, PCR-SSP.

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 597–600

Hlavný histokompatibilný komplex človeka sa nazýva HLA (Human Leucocyte Antigens). V priebehu posledných 25 rokov dokázali experimentálne a klinické štúdie, že HLA-komplex je hlavným transplantacným systémom, a preto určovanie zhody v HLA-antigénoch má mimoriadny praktický význam pre klinickú transplantáciu tkanív (Terasaki a spol., 1981; Macurová a spol., 1986; Santos a spol., 1989). Centrálna úloha MHC-génov v imunitnej odpovedi na proteínové antigény sa vysvetlila až koncom 70. rokov, keď sa dokázalo, že antigéno špecifické T-lymfocyty nerozpoznávajú antigény vo voľnej alebo v rozpustenej forme, ale rozoznávajú iba časti proteínových antigénov – peptidy, ktoré sú nekovalentne viazané k produktom MHC-génov (Doherty a Zinkernagel, 1975). Od roku 1973 sa zistovalo, že určité HLA-antigény sú významne asociované niektorými chorobami (Nyulassy a Iványi, 1975; Hána a spol., 1982; Buc 1989). Poznatky o HLA-komplexe sa využívajú aj v nádorovej imunológii (Festenstein, 1987; Gutierrez a spol., 1987; Garrido a spol., 1991), vo forennej medicíne (Májsky, 1979), v hematológii, v pôrodnictve,

HLA-komplex je hlavný histokompatibilný systém človeka. Kvôli širokému využitiu poznatkov o HLA-systéme vo výskume a v praxi stále sa hľadajú nové spôsoby ich typizácie. Doteraz používané sérologické a celúlarne metódy nezachytávajú rozsiahly polymorfizmus HLA-systému. Do praxe sa v súčasnosti zavádzajú metódy DNA-typizácie založené na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR). Na bežnú DNA-typizáciu HLA-alel triedy I sa používajú metódy PCR-SSO (sekvencne-špecifické oligonukleotidy), ako aj PCR-SSP (sekvencne-špecifické primery). V práci opisujeme metodický postup určovania HLA-alel triedy I metódou PCR-SSP, ktorú sme na našom pracovisku nedávno zaviedli, ako aj prehľad iných techník. (Obr. 1, lit. 34)

Kľúčové slová: HLA-antigény triedy I, DNA-typizácia, PCR-SSP.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 11, s. 597–600

v populačnej genetike a podobne (Buc a Ferenčík, 1994). Pre široké využitie poznatkov o HLA-systéme v praxi sa stále hľadajú nové spôsoby určovania HLA-antigénov, resp. HLA-génov.

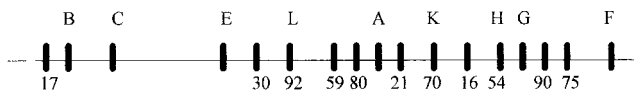
HLA-antigény triedy I a ich genetická determinácia

Antigény triedy I majú rovnakú štruktúru. Skladajú sa z dvoch polypeptidových reťazcov: z jedného ťažkého α a jedného ľahkého β . Ťažký reťazec je transmembránový glykoproteín s M_r 44 000 kódovaný z MHC oblasti, kým ľahký reťazec má M_r 11 500, je totožný s β_2 -mikroglobulínom a determinuje ho gén na 15. chromozóme (15q21-15q22) (Goodfellow a spol., 1975). Nepatrí k transmembránovým glykoproteínom a na ťažký reťazec sa nadväzuje nekovalentnými väzbami (Bjorkman a Parham, 1990). Každý α -reťazec sa orientuje tak, že približne tri štvrtiny polypeptidového reťazca, aminokupinového (-NH₂)-konca vyčnieva do extracelulárneho priestoru, má krátku hydrofóbnu časť v cytoplazmovej membráne a karboxylový koniec (-COOH) s 30 aminokyselinovými zvyškami sa nachádza v cytoplazme. Na základe primárnej sekvencie antigénov triedy I a kryštalickej štruktúry extracelulárnej časti molekuly môžeme molekuly triedy I rozdeliť do 4 oddelených častí: 1. aminokoncová časť viažúca peptid; 2. extracelulárne uložená časť podobaajúca sa imunoglobulínom; 3. transmembránová časť; 4. cytoplazmová časť (Bjorkman a spol., 1987).

Génová oblasť HLA-komplexu je umiestnená na krátkom ramene 6. chromozómu v oblasti 6p21. Zahŕňa úsek dlhý asi 3500–4000 kilobáz (kb), t.j. približne 3,5–4,0 cM (1 cM = 1000 kb), čo

Imunologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave
The Institute of Immunology, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava

Address for correspondence: E. Kulcsárová, MD, Imunologický ústav LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia.
Phone: +421.7.5357314, Fax: +421.7.5357578,
Internet: fazekasova@fmed.uniba.sk



Obr. 1. Génová oblasť triedy I HLA-komplexu (podľa Geraghtyho a spol., 1992, a Bodmera a spol., 1997).

Fig. 1. Gene region of class I HLA-complex molecules (by Geraghty et al., 1992, and Bodmer et al., 1997).

je asi 0,1 % genómu človeka. K základnej charakteristike HLA-systému patrí jeho komplexnosť a polymorfnosť. Komplexnosť určuje existencia viacerých lokusov a polymorfnosť podmieňuje alelový charakter génov jednotlivých lokusov (Francle a Pellegrino, 1977; Morton a spol., 1984).

Genetická oblasť triedy I HLA-komplexu zahŕňa veľa lokusov, na ktorých sídlia buď funkčné gény, alebo pseudogény. Tzv. "klasické" alebo Ia lokusy — HLA-A, HLA-B a HLA-C sú obsadené vzájomne sa vylučujúcimi alelami a ich produkty sa nachádzajú na každej jadrovej bunke. Vzdialenosť medzi telomerickým HLA-A a centromerickým HLA-B lokusom je približne 1 cM. Lokus HLA-C je umiestnený telomericky vo vzdialenosti 0,2 cM od HLA-B (Campbelle a Trowsdale, 1993).

K "neklasickým, ale funkčným" tzv. Ib lokusom patria HLA-E, -F a -G. Ostatné lokusy, na ktorých sídlia pseudogény, majú zatiaľ numerické označenie (podľa počtu kilobáz tu sídliaceho pseudogénu); iba štyri z nich majú oficiálne označenie (54 = HLA-H, 59 = HLA-J, 70 = HLA-K, 92 = HLA-L) (obr. 1). Existuje aj návrh, aby sa pseudogény označovali numericky a aby funkčné gény mali abecednú nomenklatúru, čím by sa zjednodušil prehľad o génovej mape HLA-komplexu. Poznáme 85 alel HLA-A determinujúcich 28 antigénov, 187 alel HLA-B determinujúcich 61 antigénov, 42 alel HLA-C kódujúcich 9 antigénov HLA-C, 5 alel pre HLA-E a 7 pre HLA-G (Bodmer a spol., 1997).

Gény kódujúce klasické antigény HLA triedy I majú exónovo-intrónovú štruktúru. 1. exón kóduje signálny peptid, 2., 3. a 4. exón kódujú domény $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, 5. exón kóduje transmembránovú časť, 6. a 7. exón kódujú cytoplazmovú časť molekuly. 8. exón, ktorý nie je translačný, je charakteristický svojou sekvenciou špecifickou iba pre daný lokus.

Určovanie HLA-antigénov

Polymorfnosť HLA-antigénov sa pôvodne študovala aglutinačným testom (Dausset, 1958; Payne a Rolf, 1958), lymfocytotoxickým testom a celulárnymi metódami, ako sú napr. test zmiešaných lymfocytových kultúr a test sekundárnych — primovaných lymfocytov (Buc, 1989). Určovaním HLA-antigénov uvedenými metódami sa objavil rozsiahly polymorfizmus HLA-systému. Štúdie väzby monoklonových protilátok pripravených proti HLA-antigénom ukázali, že tieto protilátky reagujú často s niekoľkými rôznymi antigénmi HLA, u ktorých sa dovtedy nezistila žiadna krížová reakcia, dokonca že niektoré monoklonové protilátky sa viažu aj na také antigény, ktoré sú kódované alelami viac ako jedného lokusu. Toto zistenie ešte viac sťažilo pochopenie diverzity antigénov HLA-systému. Sérologické a celulárne metódy nezachytávajú celý rozsah polymorfnosti a sú pomerne drahé, celulárne testy sú aj časovo náročné a nie sú dostatočne spoľahlivé. Preto jedine rôzne modifikácie DNA-typizácie majú jednoznačnú prednosť pri štúdiu polymorfizmu HLA-komplexu a následnom využívaní v medicínskej praxi. V súčasnosti sa na zistenie polymorfizmu HLA-komplexu používajú takmer výlučne

len metódy molekulárnej genetiky — DNA-typizácie (Trachtenberg a Erlich, 1996). Špekulácie o rozsahu polymorfizmu HLA-systému budú zrejme čoskoro rozriešené použitím moderných techník molekulárnej genetiky. S postupným určovaním nukleotidových sekvencií sa vytvára nový obraz komplexnosti HLA-systému a jeho alelových variantov. Napr. teraz je známych 11 alel HLA-B27, 19 alel HLA-A2, 4 alely antigénu HLA-A30 atď. Ostáva úloha objasniť, či tieto DNA-sekvenčné rozdiely majú nejaký klinický význam.

DNA-typizácia HLA-alel triedy I

DNA-typizácia HLA-alel triedy I pozostáva z niekoľkých krokov. Prvým krokom je získanie DNA od vyšetrovanej osoby.

1. *Izolácia DNA*: Výber spôsobu izolácie DNA závisí od východiskového materiálu a od toho, na čo bude DNA použitá (Ehrlich, 1989). Najčastejšie sa DNA izoluje z periférnej krvi, ale dá sa izolovať aj zo spermií, z vlasov, či z krvných škvrn na tkanive (Májský, 1986). Izolovaná DNA nemusí byť úplne čistá. Do reakčnej zmesi sa najčastejšie dáva v koncentráciách 0,1—1 μ g. Ak je táto koncentrácia nižšia, DNA sa ľahko kontaminuje inou DNA a dôjde k falošným výsledkom. Ak je naopak koncentrácia DNA príliš vysoká, reakčná zmes obsahuje veľa inhibítorov Taq-polymerázy (SDS, urea a podobne) (Sambrook a spol., 1989).

Najčastejšou metódou izolácie DNA z periférnej krvi je fenol-chloroformová extrakcia, ktorú používame aj my na našom pracovisku. Metóda zahŕňa nasledujúce kroky: lýza buniek; inhibícia nukleáz, disociácia nukleoproteínového komplexu a deproteinizácia; odstránenie proteínov a bunkových častíc; precipitácia DNA. Takto získaná DNA je pripravená pre účely PCR a možno ho uchovávať pri -20 °C, príp. -70 °C niekoľko rokov.

2. *Reakcia PCR*: Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je automatizovaná metóda pre amplifikáciu určitej známej sekvencie DNA. Jej rozšírenie po roku 1988 znamená metodickú revolúciu v laboratóriách molekulej biológie pri riešení teoretických, ale aj praktických problémov súčasnej genetiky, biológie, imunológie, biochémie a mnohých medicínskych odborov. Možnosti aplikácie PCR sú nekonečné a stále rastú. Touto reakciou sa dajú syntetizovať milióny kópií určitého úseku DNA jednoduchým, rýchlym a automatizovaným spôsobom.

Na uskutočnenie PCR treba mať DNA, ktorá sa má amplifikovať, oligonukleotidové primery, DNA-polymerázu, štyri deoxynukleozidtrifosfáty (dNTP), tlmivý roztok s vhodným zložením, $MgCl_2$ a automat zabezpečujúci cyklické zmeny teploty. PCR je cyklickým opakovaním 3 krokov: Prvý krok predstavuje denaturácia DNA (oddelenie reťazcov) — pri teplote 94 — 96 °C, ktorú treba udržiavať presne v tomto rozpätí. Môže sa to zabezpečiť iba automatickým zariadením. Počas tohto kroku sa rozrušia relatívne slabé vodíkové väzby medzi dvoma vláknami DNA a reťazce sa oddelia. Počas druhého kroku sa oligonukleotidové primery pripoja ("anneal"), čiže hybridizujú s komplementárnymi úsekmi rozpletených reťazcov. Dosiahne sa to znížením teploty na 37 — 70 °C. Teplota tuhnutia (annealing temperature) závisí od dĺžky a od sekvencie primerov a je veľmi dôležitá, lebo pri nižších teplotách vznikajú vo väčšej miere nešpecifické väzby primeru, a tým sa produkujú nežiaduce produkty. Tretí krok predstavuje predĺžovanie reťazca DNA v smere $5' \rightarrow 3'$. Uskutočňuje ho termostabilná Taq-polymeráza v prítomnosti dATP, dGTP, dTTP, dCTP. Novosyntetizované produkty slúžia po denaturácii v ďalšom cykle ako nové templáty, čím sa počet fragmentov DNA exponenciálne zvyšuje. Jeden cyklus trvá väčšinou 3 minúty, t.j. 60 sekúnd trvá denaturácia DNA pri 95 °C, 60 sekúnd väzba primerov na templát a 60 sekúnd predĺženie párov primerov pri 72 °C. Reagencie sa pipetujú do reakčnej skúmavky

v mikrolitrových objemoch a sú komerčne dostupné, vrátane primerov. Vlastná PCR sa uskutočňuje v 0,5 ml centrifugačných skúmavkách, ktorých väčší počet sa môže naraz vložiť do prístroja (väčšinou 96). V každej skúmavke sa amplifikuje jeden fragment DNA.

PCR je geniálne jednoduchá metóda na amplifikáciu DNA a je extrémne citlivá. Na amplifikáciu templátu stačí teoreticky aj 1 molekula DNA, čo však vyžaduje veľké nároky na manipuláciu s PCR vzorkami a na reakčné podmienky.

Pri DNA-typizácii HLA-alel sa amplifikuje 2. a 3. exón príslušnej alely — keďže podľa exónovo-intrónovej štruktúry za špecifickosť celej molekuly zodpovedá 2. a 3. exón toho génu, ktorý kóduje reťazec. Amplifikácia sa uskutočňuje pomocou PCR buď so sekvenčne špecifickými primermi, alebo s lokusovo špecifickými primermi. V prvom prípade je PCR priamou typizačnou metódou, lebo tu dôjde k selektívnej amplifikácii — napr. metóda PCR-SSP. V druhom prípade je potrebná ďalšia analýza produktu PCR, lebo sa použijú lokusovo špecifické primery, ktorých sekvencie sú komplementárne k sekvenciám všetkých alel daného lokusu. To znamená, že produkt PCR bude rovnaký bez ohľadu na konkrétnu alelu prítomnú na lokuse. Patria sem metódy PCR-SSO, PCR-SSCP, PCR-RFLP, priame sekvenovanie, heteroduplexová analýza.

A. Metóda PCR-RFLP ("restriction-fragment length polymorphism")

Po prebehnutí PCR sa produkt analyzuje so špecifickými reštrikčnými endonukleázami. Sú to enzýmy, ktoré rozpoznávajú na DNA určitú sekvenciu 4—6 nukleotidov a v tomto mieste ju rozštiepia na 2 fragmenty. V závislosti od sekvencie DNA sa mení počet a poloha reštrikčných miest, a tým vznikajú fragmenty rozdielnej dĺžky. Táto metodika sa používa najmä na HLA-typizáciu pre gény DQA1 a DQB1. Metodika zahŕňa amplifikáciu 2. exónu pomocou PCR s lokusovo alebo skupinovo špecifickými primermi. Enzýmy na štiepenie sa vyberajú tak, aby v sekvencii príslušného 2. exónu mali v závislosti od sekvencie prítomnej alely buď nijaké, alebo len 1—2 reštrikčné miesta. Výsledky štiepenia s endonukleázami sa vyhodnocujú na UV-transluminátore po elektroforéze fragmentov DNA v akrylamidovom alebo agarózovom géli (Tatari a spol., 1995).

B. Metóda PCR-SSP ("sequence-specific primer")

Na typizáciu jednej vzorky sa používa viacero PCR reakcií súčasne s použitím viacerých párov sekvenčne špecifických primerov. Sekvencie primerov zahŕňajú rôzne sekvenčné motívy nachádzajúce sa vo variabilných oblastiach 2. exónu príslušných HLA-génov. Primery sa vyberajú tak, aby bol jeden pár primerov komplementárny len k sekvencii jednej alely. To znamená tak, aby sa na základe toho, ktoré reakcie boli pozitívne a ktoré negatívne, dal určiť HLA-genotyp. Po ukončení PCR sa ich produkty nanesú na agarózový gél zafarbený etídium-bromidom a po prebehnutí elektroforézy sa výsledky vyhodnotia na UV-transluminátore. Používa sa na rutinnú genotypizáciu a je vhodná aj na transplantáčne účely (hlavne v prípade kadeveróznej transplantácie), lebo trvá len 2 hodiny. Túto metódu zaviedol do rutínnej HLA-typizácie Olerup (Olerup a Zetterquist, 1992) a v súčasnosti sa tento systém dodáva aj firemne vo forme sady primerových párov. Táto metóda nie je vhodná na typizáciu veľkého množstva vzoriek súčasne (Bunce a spol., 1995).

C. Metóda PCR-SSO ("sequence-specific oligonucleotide")

Táto metóda bola vôbec prvou metódou PCR-DNA-typizácie a navrhli ju Angelini a spol. (1986). Je veľmi presná, umožňuje rozlíšiť jednotlivé alely. Sekvenčne špecifické oligonukleotidy sú syntetické jednovláknové úseky DNA s dĺžkou približne 20 nuk-

leotidov, ktoré sú komplementárne k terčovej sekvencii DNA, na základe čoho s ňou hybridizujú. SSO sa rádioaktívne alebo enzymaticky označia a v prípade hybridizácie dávajú pozitívny signál. PCR-SSO metóda sa používa na antropologické štúdie a na analýzu veľkého množstva vzoriek (Kennedy a spol., 1995).

D. Metóda PCR-heteroduplexová analýza

Heteroduplex je dvojitá molekula DNA (alebo RNA), ktorá nevykazuje úplnú komplementárnosť báz, napr. zmiešanie normálnej a mutovanej DNA tej istej alely. Metóda deteguje heteroduplexy medzi rôznymi alelami v individuálnej vzorke alebo v zmesi dvoch vzoriek. Je veľmi citlivá na detegovanie rozdielov medzi dvoma jedincami (v molekulárnej genetike sa využíva predovšetkým na dôkaz bodových mutácií). Vznik heteroduplexu DNA sa deteguje v polyakrylamidovom géli, ak je jedna alela kratšia ako druhá (Pursall a spol., 1996).

E. Metóda PCR-SSCP ("single-strand conformation polymorphism")

Je založená na rozdieloch v elektroforetickej pohyblivosti jednoreťazcovej DNA z rôznych alel. Po sekvenčne špecifickej amplifikácii 2. alebo 3. exónu a získaní jednoreťazcovej DNA sa identifikujú rozdielne alely na základe rozdielnych konformačných zmien jednotlivých alel. Táto technika umožňuje kompletnú subtypizáciu HLA-A, HLA-B a HLA-C lokusu (Blasczyk a spol., 1995).

F. Metóda PCR-priame sekvenovanie

Je to metóda na presné určenie poradia nukleotidov určitého úseku DNA. V súčasnosti sa používajú automatické sekvenátory, ktoré určujú sekvenciu produktu PCR na základe rôzne fluorescenčne značených nukleotidov. Využíva sa hlavne v teoretickom výskume, napr. na zistenie sekvencií novoobjavených HLA-alel (Petersdorf a Hansen, 1995).

Na bežnú DNA-typizáciu HLA-alel triedy I sa používajú metódy tak PCR-SSO (Oh a spol., 1993), ako aj PCR-SSP (Bunce a spol., 1995). Pri porovnávaní týchto metód sa zistila 100 % korelácia, t.j. obidvoma metódami sa HLA-alely správne určili. Naopak, pri sérologickom mikrocitotoxickom teste sa zistilo 7,5 % zle určených antigénov a niektoré (6 antigénov) sa nedali určiť (Bozón a spol., 1996). Iní autori udávajú až 12 % rozdielnosť medzi výsledkami získanými sérologickými metódami a DNA-metódami (Blasczyk a spol., 1995).

Na našom pracovisku po zavedení metód DNA-typizácie pre HLA-alely triedy II (Olerup a Zetterquist, 1992) začíname zavádzať DNA-typizáciu triedy I pomocou PCR-SSP. Používame 103 zmesí sekvenčne špecifických primerov; používaná metóda dáva väčšiu, resp. ekvivalentnú rozlišovaciu schopnosť ako sérometódy a nemá problémy vyplývajúce z krížovej reaktivity pri séroreakciách. Touto metódou sa dá veľká väčšina heterozygotných kombinácií určiť, nedajú sa rozlíšiť iba niektoré kombinácie, napr. HLA-B53 homozygot sa nedá odlišiť od HLA-B53 a HLA-B77 heterozygota. Väčšia rozlišovacia schopnosť sa dá dosiahnuť pridaním ďalších primerov alebo použitím subtypizačných setov.

Záver

PCR-SSP technika má oproti PCR-SSO niekoľko výhod. Pre svoju rýchlosť, špecifickosť a nižšie náklady je výhodnejšia ako sérotypizácia. Je jednoduchšia a praktickejšia ako PCR-SSO, lebo nevyžaduje značné množstvo SSO sond, ich značenie (rádioizotopmi) a striktné hybridizačné podmienky. Je veľmi rýchla a lacná, hlavne ak typizujeme malé množstvo vzoriek. Je oveľa menej technicky náročná. Predovšetkým kvôli týmto vlastnostiam sme sa rozhodli

pre uprednostnenie tejto metódy pred PCR-SSO, keďže ostatné techniky na typizáciu HLA-antigénov triedy I sú technicky, finančne a časovo veľmi náročné (PCR-SSCP, priame sekvenovanie, heteroduplexová analýza). V budúcnosti by sme chceli urobiť základnú populačno-genetickú štúdiu frekvencie výskytu jednotlivých alel triedy I v slovenskej populácii; zapojiť sa do transplantáčného programu a DNA-typizáciou prispieť k presnejšiemu určovaniu HLA-antigénov triedy I pri výbere páru darca—prijemca pri transplantácii kostnej drene a študovať asociácie niektorých vybraných autoimunitných chorôb k alelám HLA-A, HLA-B a HLA-C.

Literatúra

- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennet W.S., Strominger J.L., Wiley D. C.:** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329, 1987, s. 506–512.
- Bjorkman P.J., Parham P.:** Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Ann. Rev. Biochem.*, 59, 1990, s. 253–288.
- Blasczyk R., Hahn U., Wehling J., Huhn D., Salama A.:** Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis. *Tissue Antigens*, 46, 1995, č. 2, s. 86–95.
- Bodmer J.G., Marsh G.E., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Fauchet R., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.I.:** Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, 49, 1997, č. 3, s. 297–321.
- Bozon M.V., Delgado J.C., Turbay D., Salazar M., Granja C.B., Alosco S.M., Dupont B., Yunis E.J.:** Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two PCR based DNA typing methods: implications for proficiency testing. *Tissue Antigens*, 47, 1996, č. 6, s. 512–518.
- Buc M.:** HLA komplex v biológii a medicíne. Bratislava, Veda 1989, 188 s.
- Buc M., Ferenčík M.:** Imunogenetika. Bratislava, Alfa plus 1994, 364 s.
- Bunce M., Fanning G.C., Welsh K.I.:** Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, 45, 1995, s. 81–90.
- Campbell R.D., Trowsdale J.:** Map of the human MHC. *Immunol. Today*, 14, 1993, s. 349–352.
- Dausset J.:** Isoleuco-anticorps. *Acta Haematol. (Basel)*, 20, 1958, s. 156–161.
- Doherty P. C., Zinkernagel R. M.:** A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet*, 1, 1975, s. 1406–1409.
- Ehrlich H.A.:** PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification. New York, Stocton Press 1989, 486 s.
- Festenstein H.:** The biological consequences of altered MHC expression on tumors. *Brit. Med. Bull.*, 43, 1987, s. 217–227.
- Francle U., Pellegrino M.A.:** Assignment of the MHC to a region of the short arm of human chromosome 6. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 1977, s. 1147–1151.
- Garrido F., Cabrera T., López Nevot M.A., Ruiz-Cabello F.:** HLA class I antigens in human tumors. *Adv. Cancer Res.*, 67, 1995, s. 155–195.
- Geraghty D.E., Koller B.H., Hansen J.A., Orr H.T.:** The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments. *J. Immunol.*, 149, 1992, č. 6, s. 1934–1946.
- Goodfellow P.N., Jones E.A., van Heymogen V., Solomon E., Bobrow M., Miggiano V., Bodmer W.F.:** The beta-2 microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature*, 254, 1975, s. 267–269.
- Gutierrez J., López Nevot M.A.:** Class I and II HLA antigen distribution in normal mucosa, adenoma and colon carcinoma: Relation with malignancy and invasiveness. *Exp. Clin. Immunogenet.*, 4, 1987, s. 144–152.
- Hána I., Ivašková E., Dostál C.:** Hlavní histokompatibilní systém člověka (HLA) a nemoci. Praha, Avicenum 1982, 240 s.
- Kennedy L.J., Poulton K.V., Dyer P.A., Ollier W.E., Thomson W.:** Definition of HLA-C alleles using sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). *Tissue Antigens*, 46, 1995, č. 3, s. 187–195.
- Macurová H., Ivašková E., Jírka J., Reneltová I., Kašík J., Kočandrele V.:** Význam histokompatibility a některých dalších faktorů pro transplantaci ledvin. *Čas. Lék. čes.*, 125, 1986, č. 41–42, s. 1266–1269.
- Májský A.:** Pukaz HLA antigenu v krevních skvrnách. *Čas. Lék. čes.*, 125, 1986, č. 28, s. 865–868.
- Májský A.:** HLA a paternitní spory. *Čas. Lék. čes.*, 118, 1979, č. 12, s. 366–368.
- Morton C.C., Kirsch I.R., Nance W.E., Evans G.A., Korman A.J., Strominger J.L.:** Orientation of loci within the MHC by chromosomal in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 1984, s. 2816–2820.
- Oh S.H., Fleischhauer K., Yang S.Y.:** Isoelectric focusing subtypes of HLA-A can be defined by oligonucleotide typing. *Tissue Antigens*, 41, 1993, s. 135–142.
- Olerup O., Zetterquist H.:** HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39, 1992, s. 225–235.
- Payne R., Rolfs M.R.:** Foeto-maternal incompatibility. *J. clin. Invest.*, 27, 1958, s. 1756–1761.
- Petersdorf E.W., Hansen J.A.:** A comprehensive approach for typing the alleles of the HLA-B locus by automated sequencing. *Tissue Antigens*, 46, 1995, č. 2, s. 73–85.
- Pursall M.C., Clay T.M., Bidwell J.L.:** Combined PCR- heteroduplex and PCR-SSCP analysis for matching of HLA-A,-B and -C allotypes in marrow transplantation. *Europ. J. Immunogenet.*, 26, 1996, s. 41–53.
- Nyulassy Š., Iványi P.:** HL-A systém a choroby. *Prehľad súčasných poznatkov. Čas. lék. čes.*, 114, 1975, s. 387–397.
- Sambrook J.:** Molecular Cloning. A laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Lab. Press 1989.
- Santos G.W., Yeager A.M., Jones R.J.:** Autologous bone marrow transplantation. *Ann. Rev. Med.*, 40, 1989, s. 99–112.
- Tatari Z., Fortier C., Bobrynina V., Loiseau P., Charron D., Raffoux C.:** HLA-Cw allele analysis by PCR-RFLP study of known and additional alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1995, č. 19, s. 8803–8807.
- Terasaki P.I., Opelz G., Mickey M.R.:** Clinical kidney transplants. *Cell. Immun.*, 62, 1981, č. 2, s. 277–286.
- Trachtenberg E.A., Erlich H.A.:** DNA-based HLA typing for cord blood stem cell transplantation. *J. Hematother.*, 5, 1996, č. 3, s. 295–300.

Do redakce došlo 7.10.1997.