

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Zuzana Kroulíková

Vyšetření HLA systému a KIR genů u dárců a příjemců kostní dřeně

Study of HLA antigens and KIR genes in a donors and recipients of bone marrow

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

Ing. Milena Vraná

Praha, 2017

Poděkování:

Děkuji paní Ing. Mileně Vrané za odborné vedení práce, cenné rady a vstřícný přístup.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2017

Abstrakt

HLA a KIR geny dosahují vysoké míry polymorfismu v rámci lidského genomu. Proteinové produkty těchto genů hrají významnou roli při transplantacích hematopoetických kmenových buněk. Genetická shoda na úrovni HLA genů mezi recipientem a donorem představuje hlavní rizikový faktor přihojení transplantátu a následné úspěšné léčby. Z tohoto důvodu je nezbytná genotypizace donorů a recipientů indikovaných k transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Za účelem vyšetření se využívají různé modifikace polymerázové řetězové reakce a přímé sekvenování, typizovány jsou geny HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 a HLA-DQB1 na úrovni high- a low- rozlišení. Na základě typizace těchto genů je aplikována tzv. 10/10 shoda při výběru vhodného donora v registru dárců.

Při léčbě pacientů s diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií zvyšuje pravděpodobnost potlačení relapsu onemocnění a obecné přežití pacientů KIR genotyp donorů, nejvyššího léčebného efektu dosahuje Cen-B/B dárcovský haplotyp. Z tohoto důvodu dochází k typizaci KIR pomocí polymerázové řetězové reakce, výsledný genotyp je porovnáván online kalkulátorem v IMGT/KIR databázi. Vybraní donoři jsou selektováni do skupin dle svého genotypu a jeho vlivu na výsledný efekt léčby.

Studium polymorfních systémů a vývoj metod genetické typizace donorů a recipientů významně ovlivňují úspěšnost transplantací buněk kostní dřeně a následnou léčbu pacientů.

Klíčová slova:

HLA, KIR, transplantace hematopoetických kmenových buněk, HLA typizace, KIR typizace

Abstract

HLA and KIR genes are highly polymorphic regions within the human genome. Protein products of these genes play a critical role in hematopoietic stem cell transplantation. Genetic HLA match is a major barrier to engraftment and influences the outcome of this therapy. Therefore it is necessary to genotype donors and recipients selected for hematopoietic stem cell transplantation. Today HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genes are tested by modifications of polymerase chain reaction or by sequence-based typing methods on the level of high- or low-resolution. Donors registered in bone marrow registries are selected on the basis of a 10/10 match.

Donors KIR genotype leads to a better outcome, to relapse-free survival and overall survival in treatment of patients with acute myeloid leukemia. A better protection against relapse is achieved by Cen-B/B donor haplotype. Therefore KIR typing by polymerase chain reaction is used and the genotype is compared with the IMGT/KIR database by an online B-content calculator. Donors are divided in groups according to their genotype and their influence on the success of treatment for acute myeloid leukemia.

The study of polymorphic systems and the development of genotyping donors and recipients significantly improve the outcome of hematopoietic stem cell transplantation and subsequent treatment.

Key words:

HLA, KIR, hematopoietic stem cell transplantation, HLA typing, KIR typing

Seznam zkratk

AID	Auto Immune Disease autoimunitní onemocnění
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia akutní lymfoidní leukémie
AML	Acute Myeloid Leukemia akutní myeloidní leukémie
BMF	Bone Marrow Failure selhání kostní dřeně
CLL	Chronic Lymphocytic leukemia chronická lymfoidní leukémie
CML	Chronic Myeloid Leukemia chronická myeloidní leukémie
GvHD	Graft versus Host Disease reakce štěpu vůči hostiteli
GvL	Graft versus Leukemia effect reakce štěpu vůči leukemickým buňkám
HD	Hodgkin's Lymphoma Hodgkinův lymfom
HLA	Human Leukocyte Antigen lidský hlavní histokompatibilní antigen
HSC	Hematopoietic Stem Cell hematopoetické kmenové buňky
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation transplantace hematopoetických kmenových buněk
IDM	Inherited Disorders of Metabolism dědičné metabolické poruchy
KIR	Killer Immunoglobulin-like Receptors receptory NK buněk imunoglobulinové rodiny
MDS	Myelodysplastic Syndrome myelodysplastický syndrom
MHC	Major Histocompatibility Complex hlavní lidský histokompatibilní řetězec

MPN	Myeloproliferative Neoplasm myeloproliferativní neoplazie
NHL	Non-Hodgkin's Lymphoma Non-Hodgkinův lymfom
NK	Natural Killers „přirození zabijáci“
SBT	Sequence-Based Typing přímé sekvenování
PCD	Plasma Cell Disorders poruchy plazmatických buněk
PCR-SSOP	PCR with sequence-specific oligonucleotide probes PCR se specifickými oligonukleotidovými sondami
PCR-SSP	PCR with sequence-specific primers PCR se sekvenčně specifickými primery
PID	Primary Immune Deficiencies primární imunodeficiencie

Obsah

1.	Úvod	1
2.	HLA	2
2.1.	Genetická organizace HLA systému	2
2.2.	Struktura molekul HLA systému	3
2.3.	Funkce HLA systému	3
2.4.	Vyšetření HLA systému	6
2.4.1.	Typizace HLA u recipientů a donorů	7
3.	KIR	9
3.1.	Genetická organizace KIR genů	9
3.2.	Struktura KIR receptorů	9
3.3.	Funkce KIR receptorů.....	10
3.4.	Vyšetření KIR genů	13
3.4.1.	Typizace KIR u recipientů a donorů	13
4.	Indikace HSCT	15
5.	Komplikace HSCT – GvHD.....	16
6.	Vývoj HSCT	18
7.	Závěr.....	19
8.	Seznam literatury	20

1. Úvod

Transplantace hematopoetických kmenových buněk jsou cíleny k léčbě hematologických pacientů či pacientů s vrozenými či získanými poruchami krvetvorby. Zásadní roli v úspěšnosti této léčby hraje typizace HLA a KIR genů u dárců a příjemců buněk kostní dřeně. Geny HLA systému a receptorů rodiny KIR dosahují vysoké hodnoty polymorfismu v rámci lidské populace. Interakce HLA molekul s KIR receptory hrají významnou roli při imunitních odpovědích a zároveň představují podstatný faktor úspěšnosti transplantací buněk kostní dřeně.

Genový komplex HLA je lokalizován na krátkém raménku šestého chromozomu, nesmírná variabilita alel tohoto systému ztěžuje úspěšnost allogenních transplantací. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné genotypizovat donory a recipienty a vyhledávat geneticky blízké páry. Byla-li by provedena allogenní transplantace buněk kostní dřeně mezi geneticky neshodnými páry, hrozilo by odvrhnutí transplantátu či reakce štěpu vůči hostiteli s až smrtelnými následky.

Region kódující KIR geny je umístěn na dlouhém raménku devatenáctého chromozomu, jeho proteinové produkty regulují cytotoxickou aktivitu NK buněk. KIR genotyp donorů hraje důležitou roli při transplantacích hematopoetických kmenových buněk cílených k léčbě akutní myeloidní leukémie.

Typizační metody výše zmíněných genů jsou nezbytné k předcházení komplikací tohoto typu léčby a posouvají transplantace buněk kostní dřeně mezi denně využívané léčebné procedury po celém světě.

Cílem této práce je teoretický popis výše zmíněné problematiky a aktuálních metodických postupů, které jsou rutinně využívány klinickými laboratořemi, jež se zabývají typizací HLA a KIR genů u dárců a příjemců kostní dřeně. Dále práce poskytuje základní přehled o souvislostech spojených s transplantacemi hematopoetických kmenových buněk, např. stručný přehled o indikacích, komplikacích a vývoji tohoto stále častěji využívaného léčebného procesu.

Popsaný konkrétní postup typizace HLA a KIR genů vychází z tzv. algoritmu HLA Laboratoře Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze, jenž je využíván při genetických vyšetřeních u pacientů podstupujících transplantaci kostní dřeně a jejich příbuzných či nepříbuzných dárců.

2. HLA

2.1. Genetická organizace HLA systému

Lidský hlavní histokompatibilitní systém (MHC) neboli lidský histokompatibilitní antigen (HLA systém) se řadí k nejkompexnějším oblastem lidského genomu. Jeho proteinové produkty vykazují nejvyšších hodnot polymorfismu v rámci veškeré proteinové výbavy člověka. Lidský MHC systém, lokalizovaný v regionu 6p21.3 šestého chromosomu, dosahuje délky 4 Mb, zahrnuje 269 identifikovaných lokusů a obsahuje více než 220 genů. Proteinové produkty těchto genů hrají roli převážně v imunitním systému. Z hlediska klinického využití při orgánových transplantacích je středem zájmu tohoto systému zejména 21 polymorfických genů. (Consortium 1999; cit. dle Sasazuki, Inoko et al. 2016)

V rámci MHC se vyskytují tři rozdílné oblasti:

Oblast kódující MHC glykoproteiny I. třídy (HLA gp I) je lokalizovaná na telomerickém konci šestého chromozomu. Obsahuje geny kódující molekuly HLA gp I, tedy tzv. klasické geny kódující molekuly HLA-A, HLA-B a HLA-C, tzv. neklasické geny kódující HLA-E, HLA-F, HLA-G, HFE a dvanáct pseudogenů a tzv. class I-like geny MICA, MICB s dalšími pěti pseudogeny. (Horton, Wilming et al. 2004) Právě klasické geny HLA gp I jsou hlavními polymorfními úseky oblasti kódující HLA. Jejich proteinové produkty jsou značeny jako tzv. klasické antigeny vyskytující se na povrchu většiny buněk organismu. Nejvyšší úroveň polymorfismu dosahuje jednoznačně gen HLA-B. (Mungall, Palmer et al. 2003)

Oblastí lokalizovanou naopak na centromerickém konci chromozomu je region pro MHC glykoproteiny II. třídy (HLA gp II), vyskytují se zde tzv. geny klasické pro HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 a HLA-DPB1 a geny non-klasické HLA-DM a HLA-DO.

Mezi těmito dvěma regiony se nachází oblast pro MHC glykoproteiny III. třídy, kódující tzv. non-HLA geny, související též s funkcí imunitního systému, ne však výlučně s funkcí HLA systému. (Robinson, Halliwell et al. 2015)

Dalšími genovými clustery lokalizovanými na krátkém raménku šestého chromozomu je například histonový supercluster, jenž platí za nejdelší histonový cluster v rámci lidského genomu a zároveň za nejobsáhlejší kódující oblast v MHC (Marzluff, Gongidi et al. 2002), tRNA supercluster, též nejdelší tRNA cluster v lidském genomu, geny zodpovědné za tvorbu proteinů tepelného šoku či cytokinů rodiny TNF a další. Celkem je tedy MHC oblast představována šesti genovými superclustery a šesti clustery. (Horton, Wilming et al. 2004)

2.2. Struktura molekul HLA systému

Proteinové produkty zejména HLA I klasických genů jsou kodominantně exprimovány na většině jaderných buněk v podobě transmembránových glykoproteinů. Heterodimerní povaha těchto komplexů je definována třemi doménami těžkého transmembránového řetězce α , orientovaného karboxylovým koncem do cytoplazmatického prostoru buňky, a β_2 -mikroglobulinem asociovaným s α řetězcem nekovalentními interakcemi. Vazebné místo pro peptidové fragmenty intracelulárního původu umožňují domény α_1 a α_2 vytvářející strukturně pomyslný žlábek. Tato rýha je na obou stranách uzavřena a je velikostně limitující, z tohoto důvodu jsou komplexy HLA gp I schopny vázat peptidy o velikosti 8-10 aminokyselin. Molekuly kódovány HLA II geny jsou exprimovány na povrchích tzv. antigen-prezentujících buněk. Heterodimerní komplexy jsou složeny ze dvou nekovalentně spojených transmembránových řetězců α a β . Žlábek pro vazbu antigenů vzniká vzájemnými interakcemi domén α_1 a β_1 , není velikostně limitující a umožňuje vazbu peptidů o délce obvykle 15-35 aminokyselin. (Goodfellow et al. 1975; cit. dle Edinur, Manaf et al. 2016)

2.3. Funkce HLA systému

Úlohou molekul HLA systému je vazba peptidových fragmentů a jejich následná prezentace okolí. Tato činnost je nesmírně důležitou pro nastolení rovnováhy mezi tolerancí imunitního systému vůči vlastním a fyziologicky normálním buňkám či zahájení adekvátní imunitní odpovědi na základě rozpoznání cizích antigenů. HLA systém tedy představuje jakési rozhraní vrozené a adaptivní složky imunitního systému.

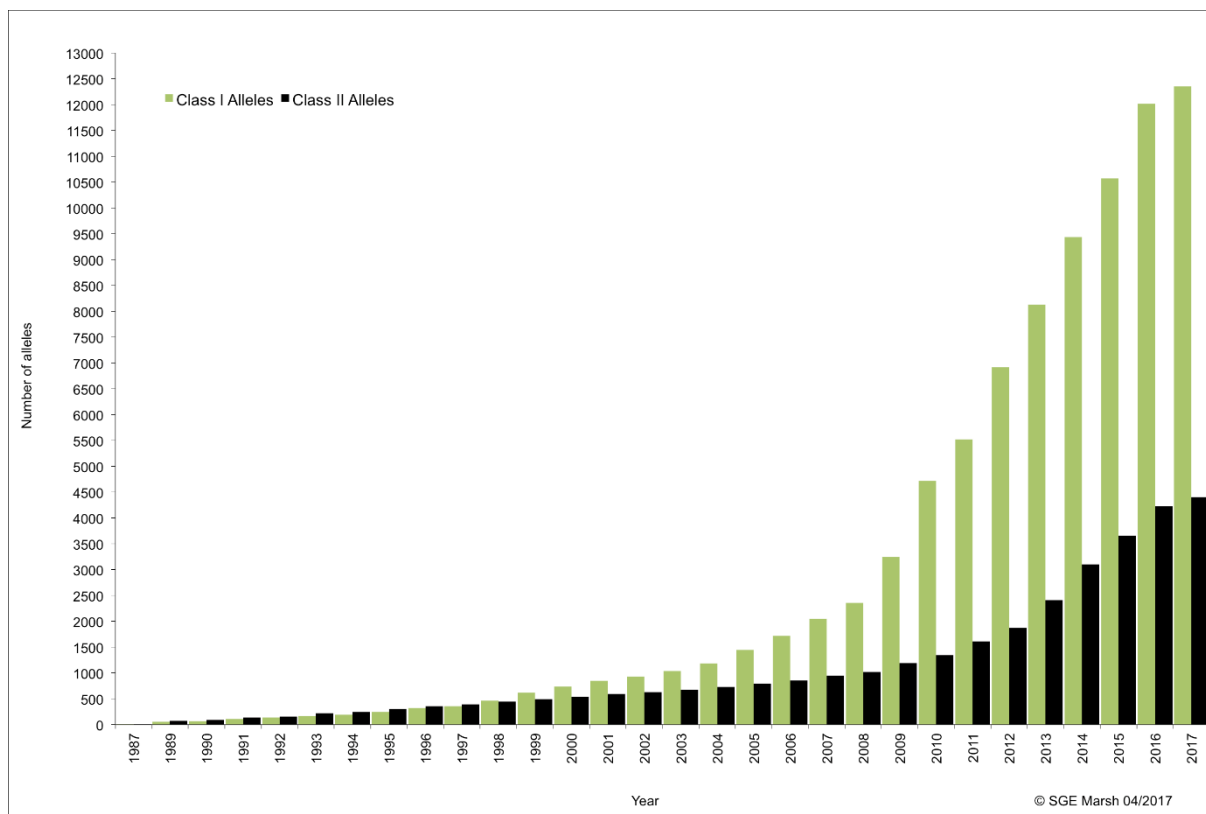
Vazebné místo molekul HLA I. třídy umožňuje vazbu peptidů intracelulárního původu dopravených na membránu buňky. Vůči těmto peptidovým ligandům jsou afinitní receptory $CD8^+$ T lymfocytů a receptory NK buněk (a některých T lymfocytů) imunoglobulinové povahy (KIR).

Molekuly HLA II. třídy vystavují okolí skrze své vazebné domény peptidové fragmenty extracelulárního původu přijaté buňkou pomocí endocytózy. S těmito peptidovými řetězci interagují receptory $CD4^+$ T buněk.

Zásadní vlastností HLA systému je jeho vysoká míra polymorfismu, projevující se početným zastoupením jednotlivých alel v populaci. Úroveň polymorfismu je významnou úlohou jednak ve fitness organismu a jeho odolávání vůči patogenům a infekcím, ale taktéž je klíčovou i na úrovni celé populace.

Intenzivní studium polymorfismu HLA přináší stále vyšší počet dosud známých alel. Neustále přibývajícím datům je nezbytné třídit a shromažďovat, 16. prosince 1998 byla z tohoto důvodu vytvořena IMGT/HLA databáze, v rámci které jsou každé tři měsíce veškerá data aktualizována. Pro představu

neustálého růstu počtu známých alel bylo v listopadu 2015 dosaženo hodnoty 14 000 známých alel HLA (Robinson, Soormally et al. 2016), pro porovnání v listopadu 2014 obsahovala tato databáze 12 000 genových variant HLA. (Robinson, Halliwell et al. 2015) Nově známé alely jsou rutinně definovány molekulárně typizačními metodami a next-generation sekvenčními technikami. Zdroji objevů nových alel bývají nejčastěji klinická pracoviště z celého světa, zabývající se typizací HLA za účelem vyhledávání potenciálních donorů buněk kostní dřeně či komerční sféra zabývající se zprostředkováním partnerství mezi dárcovskými registry hematopoetických kmenových buněk.



Graf č. 1: Nárůst počtu známých HLA alel v rámci IMGT/HLA databáze v rozmezí let 1989–2017.

Zeleně jsou značeny HLA gp I, černě HLA gp II. Zdroj: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html>

IMGT/HLA databáze umožňuje studium sekvencí HLA genů a jejich progresivně přibývajících známých sekvenčních variant mezi potenciálním donorem a recipientem allogenních hematopoetických kmenových buněk, neboť právě shoda mezi HLA dárce a příjemce představuje hlavní rizikový faktor allogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Shoda HLA lokusů je charakterizována na úrovni nukleotidových sekvencí domén HLA gp I a HLA gp II.

Celkový počet známých alel HLA systému dosahoval v květnu 2017 počtu 16 755 alel, z toho 12 351 připadalo na HLA I. třídy a 4 404 na HLA II. třídy (zahrnuty jsou i pseudogeny). (zdroj: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>)

HLA gp I	Gen	Počet alel	HLA gp II	Gen	Počet alel
	A	3 913		DRA	7
B	4 765	DRB	2 311		
C	3 510	DQA1	78		
E	25	DQB1	1 079		
F	22	DPA1	45		
G	54	DPB1	828		
		DM	20		
		DO	25		

Tabulka č. 1: Počet alel HLA I. a II. třídy známý k poslednímu aktualizovanému datu (květen 2017)

Zdroj: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>

2.4. Vyšetření HLA systému

Míra shody mezi antigeny HLA donora a recipienta hraje hlavní roli při úspěšnosti transplantací hematopoetických kmenových buněk. Oproti jiným orgánovým transplantacím jsou transplantace buněk kostní dřeně z technického hlediska jednodušší, naopak ale přinášejí potenciálně závažnější rizika. Hlavním cílem transplantace hematopoetických buněk je osídlení prostředí pacientovy kostní dřeně hematopoetickými buňkami dárce, jež umožní následnou přirozenou krvetvorbu příjemce. Dnes jsou jako zdroj hematopoetických kmenových buněk využívány kostní dřeň, pupečnicková krev či periferní krev donora. Tento typ léčby je indikován u pacientů se získanou či vrozenou poruchou krvetvorby, imunodeficiencí, při některých metabolických onemocněních či při onkologických onemocněních krvetvorby.

Zhruba 30 % pacientů vyžadujících transplantaci hematopoetických kmenových buněk má geneticky HLA-identického sourozence. Pro zbylých 70 % pacientů je nutné získat vhodného dárce co možná nejvíce geneticky shodného v HLA systému. (Passweg, Baldomero et al. 2015; cit. dle Tiercy 2016) Typizace HLA je nyní zdokonalena natolik, že je možná identifikace HLA alel a možnost nalézt HLA-nejbližšího donora. S vývojem těchto metod vzrostla šance úspěšného engraftmentu (přihojení tkáně a obnovení krvetvorby) a potlačení rizika reakce štěpu vůči hostiteli (GvHD).

Typizovat HLA lze obecně dvěma možnými způsoby – klasickým sérologickým a molekulárně-genetickým. Pomocí sérologických metod lze určovat molekuly HLA I. a II. třídy na základě typizačních sér. Typizace HLA je v tomto případě umožněna tzv. lymfocytotoxickým testem (LCT) (Terasaki, McClelland et al. 1964; cit dle Juric, Ghimire et al. 2016). Do typizačních sér (s protilátkami proti většině známých HLA antigenů) jsou přidány pacientovy izolované lymfocyty a po následné inkubaci komplement. Dojde-li k vazbě antigen–protilátka, je komplementem zaktivovanou fosfolipázou A2 rozrušena buněčná membrána lymfocytů, jež jsou následně obarveny barvivem. Výsledná reakce se odečítá mikroskopicky. Během sérologické typizace však vzrůstá riziko falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Některé antigeny konkrétního lokusu mohou při sérologickém testování vytvářet tzv. křížově reagující skupiny, kdy reagují se séry anti-antigenů jiného lokusu. Naopak falešně negativní výsledky bývají generovány v případě, kdy je na povrchu buněk exprimováno nedostatečné množství HLA molekul. (Penka, Tesařová et al. 2012) Z těchto důvodů je tento typ typizace při vyšetřování donorů a recipientů buněk kostní dřeně nahrazen přesnějšími molekulárně-genetickými metodami a nebude v této rešerši dále probírán.

Ke studiu HLA systému v souvislosti s transplantacemi hematopoetických kmenových buněk se využívají metody molekulárně-genetické, základní techniku představuje polymerázová řetězová reakce (PCR) s různými modifikacemi. V současné praxi jsou využívány tři základní technologie:

PCR s využitím různých HLA specifických primerů (PCR-SSP), PCR se specifickými hybridizačními HLA sondami (PCR-SSOP) a přímé sekvenování (SBT) umožňující

přímou sekvenací HLA genů. Metoda SBT představuje nejspolehlivější a nejpřesnější možnost typizace genů HLA systému a není limitována známými místy sekvenčního polymorfismu.

Molekulárně-genetickými technikami lze typizovat HLA geny na různé úrovni. Určení přesné nukleotidové sekvence není v určitých případech nutné, proto jsou využívány dva přístupy genotypizace HLA:

Postup pomocí tzv. low-resolution (2-digits typizace) umožňuje rozlišit skupiny alel, např. A*02, jež sdílejí stejné základní polymorfnní sekvence. Tento přístup koresponduje se sérologií, ovšem s významně větší spolehlivostí.

Metoda tzv. high-resolution (4-digits typizace) umožňuje definovat specifickou DNA sekvenci vazebného místa pro antigen, při tomto rozlišení je charakterizována jedna alela či skupina alel, které sdílí stejný vazebný motiv antigen–vazebných domén HLA molekul. Výsledkem je rozlišení na úrovni minimálně čtyř prvních cifer HLA nomenklatury, např. A*02:01. (Nunes, Heslop et al. 2011)

Ve většině evropských zemí se využívá tzv. 10/10 shody mezi dárcem a příjemcem v genech pro HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 a HLA-DQB1, na základě této shody je možné v Evropě nalézt potenciálně vhodného dárce shodujícího se ve všech deseti znacích pro zhruba 45–65 % pacientů. (Tiercy 2016)

2.4.1. Typizace HLA u recipientů a donorů

Níže popsané jednotlivé kroky typizace HLA vycházejí z algoritmu pro vyšetření HLA Oddělením HLA v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze.

Primární typizace izolované DNA pacientů, potenciálně indikovaných k transplantaci hematopoetických kmenových buněk, se provádí ze dvou nezávislých primárních vzorků. Zároveň je izolována DNA od všech dostupných sourozenců, rodičů a případně i dětí pacienta. V rámci pacientovy izolované DNA se genotypizují geny HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 a HLA-DQB1 metodou SBT. U příbuzných jedinců jsou testovány lokusy HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 metodou PCR-SSP. Jsou-li výsledky rodinné studie informativní, následuje stanovení haplotypů. Nemá-li pacient žádné dostupné příbuzné, k typizaci dochází až v případě, kdy je pacientovi indikována léčba pomocí HSCT, následně typizace se provádějí v obdobným způsobem.

Je-li nalezen vhodný příbuzný dárce (shodný sourozenec) hematopoetických kmenových buněk, následuje genotypizace pacientových HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 na úrovni high-resolution a HLA-DQB1 na úrovni low-resolution metodou PCR-SSP či SBT z nezávislého primárního vzorku (je-li původní izolovaná DNA v dostatečné kvalitě, není nutné odebírat nové vzorky, analyzovány jsou původní odběry). Genotypizace vybraných sourozenců je obdobná.

Neexistuje-li dostupný vhodný příbuzný dárce, jsou výsledky pacientovy genotypizace (totožný postup popsaný výše) odeslány do registru nepříbuzných dárců hematopoetických kmenových buněk. V registru nepříbuzných donorů jsou vyhledáváni dárce co nejvíce shodní v HLA, ověřují se výsledky

z předchozích typizací dárcovských HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 (high-resolution) a HLA-DQB1 (low-resolution) metodou PCR-SSP či SBT.

V případě, kdy je pacient indikován k haploidentické transplantaci hematopoetických kmenových buněk, je postup typizace pacienta a příbuzného haploidentického dárce obdobný jako u vyšetření příbuzného donora, následně je určena míra genotypové shody mezi pacientem a dárce.

3. KIR

3.1. Genetická organizace KIR genů

KIR receptory představují skupinu receptorů imunoglobulinové povahy přítomných na povrchu lidských NK (a některých T) buněk. Obdobně jako u HLA systému je pro oblast KIR charakteristický též významný sekvenční polymorfismus.

Geny kódující KIR receptory NK buněk jsou součástí LRC regionu (Leukocyte Receptor Complex) lokalizovaného na dlouhém raménku devatenáctého chromozomu (19q13.4). Tato LRC oblast dosahuje délky 1 Mb a je bohatá na rychle se evolující geny kódující povrchové molekuly s doménami imunoglobulinového typu na extracelulární straně buňky, mezi tyto geny lze zařadit např. leukocytární receptory imunoglobulinového typu LILR (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors) či s leukocyty asociované imunoglobulinové receptory LAIR (Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptors). (Khakoo, Rajalingam et al. 2000), (Wilson, Torkar et al. 2000)

KIR geny lze obecně rozdělit do tří základních skupin:

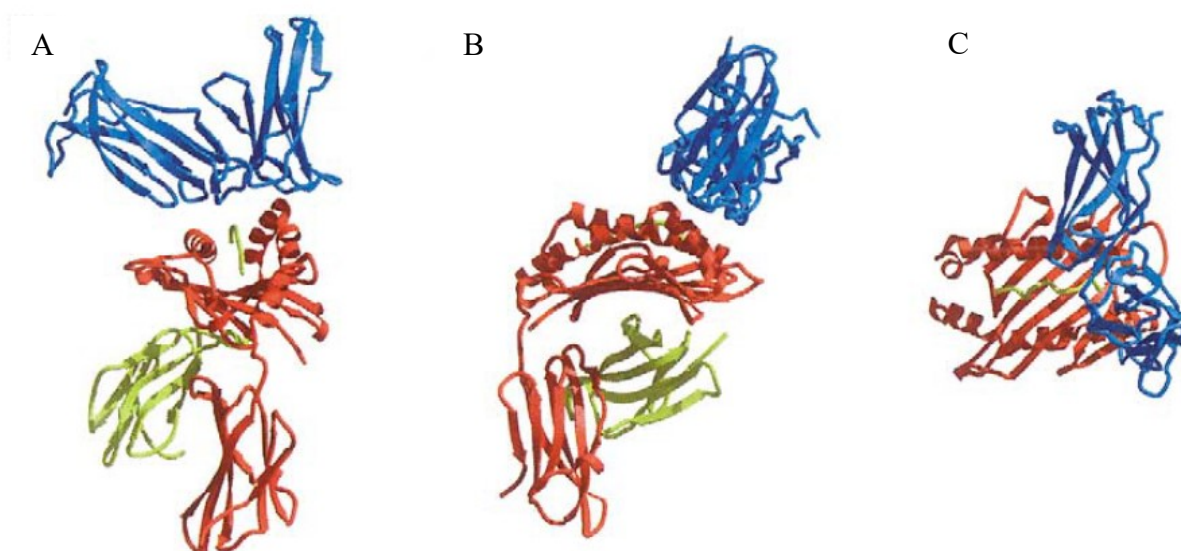
KIR3D geny kódující KIR receptory se třemi extracelulárními imunoglobulinovými doménami. Geny této skupiny obsahují devět exonů a jsou sekvenčně nejdelsí, jejich velikost se pohybuje v rozmezí 14–16 kb. Od této skupiny mohou být odvozeny zbylé KIR.

Většina KIR receptorů obsahuje dvě extracelulární imunoglobulinové domény, jde o skupinu typu I a typu II KIR2D lišících se konformací domén. (Vilches and Parham 2002)

Oblast determinující rodinu KIR receptorů zahrnuje celkem 15 genových lokusů: KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3 a dva pseudogeny KIR2DP1 a KIR3DP1. (Barten, Roland et al. 2001; cit. dle Trowsdale 2001)

3.2. Struktura KIR receptorů

Extracelulární část KIR receptorů je složena ze dvou či tří imunoglobulinových domén (KIR2D či KIR3D) zodpovědných za vazbu ligandu. Následuje transmembránová a cytoplazmatická část, na nichž je zásadně závislá funkce KIR receptorů. Cytoplazmatický řetězec může být krátký (KIR2DS) či dlouhý (KIR2DL). Dlouhý řetězec je obvykle spřažen s dvěma tyrosin-based inhibičními motivy, které indukují inhibiční signál. Krátký cytoplazmatický řetězec asociuje, díky kladně nabitým aminokyselinovým zbytkům v transmembránové oblasti, s DAP12 signalizační molekulou. Na základě této interakce je generován aktivační signál NK buňce. (Trinchieri 1989; cit. dle Vilches and Parham 2002)



Obr. č. 1: Struktura komplexu KIR2DL2/HLA-Cw3. HLA molekuly jsou znázorněny červeně se žlutými peptidy, modře jsou znázorněny KIR molekuly.

A: Pohled zepředu, B: Pohled ze strany, C: Pohled seshora. Zdroj: (Boyington and Sun 2002)

3.3. Funkce KIR receptorů

Přítomnost KIR receptorů na povrchu NK buněk je zcela zásadní pro jejich cytotoxickou aktivitu, neboli pro zahájení či inhibici této schopnosti. Na základě jejich interakcí s ligandy dochází i k sekreci cytokinů, např. IFN- γ , IL-3 či M-CSF.

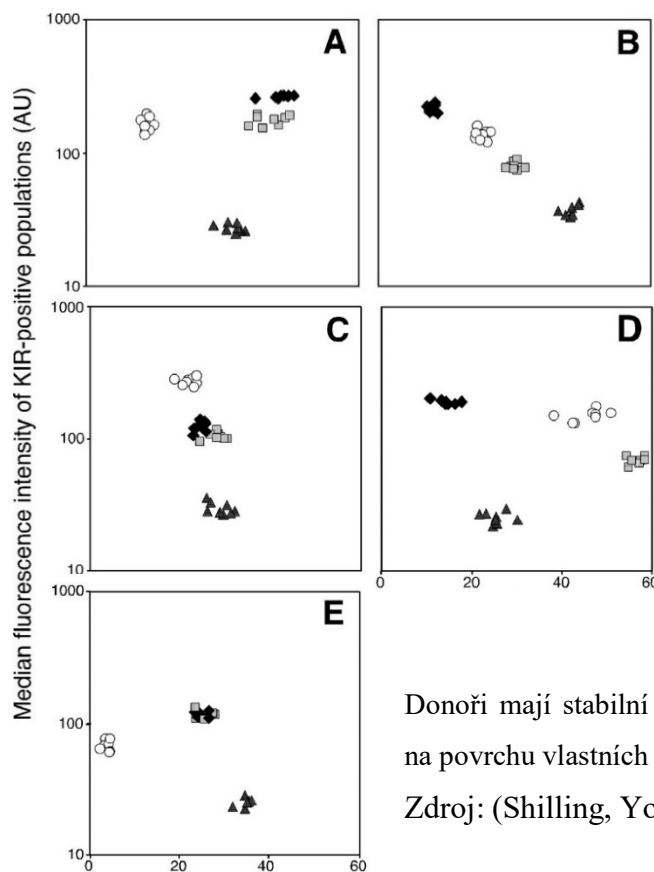
Ligandy pro KIR receptory jsou MHC molekuly I. třídy spolu s peptidovými fragmenty, rozeznávány jsou čtyři epitopy: C1 a C2 epitopy vyskytující se na HLA-C molekulách, Bw4 na HLA-A a HLA-B a A3/11 na HLA-A*03 a HLA-A*11. Každý z těchto epitopů je rozeznáván různými inhibičními KIR receptory, C2 epitop je rozeznáván navíc i aktivačním KIR receptorem kódovaným genem KIR2DS1. Na základě těchto interakcí dochází skrze KIR receptory k nastolení tolerance NK buněk vůči vlastním buňkám, které jsou fyziologicky v pořádku, či je započata cytotoxická aktivita. (Uhrberg, Valiante et al. 1997)

Obdobně jako u HLA genů (avšak výrazněji méně) je i pro KIR geny charakteristický značný sekvenční a haplotypový polymorfismus. Právě diverzita na úrovni haplotypů způsobuje rozmanitost KIR receptorů díky odlišnému počtu a typu KIR genů. Pro porovnání, organizace HLA systému na genové úrovni je relativně neměnná. Analogicky k HLA genům byla také pro KIR geny vytvořena v roce 2002 samostatná IMGT/KIR databáze, která v témže roce obsahovala celkem 89 alel. (Robinson, Halliwell et al. 2015) V tomto roce došlo též k ustanovení nomenklatury stále se zvyšujícího počtu známých alel KIR genů. Rozlišovány jsou dvě základní nomenklaturní skupiny možných haplotypů KIR genů:

B haplotypová skupina je charakterizována jedním či více následujícími geny: KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 a KIR3DS1. Haplotypy typu B obsahují navíc více genů kódujících aktivační KIR receptory oproti haplotypům skupiny A.

A haplotypová skupina je naopak charakterizována absencí všech výše zmíněných genů. (Marsh, Parham et al. 2003)

KIR geny segregují nezávisle na genech HLA systému, přesto 25 % HLA shodných sourozenců je též identických na úrovni KIR genů. V rámci studie (Shilling, Young et al. 2002) bylo na základě průtokové cytometrie také prokázáno, že skladba KIR je během života neměnná, naopak je velmi variabilní v rámci populace.



Obr. č. 2: Expres KIR v periferních NK buňkách.

A - E donoři periodicky testovaní během jednoho roku

KIR specifické protilátky:

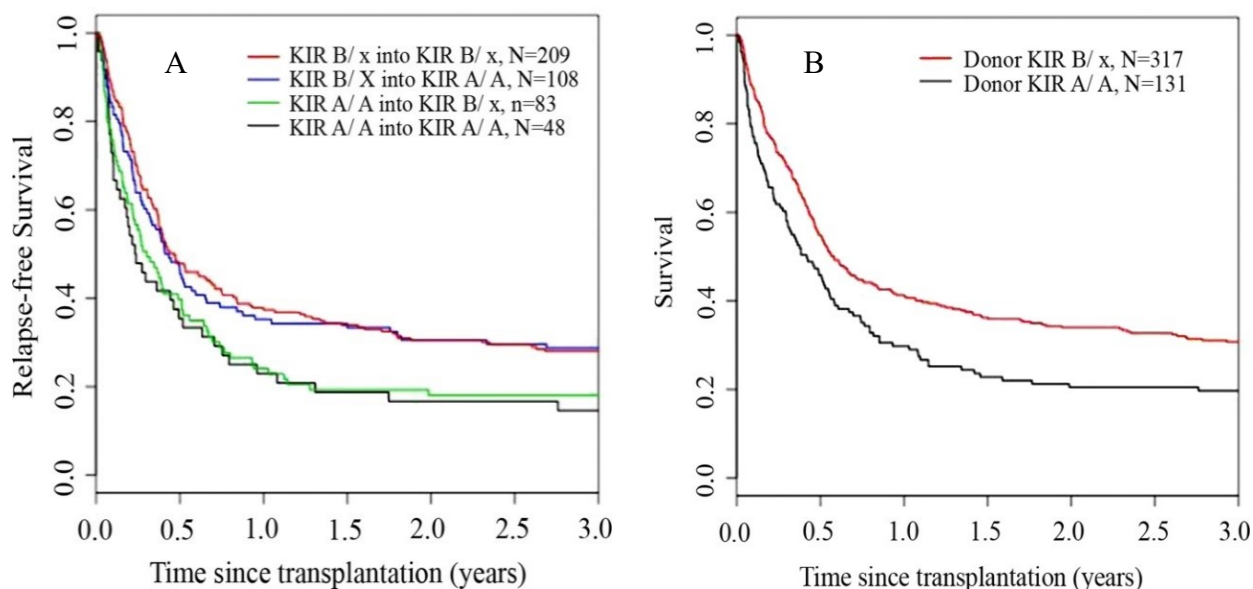
- KIR2DL1/S1
- KIR2DL2-3/S2
- ◆ KIR3DL1
- ▲ KIR3DL2

Skupina identických symbolů je charakteristická pro různé časové intervaly.

Donoři mají stabilní a charakteristickou expresi KIR receptorů na povrchu vlastních NK buněk.

Zdroj: (Shilling, Young et al. 2002)

Bylo prokázáno, že KIR haplotyp donorů při transplantaci hematopoetických kmenových buněk u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) ovlivňuje výsledný efekt léčby. Během studie, do níž bylo zahrnuto 448 párů nepříbuzných donorů a recipientů s diagnostikovanou AML byl sledován výsledný efekt dárcovského genotypu, donoři byli segregováni dle haplotypů, tedy A/A donoři (homozygoti pro A haplotyp) a B/x donoři (vlastníci alespoň jeden B haplotyp).



Obr. č. 3: Výsledný efekt léčby AML pacientů s využitím donorů A/A a B/x.

A: Bezpříznakové přežití, B: Přežití. Zdroj: (Cooley, Trachtenberg et al. 2009)

KIR genotyp donorů signifikantně ovlivňuje úspěšnost léčby AML, KIR genotyp recipientů nemá na výsledný léčebný efekt vliv. (Cooley, Trachtenberg et al. 2009)

Poslední zveřejněné číselné údaje v IMGT/KIR databázi z října 2014 presumují celkem 753 známých alel KIR genů. (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html>)

Gen	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3
Počet alel	48	30	55	52	48	16	22	15
Gen	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Počet alel	31	18	110	30	112	111	28	27

Tabulka č. 2: Počet alel KIR genů známý k poslednímu aktualizovanému datu (říjen 2014).

Zdroj: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html>

3.4. Vyšetření KIR genů

Aloreaktivita dárcovských NK buněk představuje pro pacienty s diagnostikovanou AML neopominutelný benefit v rámci jejich úspěšné léčby. (Moretta and Moretta 2004; cit. dle Pegram, Ritchie et al. 2011) Reakce transplantovaných NK buněk vůči buňkám leukemickým (GvL) je zprostředkována odlišnými KIR ligandy (HLA I. třídy) donorů a recipientů. Z tohoto důvodu je žádoucí u pacientů s AML provádět typizaci KIR na základě kalkulátoru vycházejícího z následující studie.

Do komplexní studie bylo zahrnuto 1409 pacientů (1086 s diagnostikovanou AML, 323 s diagnostikovanou ALL). Polovina vybraných párů donorů a recipientů vykazovala 10/10 shodu v HLA, na základě KIR typizace donorů byli dárči segregováni do A/A a B/x genotypových skupin. Pro B/x donory bylo dále definováno, zda se jejich B haplotypy vyskytují v centromerické či telomerické oblasti chromozomu. Analýzou bylo dosaženo výsledku, že geny B haplotypové skupiny vyskytující se v centromerickém regionu výrazněji ovlivňují efekt léčby oproti genům v telomerické oblasti. Nejenže tedy dárcovská B haplotypová skupina pozitivně ovlivňuje výsledný efekt léčby oproti A typu, nýbrž i Cen-B/B haplotyp oproti Cen-A/A a Cen-A/B snižuje riziko relapsu onemocnění. Na základě této studie jsou donoři dále děleni do skupin:

- „Best“ haplotyp Cen-B/B, Tel-x/x, definován absencí KIR2DL3 a prezencí 2DS2 a/či 2DL2,
- „Better“ haplotyp Cen-A/x, Tel-B/x definován prezencí 2DL3, 2DS2 a/či 2DL2, 3DS1 a/či 2DS1 či 2DL3, absencí 2DS2 a/či 2DL2 a prezencí 3DS a/či 2DS1 prezencí a
- „Neutral“ haplotyp KIR-B definován prezencí 2DL3, absencí 2DS2 a/či 2DL2 a prezencí 3DL1 a 2DS4

Tento efekt však nebyl patrný u léčby ALL, z tohoto důvodu se typizace KIR genů provádí u donorů hematopoetických kmenových buněk, které jsou cíleny pro pacienty s AML. (Cooley, Weisdorf et al. 2010) Potlačení relapsu AML je významnější u transplantací, kterých se účastní donoři označení „better“ či „best“ oproti donorům „neutral“. (Cooley, Weisdorf et al. 2014)

Výše zmíněná studie je zásadní pro výběr vhodného dárce HSC. Výběr vhodných donorů se provádí v IMGT/KIR databázi skrze B-content kalkulátor. Online kalkulátor umožňuje srovnání pěti vybraných donorů vůči konkrétnímu pacientovi, jejich genotypy jsou porovnávány s genotypy predikovanými (zahrnuto je přes 180 genotypů). Na základě absence či presence vybraných genů jsou donoři selektováni na základě rozlišení „best“, „better“ a „neutral“ s ohledem na efekt léčby AML a potlačení relapsu onemocnění. (Zdroj: https://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/donor_b_content.cgi)

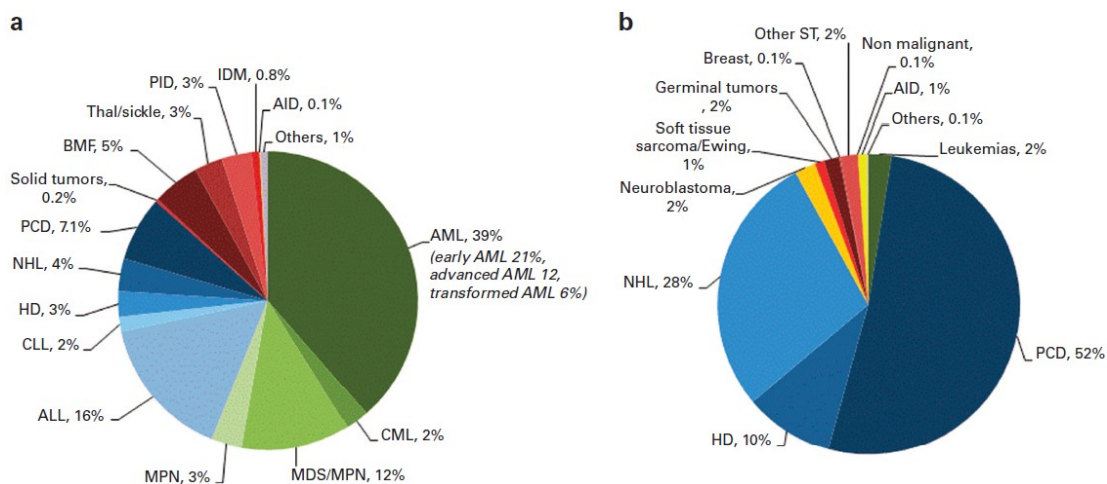
3.4.1. Typizace KIR u recipientů a donorů

Typizace KIR se provádí u pacientů s diagnózou AML za účelem potlačení relapsu onemocnění a zvýšení pravděpodobnosti úspěšné léčby. Následný popis typizace vychází z tzv. algoritmu vyšetření KIR při vyhledávání dárce HSC vydaným Ústavem hematologie a krevní transfuze v Praze.

U pacientů indikovaných k HSCT od nepříbuzného či haploidentického dárce se typizace donorů i recipientů provádí metodou PCR-SSP. Vybraní dárce jsou podrobeni ověření pomocí IMGT/KIR kalkulátoru.

4. Indikace HSCT

V roce 2015 stoupla indikace léčby pomocí hematopoetických kmenových buněk oproti roku 2014 o 3,3 %, hlavními důvody pro tento typ léčby byly malignity myeloidní (25 % ze všech prodělaných HSCTs; např. akutní a chronická myeloidní leukémie) a lymfoidní povahy (65 % z celkového čísla; např. akutní a chronická lymfoblastická leukémie), onemocnění způsobená solidními tumory a též onemocnění nemaligní povahy. (Passweg, Baldomero et al. 2017)



Graf č. 2: Hlavní indikace HSCT v roce 2015 v evropských zemích.

a) allogenní zdroje HSC pro daná onemocnění b) autologní zdroje HSC pro daná onemocnění. Zdroj: (Passweg, Baldomero et al. 2017)

V roce 2015 byla též překročena hranice rekordní hodnoty 42 171 provedených transplantací hematopoetických kmenových buněk. (Passweg, Baldomero et al. 2017) V tabulce č. 3 jsou zaznamenány nejčastější příčiny léčby pomocí HSCT včetně transplantací buněk kostní dřeně a zdroje hematopoetických kmenových buněk. K daným skupinám onemocnění jsou v případě myeloidních a lymfoidních malignit přiřazeny i číselné údaje významných onemocnění (AML, CML, ALL a CLL).

Onemocnění		Allogenní	Autologní	Allogenní	Autologní	Celkem
Myeloidní malignity	AML	6189	413	8994	419	9413
	CML	398	3			
Lymfoidní malignity	ALL	1531	66	4890	19450	24340
	CLL	255	36			
Solidní tumory				38	1478	1516
Nemaligní onemocnění				1985	223	2208
Počet pacientů podstupujících poprvé HSCT				16030	21596	37626
Opakované HSCT				1272	3273	4545
Celkový počet HSCT				17302	24869	42171

Tabulka č. 3: HSCT v Evropě v roce 2015 dle indikací a zdroje HSC. (Passweg, Baldomero et al. 2017)

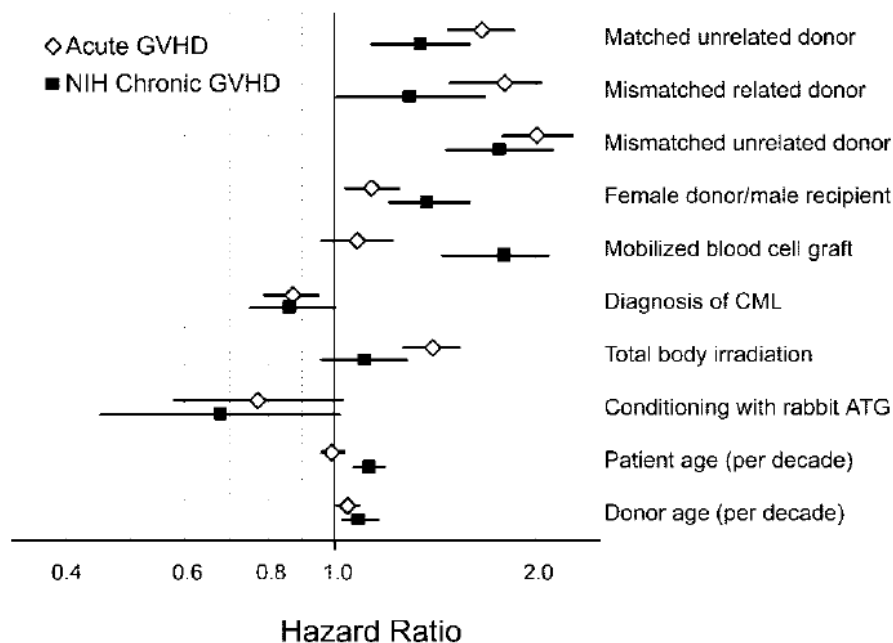
5. Komplikace HSCT – GvHD

Hlavní a zároveň nejzávažnější komplikací vznikající při allogenních transplantacích buněk kostní dřeně je reakce štěpu vůči hostiteli (GvHD, Graft-versus-host disease). Tato reakce je způsobena dárcovskými T buňkami, rozeznávajícími pacientovy antigeny, jež jsou prezentovány na buněčném povrchu skrze HLA I. třídy. Pravděpodobnost výskytu reakce štěpu vůči hostiteli bývá vyšší v případě, kdy jsou donor a recipient neshodní v HLA znacích. Reakce štěpu vůči hostiteli může dosahovat akutního či chronického charakteru s různými klinickými projevy, hlavními postiženými orgány jsou kůže, gastrointestinální trakt a játra. Obecnými rizikovými faktory pro genezi GvHD jsou kromě shody/neshody HLA pacientův věk, stadium onemocnění a shoda mezi pohlavím dárce a příjemce.

Během komplexní studie provedené ve Fred Hutchinson Cancer Research Center v Seattlu byl sledován rozvoj GvHD u celkem 2941 pacientů podstupujících transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Rizikové faktory pro propuknutí akutní či chronické formy GvHD byly obdobné, přesto existují určité rozdíly:

Akutní forma GvHD se obvykle projevuje během prvních sto dní po aplikaci hematopoetických kmenových buněk allogenního původu, medián výskytu se rovnal hodnotě 20 dní. Neshoda v HLA u nepříbuzného dárce představovala vyšší riziko vzniku akutní reakce štěpu vůči hostiteli než formy chronické.

Chronická forma GvHD nastává nejčastěji po sto dnech od prodělané transplantace hematopoetických kmenových buněk. Mediánem vzniku chronické formy GvHD bylo u dané studie 162 dní. Oproti akutní formě reakce štěpu vůči hostiteli byly hlavními rizikovými faktory pacientův věk a ženský donor darující hematopoetické buňky mužskému recipientovi. (Flowers, Inamoto et al. 2011)



Obr. č. 4: Rizikové faktory pro vznik akutní a chronické formy GvHD. (Flowers, Inamoto et al. 2011)

Během studie bylo tedy prokázáno, že vyšší riziko vzniku akutní formy GvHD oproti vzniku chronické formy představují tyto faktory: nepříbuzný donor shodný a neshodný v HLA, příbuzný donor neshodný v HLA a celotělové ozáření. Naopak vyšší riziko nástupu chronické formy představuje ženský dárců buněk podaných mužskému příjemci a pacientův věk. Věk donora nehraje obvykle roli, neboť věk dárců se obvykle pohybuje v určitém rozmezí (18–40 let). Obdobně byl patrný vliv nesouladu dárců a příjemců v HLA-B. Neshoda v těchto znacích se častěji vyskytovala u akutní formy GvHD oproti neshodám v HLA-A či HLA-DRB1. (Huo, Xu et al. 2012)

V rámci studie provedené v kanadském institutu Alberta Innovates bylo sledováno 281 párů donorů (příbuzných či nepříbuzných) a recipientů, poprvé podstupujících allogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk, která byla provedena nejčastěji za účelem léčby akutní myeloidní leukémie. Studie se soustředila zejména na KIR genotypy dárců a příjemců a jejich vliv na výskyt GvHD. Genetická neshoda v KIR znacích mezi jednotlivými sledovanými páry měla za následek signifikantně vyšší výskyt chronické reakce, neshoda mezi KIR však nekorelovala s výskytem akutní formy či relapsu onemocnění. (Faridi, Kemp et al. 2016)

Chronická reakce štěpu vůči hostiteli je hlavním determinantem kvality života po prodělané allogenní transplantaci a je zároveň nejčastější příčinou úmrtí následkem tohoto typu léčby.

6. Vývoj HSCT

Závěrem této práce je důležité zmínit stručný vývoj klinického využívání transplantace hematopoetických kmenových buněk jakožto léčby onemocnění maligní či nemaligní povahy.

Transplantace krvetvorných buněk se začaly pozvolna provádět již po druhé světové válce. Hlavním důvodem nebyla tehdy paradoxně léčba hematologických malignit, nýbrž snaha léčit selhání krvetvorby, ke kterým docházelo vlivem vysokých dávek ionizačního záření u výzkumných pracovníků či civilního obyvatelstva. (Copelan 2006) Léky například imunosupresivní či antibakteriální povahy však nebyly k dispozici a HLA systém stále čekal na objevení. Mortalita pacientů byla tak příliš vysoká.

Studie z poloviny 20. století prováděné na zvířecích modelech dokázaly, že syngenní či autologní transplantace hematopoetických kmenových buněk odvracejí přímé riziko smrti po ozáření. (Mannick, Lochte et al. 1960), (Egon Lorenz, Charles Congdon et al. 1952) Tyto studie taktéž prokázaly, že autologní transplantace dosahují lepších výsledků než transplantace allogenní.

První klinicky využitá transplantace hematopoetických kmenových buněk byly provedeny u pacientů s akutní leukemií. Koncem padesátých let minulého století jim byly po celkovém ozáření podány hematopoetické kmenové buňky původem z kostní dřeně jejich identických dvojčat. (E. Donnall Thomas, Harry L. Lochte et al. 1957)

Rozvoj úspěšné aplikace allogenních transplantací umožnil objev HLA systému v šedesátých letech. V roce 1979 byla úspěšně provedena první transplantace buněk kostní dřeně mezi pacientem a nepříbuzným dárce. (John A. Hansen, Reginald A. Clift et al. 1980)

Se stále častěji indikovanou léčbou hematopoetickými kmenovými buňkami bylo žádoucí zakládání registrů dárců kostní dřeně. První vznikl ve Velké Británii v roce 1974 s cílem najít dárce kostní dřeně pro tehdy tříletého Anthonyho Nolana, po němž nese tento nejstarší registr jméno.

V roce 2014 byla poprvé překročena hranice 40 000 provedených transplantací hematopoetických kmenových buněk. (Passweg, Baldomero et al. 2016) Tato vysoká číselná hodnota představuje značný pokrok, jehož bylo při intenzivním studiu dosaženo. Díky objevení a popsání hlavních rizikových faktorů tohoto typu léčby existují možnosti, jak rizikům úspěšně předcházet.

Dle EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) bylo v roce 2015 v rámci 48 evropských zemí dosaženo rekordní hodnoty 42 171 provedených transplantací hematopoetických kmenových buněk u celkem 37 626 pacientů, z čehož byly z 43 % allogenní a 57 % autologní zdroje hematopoetických kmenových buněk. (Passweg, Baldomero et al. 2017) Pro porovnání, v roce 2014 bylo provedeno v 47 evropských zemí celkem 40 829 HSCT u 36 469 pacientů, z toho obdobně 43 % transplantací allogenních a 57 % autologních. (Passweg, Baldomero et al. 2016)

Budoucí vývoj léčby pomocí HSCT bude jistě umožněn v klinických laboratořích díky tzv. SMRT (Single Molecule Real-Time Technology) metodám umožňujícím efektivnější typizaci. (Mayor, Robinson et al. 2015)

7. Závěr

Typizace HLA a KIR genů představuje soubor molekulárně-genetických vyšetření, díky nimž je v současné době výskyt rizik, jež jsou spojena s transplantacemi hematopoetických kmenových buněk, posunut k výrazně nižším hodnotám. Tato práce shrnuje aktuální postupy typizace HLA a KIR genů v klinických laboratořích při molekulárně-genetickém vyšetření donorů a recipientů hematopoetických kmenových buněk a další faktory ovlivňující úspěšnost této léčby s ohledem na HLA a KIR geny.

Studované HLA a KIR geny podléhají vysoké míře polymorfismu v rámci lidské populace. Typizací těchto genových oblastí je možné úspěšně předcházet negativním následkům léčby prostřednictvím transplantací buněk kostní dřeně. Za účelem typizace HLA a KIR genů jsou využívány různé metodické postupy a odlišná rozlišení genotypizace, informativnost výsledků však nesmí být ovlivněna danou klinickou laboratoří.

Studium nových alel HLA a KIR genů je pro tento obor zásadní a zároveň i limitující. Řada metod (např. PCR-SSOP či PCR-SSP) je závislých na již známých genetických variantách těchto studovaných genů. Každým rokem však přibývají v IMGT databázi v jednotkách stovek nově známé alely. Aktuální cíle výzkumu této problematiky směřují k dalšímu studiu polymorfních oblastí, pokrok představují tzv. next-generation sequencing metody, díky nimž by mohlo být sekvenování těchto vysoce variabilních genů zpřesněno, zefektivněno, zjednodušeno a zrychleno.

Dosavadní intenzivní výzkum této problematiky zařadil transplantace hematopoetických kmenových buněk mezi rutinní léčebné zákroky. Zároveň je však tento typ léčby stále velmi rizikový a vyžaduje další intenzivní studium.

8. Seznam literatury

* sekundární zdroj

Barten R., M. Torkar, A. Haude, J. Trowsdale, M. J. Wilson (2001). "Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors." *Trends in Immunology* **22**(1): 52-57

Boyington, J. C. and P. D. Sun (2002). "A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors." *Molecular Immunology* **38**(14): 1007-1021.

Brodsky FM. Antigen presentation & the major histocompatibility complex. In: Stites, DP, Terr AI, Parslow TG, editors. Medical Immunology. Stanford: Appleton & Lange; 1997. pp. 83–94.

Consortium, T. M. S. (1999). "Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex." *Nature* **401**: 921-923.

Cooley, S., E. Trachtenberg, T. L. Bergemann, K. Saeteurn, J. Klein, C. T. Le, S. G. E. Marsh, L. A. Guethlein, P. Parham, J. S. Miller and D. J. Weisdorf (2009). "Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia." *Blood* **113**(3): 726-732.

Cooley, S., D. J. Weisdorf, L. A. Guethlein, J. P. Klein, T. Wang, C. T. Le, S. G. Marsh, D. Geraghty, S. Spellman, M. D. Haagenson, M. Ladner, E. Trachtenberg, P. Parham and J. S. Miller (2010). "Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia." *Blood* **116**(14): 2411-2419.

Cooley, S., D. J. Weisdorf, L. A. Guethlein, J. P. Klein, T. Wang, S. G. Marsh, S. Spellman, M. D. Haagenson, K. Saeteurn, M. Ladner, E. Trachtenberg, P. Parham and J. S. Miller (2014). "Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia." *J Immunol* **192**(10): 4592-4600.

* Copelan , E. A. (2006). "Hematopoietic Stem-Cell Transplantation." *New England Journal of Medicine* **354**(17): 1813-1826.

* Edinur, H. A., S. M. Manaf and N. F. Che Mat (2016). "Genetic barriers in transplantation medicine." *World J Transplant* **6**(3): 532-541.

E. Donnall Thomas, M. D., J. Harry L. Lochte, M.D.‡, , P. D. Wan Ching Lu and M. D. Joseph W. Ferrebee (1957). "Intravenous infusion of bone marrow in patints receiving radiation and chemotherapy." *The New England Journal of Medicine* **257**(11).

Egon Lorenz, P. D., M. D. Charles Congdon and M. S. Delta Uphoff (1952). "Modification of irradiation injury in mice and Guinea pigs by bone marrow injections." *Radiology* **58**(6).

Faridi, R. M., T. J. Kemp, P. Dharmani-Khan, V. Lewis, G. Tripathi, R. Rajalingam, A. Daly, N. Berka, J. Storek and F. Masood Khan (2016). "Donor-Recipient Matching for KIR Genotypes Reduces Chronic GVHD and Missing Inhibitory KIR Ligands Protect against Relapse after Myeloablative, HLA Matched Hematopoietic Cell Transplantation." *PLoS One* **11**(6).

Flowers, M. E., Y. Inamoto, P. A. Carpenter, S. J. Lee, H. P. Kiem, E. W. Petersdorf, S. E. Pereira, R. A. Nash, M. Mielcarek, M. L. Fero, E. H. Warren, J. E. Sanders, R. F. Storb, F. R. Appelbaum, B. E. Storer and P. J. Martin (2011). "Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria." *Blood* **117**(11): 3214-3219.

Goodfellow PN, Jones EA, Van Heyningen V, Solomon E, Bobrow M, Miggiano V, Bodmer WF (1975). "The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region." *Nature*. **254**:267–269.

* Horton, R., L. Wilming, V. Rand, R. C. Lovering, E. A. Bruford, V. K. Khodiyar, M. J. Lush, S. Povey, C. C. Talbot, Jr., M. W. Wright, H. M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler and S. Beck (2004). "Gene map of the extended human MHC." *Nat Rev Genet* **5**(12): 889-899.

Huo, M. R., L. P. Xu, D. Li, D. H. Liu, K. Y. Liu, H. Chen, W. Han, Y. H. Chen, Y. Wang, J. Z. Wang, X. H. Zhang, X. Y. Zhao and X. J. Huang (2012). "The effect of HLA disparity on clinical outcome after HLA-haploidentical blood and marrow transplantation." *Clinical Transplantation* **26**(2): 284-291.

John A. Hansen, M. D., F. I. M. L. S. Reginald A. Clift, M. D. E. Donnall Thomas, M. D. C. Dean Buckner, M. D. Rainer Storb and M. D. Eloise R. Giblett (1980). "Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia." *The New England Journal of Medicine* **303**(10).

* Juric, M. K., S. Ghimire, J. Ogonek, E. M. Weissinger, E. Holler, J. J. van Rood, M. Oudshoorn, A. Dickinson and H. T. Greinix (2016). "Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments." *Front Immunol* **7**(470).

Khakoo, R. Rajalingam, B. P. S. Weidenbach, L. Flodin, D. G. Muir, F. v. Canavez, S. L. Cooper, N. M. Valiante, L. L. Lanier and P. Parham (2000). "Rapid Evolution of NK Cell Receptor Systems Demonstrated by Comparison of Chimpanzees and Humans." *Immunity* **12**: 687-698.

Mannick, J. A., H. L. Lochte, C. A. Ashley, E. D. Thomas and J. W. Ferrebee (1960). "Autografts of Bone Marrow in Dogs After Lethal Total-Body Radiation." *Blood* **15**: 255 - 266.

Marsh, S. G. E., P. Parham, B. Dupont, D. E. Geraghty, J. Trowsdale, D. Middleton, C. Vilches, M. Carrington, C. Witt, L. A. Guethlein, H. Shilling, C. A. Garcia, K. C. Hsu and H. Wain (2003). "Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) Nomenclature Report, 2002." *Human Immunology* **64**(6): 648-654.

Marzluff, W. F., P. Gongidi, K. R. Woods, J. Jin and L. J. Maltais (2002). "The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes." *Genomics* **80**(5): 487-498.

Mayor, N. P., J. Robinson, A. J. McWhinnie, S. Ranade, K. Eng, W. Midwinter, W. P. Bultitude, C. S. Chin, B. Bowman, P. Marks, H. Braund, J. A. Madrigal, K. Latham and S. G. Marsh (2015). "HLA Typing for the Next Generation." *PLoS One* **10**(5): 1-12.

Moretta, L. and A. Moretta (2004). "Killer immunoglobulin-like receptors." *Curr Opin Immunol* **16**(5): 626-633.

Mungall, A. J., S. A. Palmer, S. K. Sims, C. A. Edwards, J. L. Ashurst, L. Wilming, M. C. Jones and R. Horton (2003). "The DNA sequence and analysis of human chromosome 6." *Nature* **425**: 805 - 811.

Nunes, E., H. Heslop, M. Fernandez-Vina, C. Taves, D. R. Wagenknecht, A. B. Eisenbrey, G. Fischer, K. Poulton, K. Wacker, C. K. Hurley, H. Noreen and N. Sacchi (2011). "Definitions of histocompatibility typing terms." *Blood* **118**(23): 180 - 183.

Passweg, J. R., H. Baldomero, P. Bader, C. Bonini, S. Cesaro, P. Dreger, R. F. Duarte, C. Dufour, J. H. Falkenburg, D. Farge-Bancel, A. Gennery, N. Kroger, F. Lanza, A. Nagler, A. Sureda, M. Mohty, B. European Society for and T. Marrow (2015). "Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants." *Bone Marrow Transplant* **50**(4): 476-482.

Passweg, J. R., H. Baldomero, P. Bader, C. Bonini, S. Cesaro, P. Dreger, R. F. Duarte, C. Dufour, J. Kuball, D. Farge-Bancel, A. Gennery, N. Kröger, F. Lanza, A. Nagler, A. Sureda and M. Mohty (2016). "Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually." *Bone Marrow Transplantation* **51**(6): 786-792.

Passweg, J. R., H. Baldomero, P. Bader, C. Bonini, R. F. Duarte, C. Dufour, A. Gennery, N. Kroger, J. Kuball, F. Lanza, S. Montoto, A. Nagler, J. A. Snowden, J. Styczynski and M. Mohty (2017). "Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report." *Bone Marrow Transplant*: 1 - 7.

PENKA, Miroslav a Eva SEDLÁČKOVÁ. Hematologie a transfuzní lékařství. II, Transfuzní lékařství. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.

* Pegram, Ritchie, Smyth, Wiernik, Prince, Darcy and Kershaw (2011). "Alloreactive natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation." *Leukemia Research* **35**(1): 14-21.

Robinson, J., J. A. Halliwell, J. D. Hayhurst, P. Flicek, P. Parham and S. G. Marsh (2015). "The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases." *Nucleic Acids Res* **43**(Database issue): 423 - 431.

Robinson, J., A. R. Soormally, J. D. Hayhurst and S. G. Marsh (2016). "The IPD-IMGT/HLA Database - New developments in reporting HLA variation." *Human Immunology* **77**(3): 233-237.

* Sasazuki, T., H. Inoko, S. Morishima and Y. Morishima (2016). "Gene Map of the HLA Region, Graves' Disease and Hashimoto Thyroiditis, and Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Adv Immunol* **129**: 175-249.

Shilling, H. G., N. Young, L. A. Guethlein, N. W. Cheng, C. M. Gardiner, D. Tyan and P. Parham (2002). "Genetic Control of Human NK Cell Repertoire." *The Journal of Immunology* **169**(1): 239-247.

Terasaki PI, McClelland JD. (1964) "Microdroplet assay of human serum cytotoxins." *Nature* **204**:998–1000.

* Tiercy, J. M. (2016). "How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells?" *Haematologica* **101**(6): 680-687.

Trinchieri G. (1989). "Biology of natural killer cells." *Adv. Immunol.* **47**:187–376

* Trowsdale, J. (2001). "Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptors Genes." *Immunity* **15**(3): 363-374.

Uhrberg, M., N. M. Valiante, B. P. Shum, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, B. Corliss, D. Tyan, L. L. Lanier and P. Parham (1997). "Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes." *Immunity* **7**(6): 753-763.

* Vilches, C. and P. Parham (2002). "KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity." *Annu Rev Immunol* **20**: 217-251.

Wilson, M. J., M. Torkar, A. Haude, S. Milne, T. Jones, D. Sheer, S. Beck and J. Trowsdale (2000). "Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4778-4783.

Internetové zdroje:

web 1: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html> (citace 8. 5. 2017)

web 2: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> (citace 8. 5. 2017)

web 3: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html> (citace 9. 5. 2017)

web 4: https://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/donor_b_content.cgi (citace 1. 5. 2017)