

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Liudmila Ilina

Význam hlavního histokompatibilního systému pro transplantaci orgánů
Significance of the major histocompatibility complex for organ transplantation

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Praha, 2021

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 dne

Podpis

Liudmila Ilina

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Antonij Slavčevovi, CSc. za odborné vedení a věnovaný čas, cenné rady a vstřícný přístup při psaní této závěrečné práce. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině a kamarádům za významnou podporu.

ABSTRAKT

Hlavní histokompatibilní systém je genový region lidského genomu, který se nachází na chromozomu 6 a kóduje polymorfní povrchové glykoproteiny, jejichž primární funkcí je prezentace vlastních a cizích proteinů T lymfocytům. Pokud T lymfocyt rozpoznává komplex MHC-peptid jako cizí, dochází k aktivaci efektorových složek a adaptivní imunity. Proto neshody v HLA antigenech mohou způsobit silnou imunitní odpověď vůči transplantovanému orgánu. HLA laboratoře hrají roli v transplantačním programu orgánů tím, že určují neshody v HLA systému mezi pacienty a jejich potenciálními dárci, a na základě získaných údajů přispívají k hodnocení rizika rejekce a eventuálních imunologických komplikací po transplantaci.

Cílem této práce je popsat vliv hlavního histokompatibilního systému na výskyt buněčné a protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci solidních orgánů a charakterizovat vztah mezi mírou neshod v HLA antigenech a výsledky přežití štěpů.

Klíčová slova

HLA, transplantace orgánů, rejekce

ABSTRACT

The major histocompatibility system is a region in the human genome located on chromosome 6. HLA genes encode polymorphic cell-surface glycoproteins which are primarily responsible for presentation of self and non-self antigens to T cells. When the T lymphocyte recognizes the MHC-peptide complex as foreign, it activates effector components of the innate and adaptive immune system. Therefore, mismatched HLA antigens can lead to a strong immune response against the donor's tissue. HLA laboratories support transplant programs by evaluation the HLA matching between patients and their potential donors and, based on these data, assist in the evaluation of the risk of rejection and eventual immunological complications after transplantation.

The aim of this thesis is to describe the significance of the major histocompatibility complex for the occurrence of cellular and antibody-mediated rejection after solid organ transplantation and discuss the relationship between the degree of HLA matching and graft survival outcomes.

Key words

HLA, organ transplantation, rejection

OBSAH

1. Úvod.....	3
2. Hlavní histokompatibilní komplex	3
2.1. HLA molekuly I. třídy.....	4
2.2 HLA molekuly II. třídy	6
3. HLA polymorfismus	6
4. Dědičnost.....	7
5. Nomenklatura.....	7
6. Orgánové transplantace	9
7. Imunitní odpověď proti transplantátu.....	9
7.1. Rozpoznávání transplantačních antigenů.....	9
7.1.1. Přímá cesta rozpoznávání	10
7.1.2. Nepřímá cesta rozpoznávání.....	11
7.2. Efektorová fáze	12
7.2.1. T buňkami zprostředkovaná (celulární) rejekce.....	12
7.2.2. Protilátkami zprostředkovaná (humorální) rejekce	13
7.2.2.1. Hyperakutní rejekce	14
7.2.3. Chronická rejekce	14
8. HLA typizace.....	15
8.1.1 Sérologická typizace.....	15
8.1.2 Molekulárně genetické metody typizace.....	16
8.1.2.1 PCR – SSP.....	16
8.1.2.1.2 PCR – SSOP	17
8.2. Crossmatch test.....	17
9. Vliv shody HLA na výsledky transplantace orgánů	18
10. Sensibilizace	19

11. Další účinky neshody HLA.....	20
Seznam zkratek	21
Seznam použité literatury	23

1. Úvod

Jedním z nejdůležitějších faktorů, který má vliv na výsledky transplantace, jsou geny hlavního histokompatibilního komplexu (u člověka HLA). Zvyšující se klinický zájem o transplantaci orgánů a kostní dřeň poskytl podnět pro rychlý a významný pokrok v metodikách pro HLA typizaci a detekci protilátek proti tkáňovým antigenům, což umožnilo lepší pochopení rozsáhlého polymorfismu HLA genů, a na základě těchto znalostí vyvinout nové strategie k optimalizaci hledání vhodných dárců.

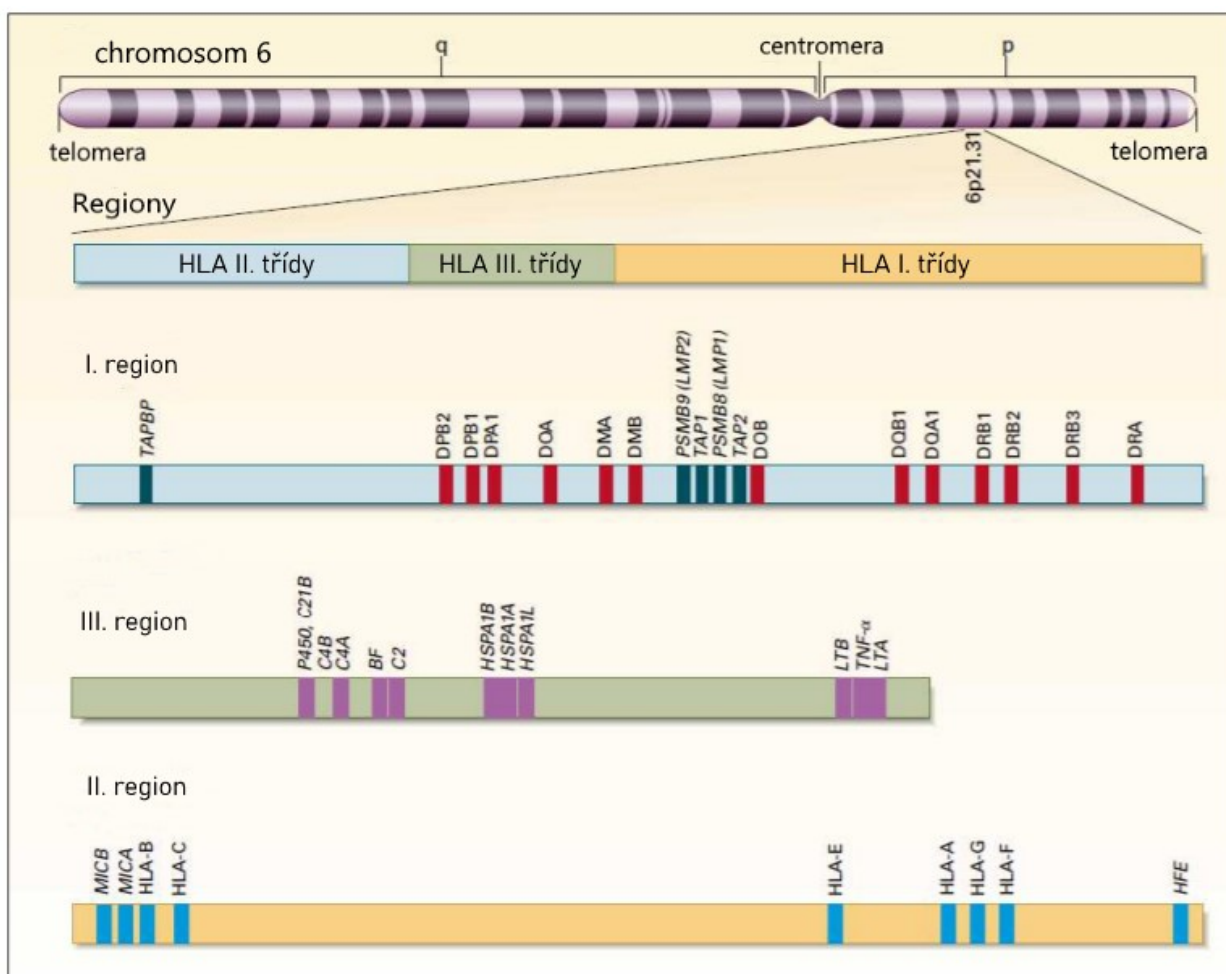
Tato práce se zabývá přehledem současných znalostí o struktuře, genetice a funkci „klasických“ HLA antigenů I. a II. třídy, jejich významu pro transplantaci orgánů a taky o technikách aplikovaných v současné době v HLA laboratořích.

2. Hlavní histokompatibilní komplex

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC – Major Histocompatibility Complex) u člověka se označuje zkratkou HLA (Human Leukocyte Antigen) a představuje rozsáhlý systém více než 220 genů lokalizovaných na krátkém raménku 6. chromozomu v pozici 21.31 (6p21.31) (The MHC sequencing consortium 1999). Na základě tkáňové distribuce, struktury a funkce geny HLA komplexu a jejich proteinové produkty jsou rozděleny do třech oblastí: HLA I., HLA II. a HLA III. třídy (viz. Obrázek 1).

Regiony I. a II. kódují povrchové glykoproteiny, které hrají klíčovou roli v regulaci imunitní odpovědi prostřednictvím schopnosti předkládat intra- a extracelulární peptidové fragmenty buňkám imunitního systému. Oblast HLA I. třídy zahrnuje klasické geny (HLA-A, -B a -C), neklasické (HLA-E, -F, -G) a geny kódující proteiny strukturou podobných HLA molekulám I. třídy (MHC Class I Chain-related = MICA, MICB). Stejně geny II. třídy lze rozdělit na klasické (HLA-DP, -DQ, a -DR) a neklasické (HLA-DM a -DO) (Horton et al. 2004).

Region III. leží mezi oblastmi I. a II. tříd a obsahuje geny, jejichž produkty se přímo podílejí na imunitě, a nefungují jako hlavní histokompatibilní antigeny (Choo 1991). Geny v tomto regionu kódují různé proteiny včetně některých složek komplementu, cytokiny, podjednotky proteazomů a peptidových pump nebo stresové proteiny (heat-shock proteins). (Milner and Campbell 2001)



Obrázek 1. Schéma umístění a organizace HLA komplexu na 6. chromozomu.

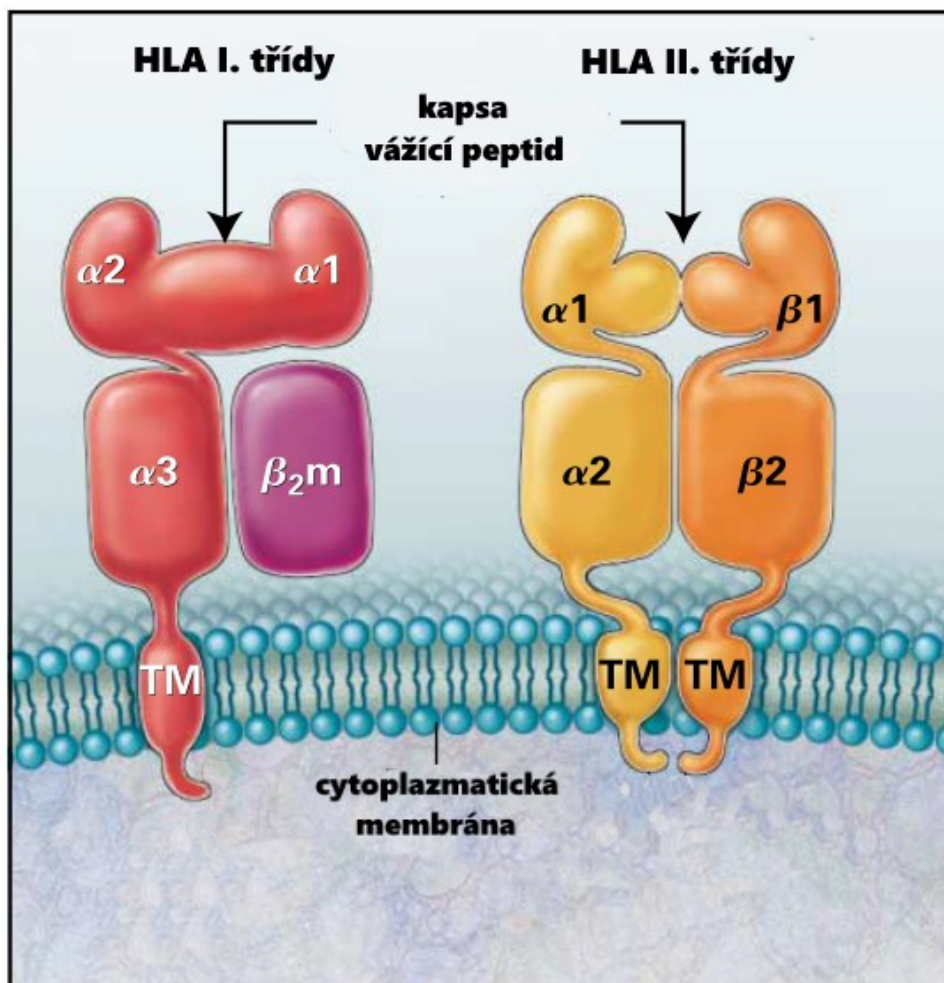
(Klein and Sato 2000)

2.1. HLA molekuly I. třídy

Klasické HLA molekuly I. třídy jsou exprimovány na povrchu téměř všech jaderných buněk organismu. Skládají se ze dvou řetězců: membránově vázaného α řetězce a nekovalentně asociovaného s ním β 2-mikroglobulinu (viz Obrázek 2). Alfa řetězec obsahuje tři extracelulární domény, transmembránovou a cytoplazmatickou část. Lehký řetězec je β 2-mikroglobulin (β 2m), který je kódován genem lokalizovaným mimo HLA komplex na chromozomu 15 (Klein and Sato 2000)(Natarajan et al. 1999). Domény α_1 a α_2 jsou variabilní a tvoří vazebné místo s uzavřenými konci pro peptidy o maximální délce 8-10 aminokyselin. Doména α_3 a molekula

β_2m se strukturně podobají imunoglobulinovým doménám a jsou významné pro rozpoznání MHC molekul koreceptory cytotoxických T-lymfocytů (Liu and Gao 2011).

HLA molekuly I. třídy slouží k prezentaci peptidových fragmentů bílkovin intracelulárního původu pocházejících z vlastních poškozených proteinů anebo virových antigenů. Proteiny určené k degradaci jsou zpracovány proteazomem v cytoplazmě. Vytvořené peptidy jsou následně přepraveny přes transportní komplex TAP do lumen endoplazmatického retikula, kde dochází ke sbalení a asociaci samotných polypeptidových řetězců MHC I. třídy a následnému navázání vhodného peptidu do žlábků molekuly. Celkový komplex MHC molekuly I. třídy s navázaným peptidem putuje z ER přes Golgiho aparát na povrch buňky, kde pak může být rozpoznán cytotoxickými T-lymfocyty pomocí TCR receptorů (Vyas, Van Der Veen, and Ploegh 2008) anebo taky inhibičními receptory NK buněk (KIR) (Trowsdale 2001).



Obrázek 2. Struktura molekul HLA třídy I a II. (Klein and Sato 2000)

2.2 HLA molekuly II. třídy

Molekuly HLA II. třídy se vyskytují primárně na antigen prezentující buňkách (dendritické buňky, B lymfocyty, makrofágy). V zánětlivém prostředí a přítomnosti IFN- γ však mohou být exprimovány i u jiných typů buněk, jako jsou například buňky cévního endotelu, aktivované T lymfocyty (Klein and Sato 2000),(W. M. Howell, Carter, and Clark 2010). Jsou to heterodimerní glykoproteiny složené ze dvou nekovalentně asociovaných řetězců α a β (viz Obrázek 2). Každý řetězec je zakotven do cytoplasmatické membrány transmembránovou doménou, obsahuje intracelulární část a dvě extracelulární domény ($\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\beta 1$, $\beta 2$). (Klein and Sato 2000). Na rozdíl od molekul I. třídy, $\alpha 1$ a $\beta 1$ domény MHC antigenů II. třídy formují otevřenou na obou koncích vazebnou kapsu, což jim umožňuje vázat mnohem delší peptidy v rozmezí 8 až 30 aminokyselin. Domény $\alpha 2$ a $\beta 2$ jsou homologní s molekulami superrodiny imunoglobulinů a jsou velmi konzervativní mezi různými alelami jednoho genu (Liu and Gao 2011).

Molekuly HLA II. třídy se skládají v ER stejně jako molekuly I. třídy, ale na rozdíl od nich prezentují peptidy extracelulárního původu. Aby nedošlo k předčasné vazbě peptidu, vazebná kapsa MHC II. třídy je blokována polypeptidovým invariantním řetězcem (invariant chain, Ii). Nově vytvořené molekuly prochází Golgiho aparátem a odtud ve vezikulu cestují do endosomu, kde dochází k výměně Ii za peptidový fragment antigenu. Komplex HLA II. s navázaným peptidem poté putuje na buněčnou membránu, kde je prezentován CD4+ T lymfocytům (E. Thorsby, Pfeffer, and Leivestad 2004).

3. HLA polymorfismus

Geny MHC komplexu mají vysokou úroveň polymorfismu, tzv. velký počet variant (alel) v každém lokusu (genu). Většina variací je lokalizovaná v úsecích kódujících vazebnou kapsu pro peptid, tj v exonech 2 a 3 u molekul I. třídy, a v exonu 2 pro HLA II. třídy (Beck and Trowsdale 2000)(Beck and Trowsdale 2000). Jednotlivé alelické formy se obvykle mezi sebou liší sekvencí jedné nebo několika aminokyselin, což způsobuje mírné změny v trojrozměrné struktuře vazebného místa a umožňuje molekulám prezentovat buňkám imunitního systému větší spektrum peptidů (Ferrer, Fernández, and Nazabal 2005).

K dnešnímu dni (červenec 2021) celkový počet známých alel HLA systému dosahuje množství 30 862 alel, z toho 22,436 připadá na HLA molekuly I. třídy a 8,462 na HLA II. třídy (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>).

Extrémní polymorfismus HLA molekul se pravděpodobně evolučně vyvinul jako odpověď na schopnost mikroorganismů neustále mutovat, proto je velkou výhodou v boji proti infekcím, jelikož umožňuje jedinci schopnost bránit se proti rozmanitému repertoáru patogenů. Avšak při orgánových transplantacích tato vlastnost způsobuje závažné komplikace při hledání vhodného dárce. Jelikož HLA molekuly slouží k prezentaci antigenů imunokompetentním buňkám a jsou důležité pro rozpoznání vlastního od cizorodého, může jakákoliv neshoda působit jako stimul pro aktivaci imunitní odpovědi (Sheldon and Poulton 2006).

4. Dědičnost

HLA geny se obvykle dědí od každého rodiče společně jako fixní sada alel na jednom chromozomu, neboli haplotyp. Oba získané haplotypy (jeden od matky, druhý do otce) jsou exprimovány kodominantně. Dítě tak podle Mendelova zákona může zdědit po rodičích čtyři různé kombinace haplotypu a existuje 25% pravděpodobnost plné HLA shody mezi sourozenci (Trivedi et al. 2007). Vzhledem k rozsáhlému polymorfismu, je šance, že u dvou nepříbuzných jedinců budou nalezeny zcela shodující kombinace, velmi nízká (Rammensee, Friede, and Stevanović 1995).

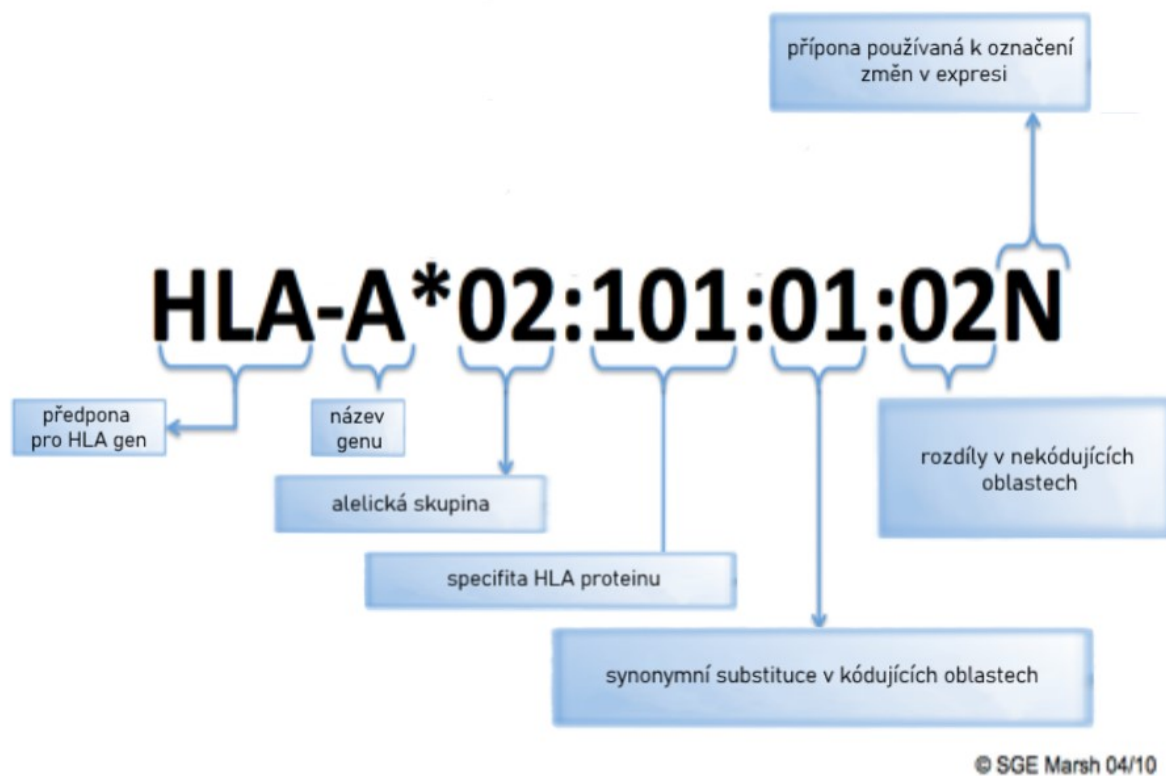
5. Nomenklatura

Původně HLA antigeny byly definovány na základě jejich reakce se specifickými séry pomocí sérologických metod. S vývojem molekulárně biologických metod v 90 letech minulého století byly zavedeny nová pravidla označení HLA genů, které jsou také průběžně aktualizovány.

Současná nomenklatura HLA komplexu je definována na základě výsledku sekvenování DNA. Název každého HLA genu obsahuje písmenné označení lokusu a číslo zahrnující čtyři sady číslic: první a druhá číslice označují alelickou skupinu, což často odpovídá sérologickému označení; další dvě definují specifickou aminokyselinovou sekvenci; třetí odkazuje na přítomnost tichých mutací způsobených záměnami nukleotidu, které ale nevedou ke změně

proteinu; poslední definuje rozdíly v nekódujících oblastech (introny atd.). Hvězdička v názvu znamená, že HLA typizace byla provedena pomocí molekulárních metod. Může být také přidána písmenná přípona k označení proteinů s nulovou (N) nebo nízkou (L) expresi (viz Obrázek 3) (Trowsdale and Knight 2013).

Pojmenování existujících a nově objevených alel je regulováno Výborem pro nomenklaturu WHO pro faktory HLA systému. Oficiálním úložištěm sekvencí HLA je IMGT / HLA databáze, kde jsou pravidelně publikovány aktualizace dokumentující nově identifikované alely (www.ebi.ac.uk/imgt/hla).



Obrázek 3. Názvosloví alel HLA (upraveno podle <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>)

6. Orgánové transplantace

Transplantace je nejlepší možnost léčby pro pacienty v terminálním stadiu selhání ledvin, a život zachraňující v případě transplantace srdce, jater a plic. Transplantace slinivky může poskytnout výrazné zlepšení kvality života pacientům s diabetem (Lechler et al. 2005). Hlavním cílem transplantace nahradit nefunkční orgán zdravým ekvivalentem. Nejčastější transplantací je alotransplantace neboli přenos tkáně či orgánů mezi geneticky odlišnými jedinci stejného druhu. Rozlišujeme taky transplantaci autogenní (přenos tkáně nebo buněk z téhož jedince na jiné místo organismu), syngenní (donor a příjemce jsou geneticky identičtí jedinci stejného druhu) a xenogenní (transplantace mezi jedinci různých druhů) (Hořejší and Bartůňková 2009).

Shoda v HLA mezi dárcem a příjemcem je jedním z hlavních faktorů ovlivňující úspěšnosti transplantace. Dárcovské HLA antigeny, když nejsou identické s HLA příjemce, jsou vnímány jako cizí, čímž spouští silnou imunitní reakci vůči transplantátu. Výsledkem je destrukce a odhojení transplantovaného orgánu. (W. Martin Howell and Navarrete 1996) Imunologická odpověď proti transplantované tkáni identifikované jako cizí se označuje termínem rejekce (Petty 2016).

Kromě HLA molekul byla popsána široká škála dalších polymorfních transplantačních antigenů, včetně „minor“ histokompatibilních antigenů, antigenů krevních skupin ABO a antigenů monocytů / endoteliálních buněk a tkáňově-specifických antigenů (mozku, ledvin atd.).

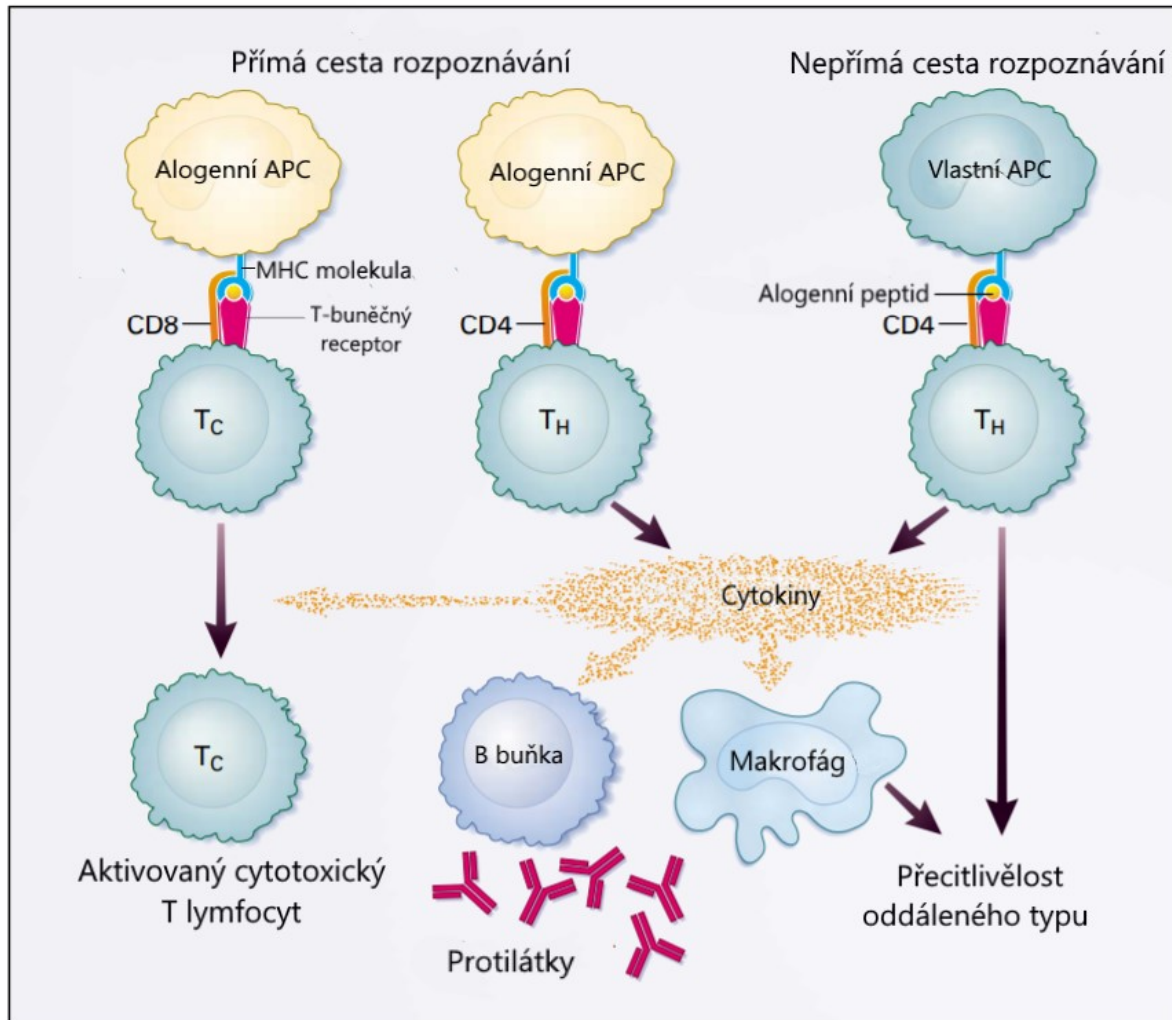
7. Imunitní odpověď proti transplantátu

Procesu odmítnutí štěpu se účastní složky jak přirozené, tak i adaptivní imunity. Imunitní odpověď proti štěpu může být rozdělena do třech po sobě jdoucích fází: rozpoznání aloantigenů, aktivace a proliferace buněk imunitního systému a efektorová fáze, která spočívá v procesu destrukce tkáně (Le Moine, Goldman, and Abramowicz 2002).

7.1 Rozpoznávání transplantačních antigenů

Proces rejekce je zahájen rozpoznáním cizích HLA antigenů naivními hostitelskými T buňkami, jejich aktivace způsobuje uvolnění prozánětlivých mediátorů a následnou aktivaci

dalších efektorových buněk imunitního systému. Existují dva hlavní mechanismy, kterými rozpoznávání HLA antigenů může probíhat: přímé a nepřímé (viz. Obrázek 4) (Le Moine, Goldman, and Abramowicz 2002).



Obrázek 4. Cesty rozpoznávání alogenních MHC molekul a mechanismy rejekce.

(upraveno podle: Mohamed H. Sayegh and Laurence A. Turka 1998)

7.1.1 Přímá cesta rozpoznávání

Při přímém rozpoznání T lymfocyty příjemce rozpoznávají cizí HLA molekuly přímo na dárcovských antigen-prezentujících buňkách. Krátce po transplantaci dendritické buňky dárce ze štěpu putují do sekundárních lymfatických orgánů, kde CD4⁺ nebo CD8⁺ T lymfocyty

příjemce pomocí TCR rozpoznávají cizí HLA komplexy exprimované na povrchu těchto APC. Přímé rozpoznání je specifickým mechanismem, který se uplatňuje jen u transplantací.

Existuje dvě alternativní hypotézy popisující schopnost T buněk reagovat proti alogenním MHC molekulám. První předpokládá, že některé aloreaktivní T buňky mohou přímo rozpoznávat specifické polymorfní oblasti alogenních HLA molekul bez ohledu na vázané peptidy (Bevan 1984)(Aosai et al. 1991). Druhá hypotéza naopak naznačuje zásadní roli prezentovaných peptidů. Předpokládá se, že alogenní MHC molekuly napodobují vlastním glykoproteinům příjemce, díky čemu T lymfocyty interagují s komplexem MHC-peptid stejným způsobem, jak by to bylo s vlastními MHC molekulami (Matzinger and Bevan 1977)(Boardman et al. n.d.).

Tato cesta rozpoznání je spojena s vznikem akutní rejekce a převládá v prvních týdnech po transplantaci, dokud nejsou dárcovské antigen-prezentující buňky zničeny imunitním systémem příjemce (Bolton, Bradley, and Pettigrew 2008).

7.1.2 Nepřímá cesta rozpoznávání

Dárcovské HLA molekuly mohou být prezentovány T lymfocytům stejným způsobem jako jakékoli jiné extracelulární antigeny. Tato cesta rozpoznání se označuje jako nepřímá a spočívá v tom, že APC příjemce mohou vylučovat antigeny vylučované ze štěpu, zpracovat je na peptidy a prezentovat CD4+ T buňkám na svém povrchu ve vazebné kapse vlastních HLA molekul II. třídy (Benichou et al. 1992). Tento způsob prezentace vede zpravidla k aktivaci CD4+ T lymfocytů, které následně poskytují pomocné signály k růstu a maturaci cytotoxických T lymfocytů a B buněk (Shoskes and Wood 1994). Dendritické buňky jsou však schopné prezentovat některé cizí extracelulární peptidy prostřednictvím MHC glykoproteinů I. třídy. Tento jev se nazývá zkřížená prezentace (cross presentation) a vede k aktivaci CD8+ lymfocytů (Joffre et al. 2012).

Na rozdíl od přímého způsobu prezentace k nepřímému dochází během životnosti štěpu prakticky neustále, a je důležitý při zahájení chronické rejekce spojené s tvorbou specifických protilátek proti HLA antigenům.(Baker et al. 2001), (Hornick et al. 2000).

7.2 Efektorová fáze

Rejekce můžeme rozdělit podle základních imunopatologických mechanismů na celulární a zprostředkovanou protilátkami, anebo taky za základě doby vzniku od provedené operace na hyperakutní (minuty až hodiny), akutní (dny až měsíce) a chronické (měsíce až roky).

7.2.1 T buňkami zprostředkovaná (celulární) rejekce

Akutní celulární rejekce nastává několik dní po transplantaci – doba nezbytná pro aktivaci, proliferaci a diferenciaci T buněk (Ponticelli 2012). Kromě rozpoznání antigenu prostřednictvím T-buněčného receptoru (TCR) aktivace naivních CD4 + a CD8 + T buněk vyžaduje kostimulační signály prostřednictvím vazby povrchových receptorů T buněk, jako je CD28, na B7 ligandy (CD80 [B7-1] nebo CD86 [B7-2]) exprimované na buňkách prezentující antigen (Le Moine, Goldman, and Abramowicz 2002)...

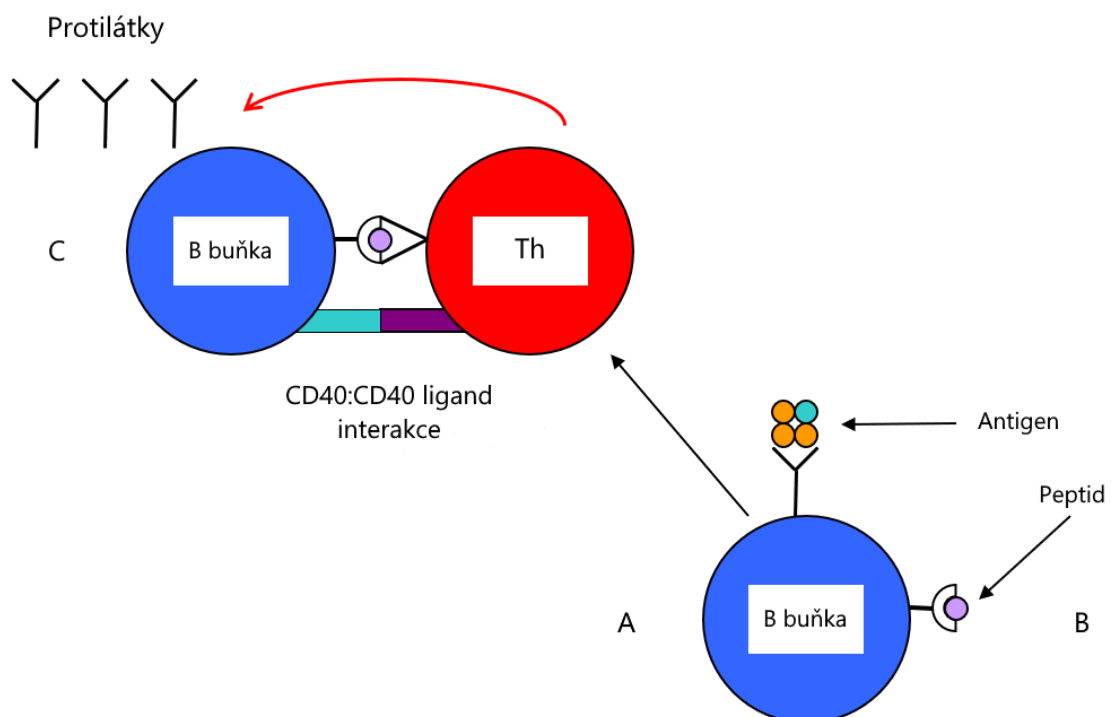
Aktivované přímou cestou CD8 + T buňky se diferencují na cytotoxické T lymfocyty (CTL), které z lymfatických uzlin migrují do štěpu, kde specificky lyzují cílové buňky (viz. Obrázek 4). CTL vykonávají svou cytolytickou aktivitu primárně prostřednictvím přímého kontaktu s buňkami a uvolňování cytotoxických granulí s enzymovým komplexem perforin/granzym B. Perforin je schopen vytvářet póry v cytoplazmatické membráně, kterými granzym vstoupí do cílové buňky a způsobí apoptózu cestou aktivaci kaspáz. Dalším možným cytotoxickým mechanismem indukujícím apoptotickou smrt cílové buňky je vazba povrchového proteinu cytotoxických T lymfocytů FasL (Fas-ligand) na Fas-receptor exprimovaný na povrchu cílové buňky (Le Moine, Goldman, and Abramowicz 2002)(Rocha et al. 2003).

Uvolňováním cytokinů pomocné T lymfocyty indukují zánětlivou reakci v tkáních a aktivují další buňky imunitního systému včetně NK buněk, eozinofilů a makrofágů, které jsou schopné poškodit tkáň uvolňováním cytotoxických molekul (viz. Obrázek 4). Samotné cytokiny (např. TNF – α) nebo jiné mediátory (např. oxid dusnatý) mohou taky přímo způsobit destrukci tkáň (Le Moine, Goldman, and Abramowicz 2002).

7.2.2 Protilátkami zprostředkovaná (humorální) rejekce

Příjemci s neshodou v HLA antigenech mají zvýšenou pravděpodobnost vyvinout *de novo* donor-specifické protilátky (DSA), které jsou spojené s vývojem protilátkami-zprostředkované rejekce a se zhoršenou prognózou dlouhodobého přežití transplantovaného orgánu (Meier-Kriesche et al. 2009);(Lachmann et al. 2009).

B-buňky mohou působit jako APC a rozpoznávat antigeny pomocí imunoglobulinových receptorů (BCR) na svém povrchu. B buňka štěpí rozpoznané molekuly HLA na alopeptidy a prezentuje je vlastními MHC molekulami II. třídy. Vazba antigenů na BCR zahajuje proces aktivace, ale sama o sobě není dostatečná. Proto úplná aktivace B-buněk vyžaduje pomocné kostimulační faktory (Kwun et al. 2017). Jak už bylo naznačeno výše, prostřednictvím přímého kontaktu a produkci cytokinů aktivované CD4⁺ T lymfocyty napomáhají diferenciaci B lymfocytů na plazmatické buňky a produkci protilátek proti rozpoznanému HLA antigenu (viz Obrázek 5) (Shoskes and Wood 1994);(Kwun et al. 2017).



Obrázek 5. Interakce B a T lymfocytů (upraveno podle Gloor, J. et al. 2008)

Produkované protilátky proti aloantigenům dárce vážou na HLA molekuly exprimovaných na endoteliálních buňkách štěpu a mohou aktivovat klasickou dráhu komplementu (v případě, že jsou to IgG1 a IgG3 subtypy), což má za následek poškození tkáně a koagulaci (Collins et al. 1999). Protilátky mohou zprostředkovat efektorové funkce proti štěpu i mechanismy nezávislémi na komplementu. V tomto případě NK buňky a makrofágy pomocí Fc-receptorů rozpoznávají protilátky navázané na cílových buňkách, čímž aktivují svoje efektorové mechanismy. To vede k poškození tkáně způsobené komplexem perforin/granzym B uvolňovaným NK buňkami podobně jako u CTL anebo vyloučením makrofágy oxidu dusnatého, TNF- α a aktivních forem kyslíku (Vongwiwatana et al. 2003).

7.2.2.1. Hyperakutní rejekce

K tvorbě HLA-specifických protilátek může dojít již před transplantací v důsledku předchozích imunizací. Tak například k senzibilizaci dochází zpravidla u pacientů po dřívějších transplantacích, krevních transfúzích neboli těhotenstvích. Přítomnost preformovaných protilátek v krvi příjemce proti antigenům potenciálního dárce je těsně spojena s hyperakutním odmítnutím transplantovaného štěpu (Kissmeyer-Nielsen et al. 1966). K hyperakutní rejekci dochází během prvních minut až hodin po transplantaci. Preformované protilátky se vážou na HLA antigeny endotelu, čímž způsobují aktivaci kaskády komplementu a agregaci krevních destiček, jak už bylo zmíněno výše. Výsledkem je poškození cév, vznik trombů a nekróza tkáně. Toto je nevratná událost a jedinou možností léčby je okamžité odstranění štěpu (Chinen and Buckley 2010). Avšak v současné době výskyt hyperakutních rejekcí prakticky nulový především díky provádění křížové zkoušky u všech pacientů před transplantací (Patel and Terasaki 1969).

7.2.4 Chronická rejekce

Chronická rejekce se obvykle projevuje v průběhu několika měsíců až let po transplantaci a je charakterizována postupnou ztrátou funkce transplantovaného orgánu. Přesný mechanismus způsobující tento typ rejekce není známý, jelikož k procesu odhojení obvykle přispívá množství imunologických a neimunologických faktorů. K imunologickým mechanismům patří opakující se akutní rejekce, ať už v důsledku vývoje donor-specifických protilátek namířených proti vaskulárnímu endotelu štěpu, anebo vznikem efektorových T-buněk reaktivních proti aloantigenům. (Almond et al. 1993). Mezi rizikové faktory výskytu

chronické rejekce patří i neimunologické procesy, jako jsou například ischemicko-reperfuzní stres, chirurgický stres, hypertenze, virové infekce, zdravotní stav dárce a další.

8. Vyšetření prováděná v HLA laboratořích

Vyšetření prováděná v HLA laboratořích jsou zaměřená na zajištění transplantačního programu orgánů a krvetvorných kmenových buněk. U transplantací orgánů se provádí určení HLA antigenů a hladin protilátek proti HLA u čekatelů na transplantaci, typizují se HLA antigeny u dárců orgánů a také v nemalé míře se v posledních letech HLA laboratoře podílí na diagnostice protilátkami-zprostředkované rejekce po transplantaci.

8.1 HLA typizace

Stanovení HLA polymorfismů jednotlivých HLA molekul (HLA typizace) může být prováděno metodami založenými buď na detekci HLA antigenů (sérologické metody), anebo přímo na určení polymorfismů HLA genů (molekulárně-genetické metody) (W. M. Howell, Carter, and Clark 2010).

Identifikace alel (variant HLA genů) molekulárně-genetickými metodami může být provedena na různých stupních rozlišení. „Low resolution“ techniky definují alelické skupiny (většinou odpovídají serologickým specifitám HLA antigenů), „high resolution“ metody definují přesné varianty genů (alel).

8.1.1 Sérologická typizace

Standardní sérologickou metodou je komplement-dependentní cytotoxický test (CDC) založený na detekci exprimovaných HLA molekul na povrchu T buněk (HLA I. třídy) anebo B buněk (HLA I. a II. třídy). Provádí se na Terasakiho deskách, kde každá jamka (60-72 jamek na jednu desku) obsahuje antiséra se specifickými protilátkami proti HLA antigenům, jejichž specifita je dobře charakterizována (Dyer and Martin 1991). HLA antigen lze určit na základě výsledků reakcí lymfocytů jedince s různými antiséry za přítomnosti komplementu. Izolované lymfocyty se smísí s typizačním sérem, a po inkubaci se následně přidává králičí komplement. Pokud povrchové antigeny se shodnou se specifitou protilátek, komplementový komplex se

aktivuje a dochází k lýze testovaných buněk. Buněčná smrt znamená přítomnost určitého HLA antigenu a detekuje se mikroskopicky po přidání fluorescenčního anebo jiného barviva (například eozin), které proniká dovnitř mrtvých buněk (Sheldon and Poulton 2006)(Dyer and Martin 1991).

Hlavními nevýhodami sérologických metod jsou nutnost živých buněk s vysokou expresí HLA, zkřížená reaktivita, obtížná identifikace v důsledku nižší exprese HLA na povrchu buněk a případně falešně pozitivních anebo falešně negativních reakcí. Nicméně, je nutno poukázat na to, že serologické metody hrály naprosto zásadní roli při rozluštění struktury HLA komplexu v 50 a 60 letech minulého století. (Erik Thorsby 2009)

8.1.2 Molekulárně genetické metody typizace

Během posledních 20-25 let metody HLA typizace založené na DNA začaly nahrazovat sérologické metody, jelikož jsou mnohem přesnější, a navíc umožňují typizaci HLA antigenů, proti kterým není možné vyrobit protilátky (Mishra et al. 2004). Použití molekulárně genetických metod umožnilo identifikaci menších rozdílů mezi HLA antigeny, které dle sérologických metod byly považovány za identické. Přesněji definované antigeny korelují s vyšší mírou přežití štěpu. (G Opelz et al. 1991)

Typizace metodou využívající technologie sekvenčně specifických primerů (SSP) a sekvenčně specifických oligonukleotidů (SSOP) se běžně používají v mnoha laboratořích tkáňové typizace. Obě tyto metody vycházejí z polymerázové řetězové reakce (PCR). Nejpresnější metodou typizace je sekvenování, které umožňuje stanovení přesné nukleotidové sekvence požadovaného genu. Typ HLA je následně určen porovnáním s již publikovanými sekvencemi HLA alel. (Tinckam 2009)

8.1.2.1 PCR – SSP

Princip této metody spočívá v použití párů sekvenčně specifických primerů, z nichž každý je komplementární pouze k určité alele nebo ke skupině podobných alel konkrétního lokusu. Primery jsou navrženy tak, aby detekovaný polymorfismus byl lokalizován na 3' konci (Dunckley 2012). Jelikož Taq DNA polymeráza nemá 3' - 5' exonukleázovou aktivitu, primery,

pokud se neshodují na 3' konci s cílovou sekvencí DNA, nemohou iniciovat PCR reakci. Proto k amplifikaci dochází jen v případě přítomnosti komplementární alely. Produkt reakce může být následně detekován pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (Ferrer, Fernández, and Nazabal 2005).

8.1.2.1.2 PCR – SSOP

Tato metoda založena na tom, že amplifikovaná DNA se smíchá s oligonukleotidovými sondami, které jsou komplementární k unikátním segmentům DNA. Když sekvence DNA je komplementární se sekvencí oligonukleotidu, dochází k hybridizaci. Tyto sondy se liší unikátními fluorescenčními značkami, které pak umožňují identifikovat HLA alely (Sheldon and Poulton 2006).

8.2. Crossmatch test

Detekce preformovaných DSA se provádí pomocí metodou CDC, jejíž princip už byl popsán výše. Sérum příjemce je testováno na reaktivitu proti B a T lymfocytům potenciálního dárce. Je nejdůležitějším testem, který se provádí před transplantací orgánů. Pozitivní výsledek je kontraindikací pro transplantaci, jelikož naznačuje velké riziko vývoje hyperakutní rejekce (viz výše) (Patel and Terasaki 1969)(Kosi 2017). Existují i další crossmatch techniky s rozdílnou sensitivitou a specificitou. Například crossmatch test za použití průtokové cytometrie (FCXM – flow cytometry cross-match) je mnohem citlivější metoda. Zde se dárcovské lymfocyty smíchají se sérem příjemce za přítomnosti fluoresceině značených anti-IgG protilátek. Pokud se protilátky specifické pro dárce váží na lymfocyty, jsou detekovány pomocí anti-IgG značené fluoresceinem (Kosi 2017).

8.3 Screening protilátek

Testy založené na pevné fázi, jako např. ELISA, Luminex, umožňují přesnější detekci a charakterizaci donor specifických protilátek, jelikož jsou mnohem citlivější než klasické crossmatch techniky. Nejcitlivější z nich je metoda Luminex, která využívá polystyrenové kuličky potažené HLA antigeny I. a/nebo II. třídy. Navázané protilátky následně lze detekovat fluorescenčně označenou sekundární protilátkou (Fuggle and Martin 2008).

9. Vliv shody HLA na výsledky transplantace orgánů

Před érou moderní imunosuprese shody v HLA antigenech hrály klinicky významnou roli při transplantaci orgánu (G Opelz, M R Mickey n.d.). Avšak s vývojem imunosuprese se začalo diskutovat, zda HLA systém ztrácí význam pro transplantaci orgánů (Su et al. 2004). Ale z údajů většiny multicentrických studií je zřejmé, že shoda v HLA antigenech mezi dárcem a příjemcem stále hraje významnou roli ke zlepšení výsledků dlouhodobého přežití štěpu (Wissing et al. 2008)(Williams et al. 2016).

Obecně se považuje, že HLA–A, HLA–B a HLA–DR jsou hlavními transplantačními antigeny, a jsou nejvíc prozkoumány. Pro maximalizaci šancí dlouhodobého přežití transplantovaného orgánu je důležitá shoda všech šesti antigenů. Například data z The Collaborative Transplant Study (CST) ukazují, že přežití štěpu během prvního roku u pacientů po transplantaci ledvin od zemřelých dárců s plnou shodou HLA v těchto lokusech bylo téměř o 20% víc úspěšné než u plně neshodujících štěpů (Gerhard Opelz 1985). K podobnému závěru dospěla i novější a větší studie ve Spojených státech, do které bylo zařazeno celkem 189 141 pacientu po transplantaci ledvin, a ukázala, že je významný lineární vztah mezi počtem shod v HLA-A, -B a -DR antigenech a mírou přežití štěpu, přičemž pacienti s jednou HLA neshodou měli o 13% vyšší riziko selhání aloštěpu a se 6 neshodami měli více než o 50% (Williams et al. 2016)

Shoda v antigenech se obecně bere v úvahu především při transplantaci ledvin, ale pozitivní vliv HLA systému na přežití štěpu se ukazuje i při transplantaci jiných orgánů, včetně srdce (Opelz, G 1994)(Ginde et al. 2014), plic (Brugière et al. 2008) a pankreatu (Rudolph et al. 2016)

Největší úspěšnost krátko- a dlouhodobého přežití štěpu je, když dárcem a příjemcem jsou geneticky identičtí dvojčata, následují HLA identičtí sourozenci (Kessaris et al. 2008). Avšak i v případě plné shody v HLA, rozdíly v jiných polymorfních genetických systémech mohou vést k odhojení transplantovaného orgánu. Na vývoji procesu rejekce se může podílet celá řada dalších tkáňových antigenů. Příkladem takových non-HLA antigenů jsou stresové molekuly MICA a MICB (MHC class I polypeptide-related sequence A a B). Endoteliální buňky exprimující na svém povrchu tyto antigeny se můžou stát cílem pro rozvoj imunitní odpovědi proti transplantátu.(Sumitran-holgersson, Wilczek, and Holgersson 2002)

Existuje málo údajů, které by popisovaly význam neshod HLA v jiných lokusech než v těch, které už byly zmíněny výše. Ale zda se, že by taky by mohly mít pozitivní vliv na výsledek transplantace. Například, neshody v HLA-DQ antigenech, které se obvykle rutinně neberou v úvahu při výběru dárce, mohou být predisponujícím faktorem pro tvorbu *de novo* protilátek, a tím snižovat dobu přežití transplantovaného orgánu (Devos et al. 2012).

10. Sensibilizace

Vyšší počet neshod v HLA při první transplantaci je spojen s vyšším stupněm senzibilizace u příjemců orgánů, což má za následek prodloužení čekací doby na retransplantaci a zvýšené riziko ztráty druhého štěpu (Meier-Kriesche et al. 2009). Z tohoto hlediska HLA shoda je velmi důležitá pro mladé pacienty, u kterých vzhledem k jejich věku je vysoká pravděpodobnost, že bude nutná opakovaná transplantace (Foster et al. 2014).

Úroveň senzibilizace se určuje stanovením panel-reaktivních protilátek (PRA), které vyjadřuje procento buněk od různých jedinců, se kterými reaguje sérum pacienta (Montgomery et al. 2018). Jako vysoce senzibilizovaní se označují pacienti, kteří mají $PRA \geq 85\%$. Šance najít vhodného dárce s negativním crossmatch testem, u takových lidí je nízká. Proto byla navrhována alternativní strategie hledání vhodného dárce, která je zaměřena na definování HLA antigenů, proti nimž pacient nemůže vyrobit protilátky (program acceptable mismatch Eurotransplantu) (Tiercy 2002).

Protilátky se vážou na konkrétní oblasti HLA antigenů neboli epitopy. HLA antigeny jsou ale komplexní a mají na svém povrchu více než jeden epitop. Navíc, tyto epitopy mohou být unikátní pro konkrétní antigen, anebo mohou být sdílené s jinými HLA molekulami („shared“, neboli „public“ epitopy). Proto neshoda v jednom HLA antigenu může vést k senzibilizaci proti široké škále HLA molekul. Příčinou je tzv. zkřížená reaktivita, kdy jedna protilátka proti jednomu konkrétnímu antigenu je schopna rozeznávat všechny ostatní antigeny sdílející ten daný epitop (El-Awar, Jucaud, and Nguyen 2017).

Analýza HLA antigenů na úrovni epitopů má potenciál usnadnit nalezení vhodných dárců orgánů před transplantací a umožnit predikci akceptovatelných HLA neshod, u kterých je nižší riziko vyvolat imunitní odpověď. Zatímco aktuální typizace HLA antigenů je omezena popisem dvou molekul buď jako shodující se anebo neshodující se, stanovení shody epitopů umožňuje dokonalejší porozumění stupni rozdílu mezi dárce a příjemcem. Existují data, že některé HLA

antigeny mohou být více imunogenní než jiné, v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti zkříženě reagujících epitopů v HLA ve fenotypu pacienta (Lucas, Leffell, and Zachary 2014). Shoda epitopů HLA je založena na principu, že senzibilizovaný pacient nemůže vytvářet protilátky proti vlastním epitopům, a proto, pokud dárcovský HLA antigen sdílí stejný specifický epitop s antigenem příjemce, tento epitop nebude rozpoznán jako cizí, a proto nevyvolá imunitní odpověď.

11. Další účinky neshody HLA

Vyšší stupeň HLA shody mezi dárcem a příjemcem vede nejen k snížené šanci dlouhodobého přežití štěpu, ale je také asociován s potřebou intenzivnější antirejekční léčby a podání větších dávek imunosupresivních léků, které mohou zvýšit riziko úmrtí pacientů s funkčním štěpem. Bylo prokázáno, že neshody HLA významně korelují se zvýšeným výskytem úmrtí v důsledku virových a bakteriálních infekcí nebo kardiovaskulárních onemocnění během prvního roku po transplantaci (G. Opelz and Döhler 2012).

12. Závěr

Rejekce orgánů je komplexní proces, který může být ovlivněn množstvím různých imunologických a neimunologických faktorů. Neshody v HLA systému stále zůstávají významnou bariérou pro maximalizaci doby přežití transplantovaného orgánu a samotného pacienta. Dobrá HLA shoda mezi příjemcem a dárcem poskytuje řadu výhod, které mohou významně ovlivnit kvalitu a délku života u pacientů po transplantaci orgánů. Patří k nim zejména lepší funkce a dlouhodobé přežití štěpu, možnost podávání menších dávek imunosuprese, nižší úroveň senzibilizace, která je spojena se sníženou čekací dobou a vyšší kvalitou retransplantace v případě potřeby.

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
APC	Antigen presenting cell	Buňka prezentující antigen
BCR	B-cell antigen receptor	B-buněčný receptor
CDC	Complement-dependent cytotoxicity assay	Komplement dependentní cytotoxický test
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	Cytotoxický T lymfocyt
DC	Dendritic cell	Dendritická buňka
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DSA	Donor specific antibodies	Donor-specifické protilátky
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické retikulum
FasL	Fas ligand	Fas ligand
FCXM	Flow cytometry crossmatch	
HLA	Human leukocyte antigen	Lidské leukocytární antigeny
IFNγ	Interferon gamma	Interferon gama
Ig	Immunoglobulin	Imunoglobulin
Ii	Invariant chain	Invariantní řetězec
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor	
MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex
MICA/MICB	Major histocompatibility class I-related antigens A/B	
NK	Natural killer cell	Přirozený zabíječ
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PCR-SSOP PCR	PCR – Sequence specific oligonucleotide probe	PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami

PCR-SSP	PCR – Sequence specific primer	PCR se sekvenčně specifickým Primerem
PRA	Panel reactive antibodies	Panel-reaktivní protilátky
TAP	Transporter associated with antigen processing	
Tc	Cytotoxic T lymphocyte	Cytotoxický T lymfocyt
TCR	T cell receptor	T buněčný receptor
TGF β	Transforming growth factor beta	Transformující růstový faktor beta
Th	Helper T lymphocyte	Pomocný T lymfocyt
TNF	Tumor necrosis factor	Faktor nekrotizující nádory
WHO	World health organization	Světová zdravotnická organizace

Seznam použité literatury

- Almond, P S et al. 1993. "Risk Factors for Chronic Rejection in Renal Allograft Recipients."
- Aosai, Fumie et al. 1991. "Different Types of Allospecific CTL Clones Identified by Their Ability to Recognize Peptide Loading-defective Target Cells." *European Journal of Immunology* 21(11): 2767–74.
- Baker, Richard et al. 2001. "Loss of Direct and Maintenance of Indirect Alloresponses in Renal Allograft Recipients: Implications for the Pathogenesis of Chronic Allograft Nephropathy." *The Journal of Immunology* 167: 7199–7206.
<http://www.jimmunol.org/content/167/12/7199><http://www.aai.org/ji/copyright.html><http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc> (August 5, 2021).
- Beck, Stephan, and John Trowsdale. 2000. "The Human Major Histocompatibility Complex: Lessons from the DNA Sequence." *Microbiology and Immunology II*: 1–17.
- Benichou, Gilles et al. 1992. "Donor Major Histocompatibility Complex (MHC) Peptides Are Presented by Recipient MHC Molecules during Graft Rejection." 175.
- Bevan, Michael J. 1984. "High Determinant Density May Explain the Phenomenon of Alloreactivity." *Immunology Today* 5(5): 128–30.
- Boardman, Dominic A et al. "What Is Direct Allorecognition?"
- Bolton, Eleanor M., J. Andrew Bradley, and Gavin J. Pettigrew. 2008. "Indirect Allorecognition: Not Simple but Effective." *Transplantation* 85(5): 667–69.
<https://journals.lww.com/00007890-200803150-00002> (April 5, 2021).
- Brugière, Olivier et al. 2008. "Relative Impact of Human Leukocyte Antigen Mismatching and Graft Ischemic Time After Lung Transplantation." *J Heart Lung Transplant* 27: 628–62.
- Chinen, Javier, and Rebecca H. Buckley. 2010. "Transplantation Immunology: Solid Organ and Bone Marrow." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2 SUPPL. 2): S324–35. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674909017308> (February 25, 2021).
- Choo, S. Y. 1991. "Immunogenetics of the HLA System." *Yonsei medical journal* 32(1): 1–8.
- Collins, A Bernard et al. 1999. "Complement Activation in Acute Humoral Renal Allograft

- Rejection: Diagnostic Significance of C4d Deposits in Peritubular Capillaries.”
- Devos, Jennifer M. et al. 2012. “Donor-Specific HLA-DQ Antibodies May Contribute to Poor Graft Outcome after Renal Transplantation.” *Kidney International* 82(5): 598–604.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008525381555597X> (May 1, 2021).
- Dunckley, Heather. 2012. “HLA Typing by SSO and SSP Methods.” 882: 9–25.
- Dyer, Philip A., and Susan Martin. 1991. “Techniques Used to Define Human MHC Antigens: Serology.” *Immunology Letters* 29(1–2): 15–21.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016524789190193E> (April 1, 2021).
- El-Awar, Nadim, Vadim Jucaud, and Anh Nguyen. 2017. “HLA Epitopes: The Targets of Monoclonal and Alloantibodies Defined.” *Journal of Immunology Research* 2017.
- Ferrer, Annia, María E. Fernández, and Marcelo Nazabal. 2005. “Overview on HLA and DNA Typing Methods.” *Biotechnologia Aplicada* 22(2): 91–101.
- Foster, B. J. et al. 2014. “Impact of HLA Mismatch at First Kidney Transplant on Lifetime with Graft Function in Young Recipients.” *American Journal of Transplantation* 14(4): 876–85.
- Fuggle, Susan V., and Susan Martin. 2008. “Tools for Human Leukocyte Antigen Antibody Detection and Their Application to Transplanting Sensitized Patients.” *Transplantation* 86(3): 384–90.
- G Opelz, M R Mickey, P I Terasaki. “HLA Matching and Cadaver Kidney Transplant Survival in North America: Influence of Center Variation and Presensitization.” *Transplantation*: 490–497.
- Ginde, Salil et al. 2014. “The Influence of Human Leukocyte Antigen Matching on Outcomes in Pediatric Heart Transplantation.”
- Hořejší, Václav, and Jiřina Bartůňková. 2009. “Základy Imunologie. 4. Vyd.” *Praha: Triton*.
- Hornick, Philip I et al. 2000. “Significant Frequencies of T Cells With Indirect Anti-Donor Specificity in Heart Graft Recipients With Chronic Rejection.”
<http://www.circulationaha.org> (August 4, 2021).
- Horton, Roger et al. 2004. “Gene Map of the Extended Human MHC.” *Nature Reviews Genetics* 5(12): 889–99.

- Howell, W. M., V. Carter, and B. Clark. 2010. "The HLA System: Immunobiology, HLA Typing, Antibody Screening and Crossmatching Techniques." *Journal of Clinical Pathology* 63(5): 387–90. <http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jcp.2009.072371> (February 25, 2021).
- Howell, W. Martin, and Cristina Navarrete. 1996. "The HLA System: An Update and Relevance to Patient-Donor Matching Strategies in Clinical Transplantation." *Vox Sanguinis* 71(1): 6–12. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1423-0410.1996.7110006.x> (October 21, 2020).
- Joffre, Olivier P., Elodie Segura, Ariel Savina, and Sebastian Amigorena. 2012. "Cross-Presentation by Dendritic Cells." *Nature Reviews Immunology* 12(8): 557–69. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3254>.
- Kessarlis, Nicos, Dayal Mukherjee, Pankaj Chandak, and Nizam Mamode. 2008. "Renal Transplantation in Identical Twins in United States and United Kingdom." *Transplantation* 86(11): 1572–77.
- Kissmeyer-Nielsen, F., S. Olsen, V. P. Petersen, and O. Fjeldborg. 1966. "Hyperacute Rejection of Kidney Allografts, Associated with Pre-Existing Humoral Antibodies against Donor Cells." *Lancet* 288(7465): 662–65.
- Klein, J. A.N., and Akie Sato. 2000. "The HLA System: First of Two Parts" eds. Ian R. Mackay and Fred S. Rosen. *The New England journal of medicine* 343(10): 702–9. <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200009073431006> (February 25, 2021).
- Kosi, El M. 2017. "An Update on Crossmatch Techniques in Transplantation."
- Kwun, Jean et al. 2017. "Crosstalk between T and B Cells in the Germinal Center after Transplantation." *Transplantation* 101(4): 704–12.
- Lachmann, Nils et al. 2009. "Anti-Human Leukocyte Antigen and Donor-Specific Antibodies Detected by Luminex Posttransplant Serve as Biomarkers for Chronic Rejection of Renal Allografts." www.transplantjournal.com (August 6, 2021).
- Lechler, Robert I., Megan Sykes, Angus W. Thomson, and Laurence A. Turka. 2005. "Organ Transplantation - How Much of the Promise Has Been Realized?" *Nature Medicine* 11(6): 605–13.
- Liu, Jun, and George F Gao. 2011. "Major Histocompatibility Complex: Interaction with

Peptides.” *eLS*: 1–12.

Lucas, Donna P, Mary S Leffell, and Andrea A Zachary. 2014. “Differences in Immunogenicity of HLA Antigens and the Impact of Cross-Reactivity on the Humoral Response.” www.transplantjournal.com (August 9, 2021).

Matzinger, Polly, and Michael J. Bevan. 1977. “Why Do so Many Lymphocytes Respond to Major Histocompatibility Antigens?” *Cellular Immunology* 29(1): 1–5.

Meier-Kriesche, Herwig-Ulf et al. 2009. “A Lifetime Versus a Graft Life Approach Redefines the Importance of HLA Matching in Kidney Transplant Patients.” www.transplantjournal.com (August 6, 2021).

Milner, Caroline M., and R. Duncan Campbell. 2001. “Genetic Organization of the Human MHC Class III Region.” *Frontiers in Bioscience*. <https://sci-hub.do/10.2741/milner> (August 11, 2021).

Mishra, MN, H Mani, As Narula, and VK Saxena. 2004. “HLA Typing-A Comparison of Serology and DNA Techniques.” *International Journal of Human Genetics* 4(2): 151–53. <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=rhug20> (August 12, 2021).

MOHAMED H. SAYEGH, M.D., and M.D AND LAURENCE A. TURKA. 1998. “THE ROLE OF T-CELL COSTIMULATORY ACTIVATION PATHWAYS IN TRANSPLANT REJECTION.” *MECHANISMS OF DISEASE* 338: 1813.

Le Moine, Alain, Michel Goldman, and Daniel Abramowicz. 2002. “Multiple Pathways to Allograft Rejection.” *Transplantation* 73(9): 1373–81. <http://journals.lww.com/00007890-200205150-00001> (March 25, 2021).

Montgomery, Robert A., Vasishta S. Tatapudi, Mary S. Leffell, and Andrea A. Zachary. 2018. “HLA in Transplantation.” *Nature Reviews Nephrology* 14(9): 558–70.

Natarajan, K., H. Li, R. A. Mariuzza, and D. H. Margulies. 1999. “MHC Class I Molecules, Structure and Function.” *Reviews in immunogenetics* 1(1): 32–46.

Opelz, G, T Wujciak. 1994. “Influence of HLA Compatibility on Graft Survival after Heart Transplantation.” *New England Journal of Medicine*.

Opelz, G., and B. Döhler. 2012. “Association of HLA Mismatch with Death with a

- Functioning Graft after Kidney Transplantation: A Collaborative Transplant Study Report.” *American Journal of Transplantation* 12(11): 3031–38.
- Opelz, G et al. 1991. “Survival of DNA HLA-DR Typed and Matched Cadaver Kidney Transplants.”
- Opelz, Gerhard. 1985. “Correlation of Hla Matching with Kidney Graft Survival in Patients with or without Cyclosporine Treatment.” *Transplantation* 40(3): 240–43.
- Patel, R, and Paul Terasaki. 1969. “Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation.”
- Petty, Michael. 2016. “Antibody-Mediated Rejection in Solid Organ Transplant.” *AACN Advanced Critical Care* 27(3): 316–23.
- Ponticelli, Claudio. 2012. “The Mechanisms of Acute Transplant Rejection Revisited.” *Journal of Nephrology* 25(2): 150–58.
- Rammensee, Hans Georg, Thomas Friede, and Stefan Stevanović. 1995. “MHC Ligands and Peptide Motifs: First Listing.” *Immunogenetics* 41(4): 178–228.
<http://link.springer.com/10.1007/BF00172063> (March 28, 2021).
- Rocha, Paulo N., Troy J. Plumb, Steven D. Crowley, and Thomas M. Coffman. 2003. “Effector Mechanisms in Transplant Rejection.” *Immunological Reviews* 196: 51–64.
- Rudolph, E N et al. 2016. “HLA-A,-B,-C,-DR, and-DQ Matching in Pancreas Transplantation: Effect on Graft Rejection and Survival.”
- Sheldon, Stephen, and Kay Poulton. 2006. “HLA Typing and Its Influence on Organ Transplantation.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 333: 157–74.
<http://link.springer.com/10.1385/1-59745-049-9:157> (October 21, 2020).
- Shoskes, Daniel A., and Kathryn J. Wood. 1994. “Indirect Presentation of MHC Antigens in Transplantation.” *Immunology Today* 15(1): 32–38.
- Su, Xuanming et al. 2004. “Diminishing Significance of HLA Matching in Kidney Transplantation.” *American Journal of Transplantation* 4: 1501–8.
- Sumitran-holgersson, S, H E Wilczek, and J Holgersson. 2002. “Identification of the Nonclassical Hla Molecules, MICA, as Targets for Humoral Immunity Associated with Irreversible Rejection of Kidney Allografts.” *TRANSPLANTATION* 74(2): 268–77.

- The MHC sequencing consortium. 1999. "Complete Sequence and Genemap of a Human Major Histocompatibility Complex." *NATURE* 401(October): 921–23.
- Thorsby, E., P. Pfeffer, and T. Leivestad. 2004. "Role of HLA Molecules in the Induction of Alloimmune Responses: Clinical Significance in the Cyclosporine Era." *Transplantation Proceedings* 36(2 SUPPL.): S16–21.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134504000405> (March 12, 2021).
- Thorsby, Erik. 2009. "A Short History of HLA."
- Tiercy, J. M. 2002. "Molecular Basis of HLA Polymorphism: Implications in Clinical Transplantation." In *Transplant Immunology*, Elsevier, 173–80.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966327402000072> (March 12, 2021).
- Tinckam, Kathryn. 2009. "Histocompatibility Methods." www.elsevier.com/locate/trre (August 11, 2021).
- Trivedi, V. B., A. P. Dave, J. M. Dave, and B. C. Patel. 2007. "Human Leukocyte Antigen and Its Role in Transplantation Biology." *Transplantation Proceedings* 39(3): 688–93.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134507001157> (April 9, 2021).
- Trowsdale, John. 2001. "Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes." *Immunity* 15(3): 363–74.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761301001972> (February 14, 2021).
- Trowsdale, John, and Julian C. Knight. 2013. "Major Histocompatibility Complex Genomics and Human Disease." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 14: 301–23.
- Vongwiwatana, Attapong, Adis Tasanarong, Luis G Hidalgo, and Philip F Halloran. 2003. "The Role of B Cells and Alloantibody in the Host Response to Human Organ Allografts."
- Vyas, Jatin M., Annemarte G. Van Der Veen, and Hidde L. Ploegh. 2008. "The Known Unknowns of Antigen Processing and Presentation." *Nature Reviews Immunology* 8(8): 607–18.
- Williams, Robert C et al. 2016. "The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors." <http://links.lww.com/TP/B245> (August 6, 2021).

Wissing, Karl M et al. 2008. "HLA Mismatches Remain Risk Factors for Acute Kidney Allograft Rejection in Patients Receiving Quadruple Immunosuppression With Anti-Interleukin-2 Receptor Antibodies."