

**ВЫЯВЛЕНИЕ НОВОГО АЛЛЕЛЯ HLA-B МЕТОДОМ НАНОПОРОВОГО
СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ ПОРТАТИВНОГО НАНОПОРОВОГО
СЕКВЕНАТОРА «НАНОПОРУС»**

Ермаков А.М.^{1,2*}, Благодатский А.С.², Филиппова К.О.^{1,2}, Рудик Д.В.³

¹ ООО «Нанопорус», 142201, Московская обл., г. Серпухов, ул. Сиреневая д.8;
телефон: +79165816980; эл. почта: info@nanoporus.ru

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290,
Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская д.3; телефон: +7 (4967) 73-25-80; эл. почта:
office@iteb.ru

³ АО «БиоХимМак Диагностика», Москва, Ломоносовский проспект, д. 25, корп. 2;
телефон: +7 (495) 932-92-14; эл. почта: seliverstova@bcmd.ru

Резюме.

Введение. Типирование локуса человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA) с высоким разрешением – важная диагностическая процедура, необходимая для проведения трансплантации органов и гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Последняя требуется для лечения ряда злокачественных и незлокачественных заболеваний. Внедрение платформ, позволяющих проводить типирование HLA с высоким разрешением – важная прикладная биомедицинская задача.

Цель исследования: Провести типирование HLA пациентов при помощи высокопроизводительного метода нанопорового секвенирования.

Материалы и методы. Выделенная и очищенная стандартными методами ДНК двух пациентов была амплифицирована при помощи набора реагентов для 11-локусной мультиплексной амплификации генов HLA, полученные библиотеки были секвенированы при помощи нанопорового секвенатора «Нанопорус».

Результаты и заключение. Нами было проведено типирование HLA двух пациентов при помощи быстрого и высокопроизводительного нанопорового секвенирования на новой платформе «Нанопорус» и показана хорошая её применимость для данной задачи. Также нами был выявлен предполагаемый новый аллель для HLA-B в образце ДНК одного из двух пациентов.

Ключевые слова: HLA, генотипирование, нанопоровое секвенирование, NGS, полиморфизм

Для корреспонденции*: Ермаков Артем Михайлович, beoluchi@yandex.ru

IDENTIFICATION OF A NEW HLA-B ALLELE BY NANOPORE SEQUENCING ON THE PLATFORM OF THE PORTABLE NANOPORE SEQUENCER "NANOPORUS"

Ermakov AM^{1,2*}, Blagodatski AS², Filippova KO^{1,2}, Rudik DV³.

¹*Nanoporus LLC, 142201, Moscow region, Serpukhov, Sirenevaya str., 8; phone: +79165816980; e-mail: info@nanoporus.ru*

²*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, 142290, Moscow region, Pushchino, Institutskaya str., 3; phone: +7 (4967) 73-25-80; e-mail: office@iteb.ru*

³*JSC «BioChemMack Diagnostics», Moscow, Lomonosovsky Prospekt, 25, building 2 ; phone: +7 (495) 932-92-14; e-mail: seliverstova@bcmd.ru*

Summary.

Introduction. High-resolution typing of the human leukocyte antigen (HLA) locus is an important diagnostic procedure required for organ transplantation and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The latter is required for the treatment of a number of malignant and non-malignant diseases. The introduction of platforms that allow high-resolution HLA typing is an important biomedical task.

Objective of the study: to perform HLA typing of patients using a high-throughput nanopore sequencing method.

Materials and methods. The DNA of two patients, isolated and purified by standard methods, was amplified using a reagent kit for 11-locus multiplex amplification of HLA genes, the resulting libraries were sequenced using a “Nanoporus” nanopore sequencer.

Results and conclusion. We performed HLA typing of two patients using rapid and high-throughput nanopore sequencing on the new Nanoporus platform and demonstrated its good applicability for this objective. We also identified a putative new allele for HLA-B in the DNA sample of one of the two patients.

Keywords: HLA, genotyping, nanopore sequencing, NGS, polymorphism

For correspondence*: Ermakov Artem, beoluchi@yandex.ru

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) — это регенеративная терапия, при которой гемопоэтические стволовые клетки донора внедряются в костный мозг (КМ) реципиента и замещают его клетки, популяция которых истощена за счёт применения цитотоксичных препаратов, используемых при трансплантации для минимизации отторжения трансплантата [1]. При незлокачественных заболеваниях ТГСК

может играть роль лечения, направленного на замену дисфункционального КМ или отдельных типов его клеток полностью функциональной донорской гемопоэтической системой [1]. При гематологических злокачественных заболеваниях и солидных опухолях ТГСК является долгосрочной формой иммунотерапии, при которой иммунные клетки донора сдерживают распространение остаточных раковых клеток посредством распознавания их в качестве чужеродных мишеней, данное явление известно, как эффект «реакции трансплантата против лейкемии» (РТПЛ) [2]. После более чем шести десятилетий доклинических и клинических исследований ТГСК с 2020-х годов является широко используемой терапией, включенной в рекомендации медицинских профессиональных сообществ по всему миру, для широкого спектра гематологических злокачественных новообразований, таких как острые лимфобластные и миелоидные лейкозы, нарушений работы костного мозга, таких как тяжелая апластическая анемия, и генетических заболеваний, таких как мукополисахаридозы [3-5].

Комплекс генов человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA), расположен на коротком плече 6-й хромосомы в бр21.3, содержит набор высокополиморфных генов, отвечающих за кодирование белков главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) [6]. Молекулы МНС включают в себя гликопротеины классов I и II, которые связывают и представляют пептидные антигены рецепторам лимфоцитов. Молекулы класса I, экспрессируемые на поверхности всех ядродержащих клеток, представляют пептиды, полученные из внутриклеточных белков, цитотоксическим Т-клеткам CD8 и, таким образом, участвуют в защите от опухолей, вирусов и других внутриклеточных паразитов. Молекулы класса I также являются лигандами иммуноглобулин-подобных рецепторов (KIR) естественных клеток-киллеров (NK). Молекулы класса II, экспрессируемые в основном на поверхности специализированных антигенпрезентирующих клеток, представляют пептиды, полученные из внеклеточных белков, Т-клеткам CD4 и, таким образом, участвуют в защите от внеклеточных патогенов [7].

Типирование HLA, то есть, определение конкретного набора аллелей HLA, переносимых индивидуумом, имеет высокую клиническую значимость. Сочетание аллелей класса I и класса II, или HLA-генотип, персонализирует иммунный ответ индивидуума посредством трех процессов. Во-первых, учитывая большой полиморфизм генов HLA в человеческой популяции, пептидный репертуар, демонстрируемый молекулами HLA, сильно различается у разных людей [8]. Во-вторых, полиморфизм HLA влияет на репертуар Т-клеток, поскольку тимоциты подвергаются процессам отбора, которые требуют взаимодействия между рецепторами Т-клеток и комплексами пептид-HLA на антигенпрезентирующих клетках в тимусе [9, 10]. В-третьих, развитие и активность NK-

клеток частично контролируются взаимодействием расположенных на них рецепторов KIR с распознаваемыми ими, как лиганды молекулами HLA класса I [11, 12].

Клиническое типирование генов HLA используется в различных целях, среди которых трансплантация органов и обеспечение успешной аллогенной ТГСК. Соответствие HLA на уровне аллелей имеет решающее значение при трансплантации гемопоэтических клеток. При несоответствии аллелей HLA у донора и реципиента растёт риск не только первичной потери трансплантата, но и реакции «трансплантат против хозяина», вызванной иммунным ответом донора против реципиента. Оба процесса связаны с высокой заболеваемостью и смертностью [13].

Гены и аллели HLA называются в соответствии с номенклатурой факторов системы HLA Всемирной организации здравоохранения [14]. Каждый аллель HLA имеет уникальный номер, соответствующий максимум четырем наборам цифр или полей, разделенных двоеточиями. Типирование HLA может выполняться на разных уровнях разрешения в зависимости от клинической необходимости [15]. Типирование с низким разрешением определяет первое поле или серологический эквивалент. Основными методами такого типирования являются локус-специфическая ПЦР с последующей гибридизацией с зондами олигонуклеотидов, специфичных к последовательности (SSO), охватывающими полиморфные области, или ПЦР с использованием праймеров, специфичных к последовательности (SSP). Результат типирования с высоким разрешением определяется как набор аллелей, которые кодируют одну и ту же последовательность белка для сайта связывания антигена (экзоны 2 и 3 для молекул класса I и экзон 2 для молекул класса II) и который исключает аллели, которые не экспрессируются на поверхности клетки. Этот уровень разрешения используется для трансплантации гемопоэтических клеток [16]. Основными методами такого типирования являются ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру (SBT) или секвенированием нового поколения (NGS) [17].

Результаты типирования HLA, полученные с помощью SBT, могут быть неоднозначными из-за отсутствия фазирования последовательностей и непрактичности исследования всего гена целиком. Методы NGS позволяют фазировать полиморфизмы по всей длине гена HLA и являются высокопроизводительными, позволяя проводить типирование на уровне аллелей в клинических условиях [18]. В настоящее время типирование HLA совершается в основном при помощи таких методов NGS, как Illumina или Ion Torrent [19]. Однако в последние годы всё большую популярность приобретает такой метод NGS, как нанопоровое секвенирование. Нанопоровое секвенирование представляет собой инновационный метод секвенирования нового поколения, который имеет ряд преимуществ перед другими используемыми сейчас в диагностике методами NGS. К этим

преимуществам относятся большая длина прочтений, высокая скорость секвенирования, минимальные требования к оборудованию и быстрая пробоподготовка, что делает этот метод более доступным и удобным для использования в различных лабораторных условиях [20, 21].

Цель исследования – проведение HLA-типирования двух пациентов при помощи нанопорового секвенирования на платформе Нанопорус и демонстрация возможности метода для быстрого определения генотипа комплекса гистосовместимости.

Материалы и методы

Образцы биоматериала

ДНК двух пациентов была выделена, очищена и предоставлена коллегами из ФГБУ "НМИЦ Гематологии" Минздрава России. Образцы собирали согласно действующему законодательству, пациенты подписывали добровольное информированное согласие на использование биологического материала в исследовательских целях.

Создание библиотек и пробоподготовка

Использовался набор реагентов NGS-Turbo (GenDx, Нидерланды) в составе: - NGS-Turbo Amp для 11-локусной мультиплексной амплификации генов HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, DRB1 и DRB3/4/5) - NGS-Turbo®Prep - для приготовления библиотек. Для подготовки библиотеки ампликонов к секвенированию использовали набор для лигирования v14 (SQK-LSK114, Oxford Nanopore, Великобритания).

Пробоподготовку проводили по протоколу к набору. Для этого вначале проводили амплификацию генов HLA с тремя различными наборами праймеров, специфичными к разным локусам (Рисунок 1). На амплификацию использовали 4 нг геномной ДНК. Затем реакционную смесь с продуктами ПЦР очищали магнитными частицами AMPure XP (Beckman Coulter, США), удаляли супернатант и промывали, после чего добавляли смесь реагентов для достраивания поли-А хвостов. Затем продукты ПЦР очищали магнитными частицами AMPure XP (Beckman Coulter, США) из реакционной смеси 2.5 мин при комнатной температуре, промывали и наносили смесь реагентов для лигирования адаптеров для секвенирования. С данной смесью образцы инкубировали 10 мин, после чего промывали буфером SFB из набора SQK-LSK114 и элюировали с магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter, США) для последующего секвенирования.

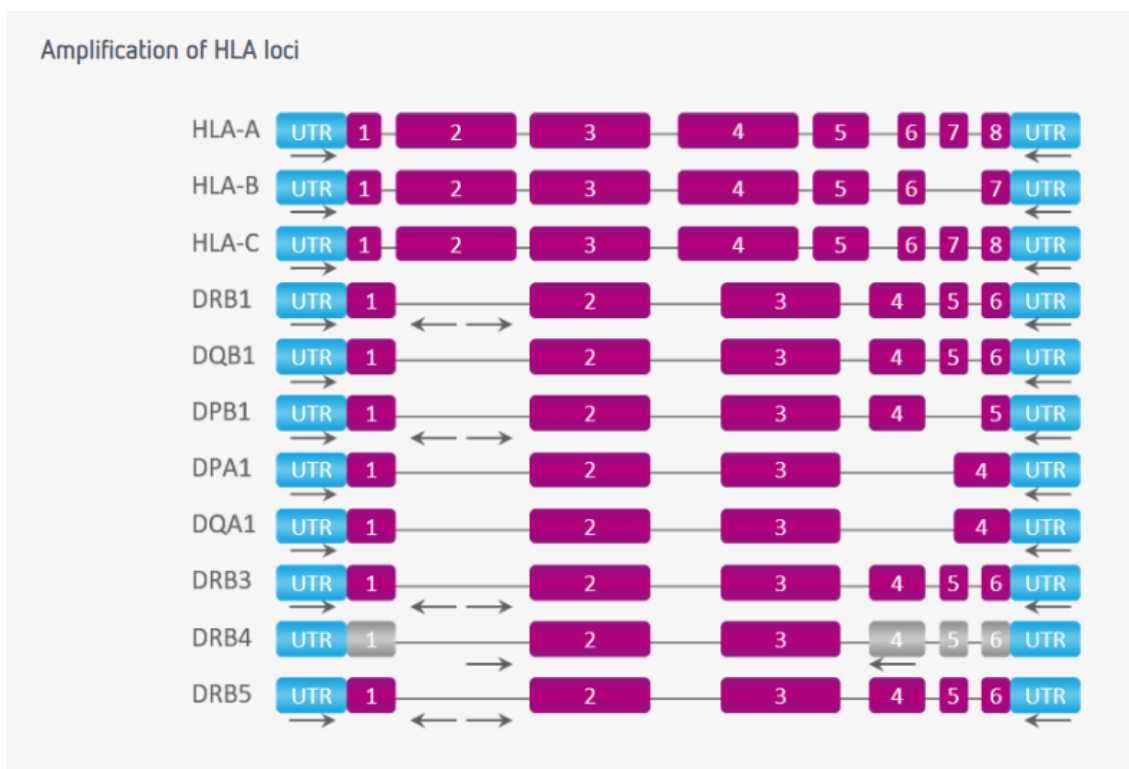


Рисунок 1. Схема расположения праймеров при амплификации 11 локусов HLA.

Нанопоровое секвенирование

Секвенирование генов HLA производили на нанопоровом секвенаторе «Нанопорус» (ООО «Нанопорус», Россия) с использованием оригинальной реагентки Ligation Sequencing Kit V14 (SQK-LSK114, Oxford Nanopore, Великобритания), ячейки FLO-MIN114 (Oxford Nanopore, Великобритания). Для управления секвенатором использовали программное обеспечение MinKNOW v.23.07.15, бейзколинг выполняли с использованием модели dna_r10.4.1_e8.2_400bps_sup@v4.3.0. Для каждого образца собирали порядка 10000 ридов с качеством прочтений $Q > 10$.

Анализ полученных данных

Оценку качества прочтений проводили с помощью программы NanoPlot. Полученные при секвенировании результаты анализировали при помощи программного обеспечения NGSengine-Turbo 1.1.0 и базы данных IMGT/HLA database 3.54.

Результаты и обсуждение

В результате секвенирования нами было получено порядка 12 000 ридов для первого образца ДНК и порядка 13 000 для второго образца ДНК с качеством прочтений $Q > 10$. Модальное значение качества прочтений составляло Q14, медианное значение Q15,4 (Рисунок 2). Полученные первичные данные секвенирования отвечают всем необходимым требованиям для проведения дальнейшего биоинформатического анализа.

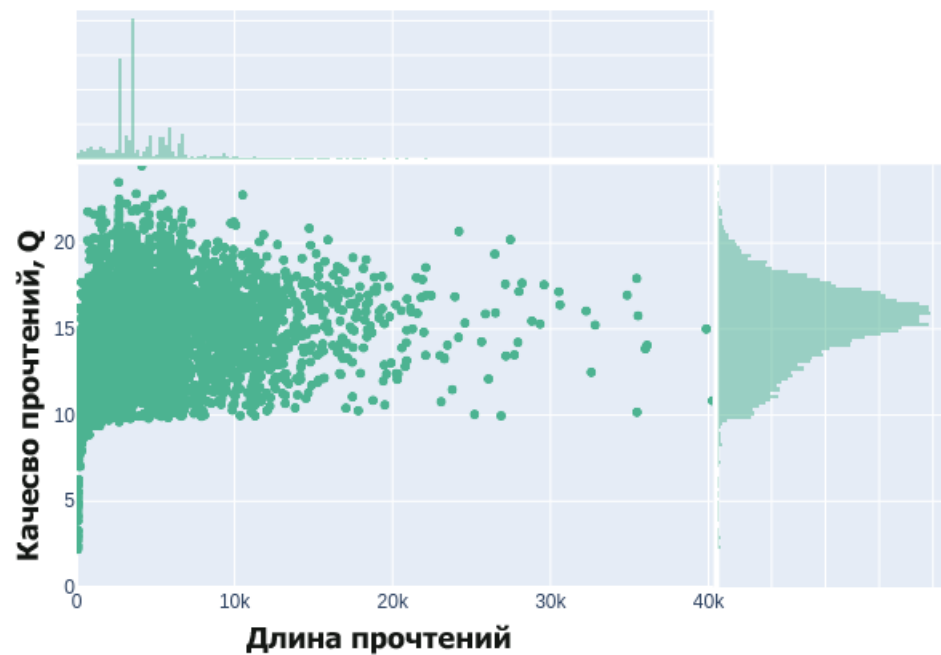


Рисунок. 2. Распределение прочтений по длине и качеству.

Мы проанализировали полученные в ходе нанопорового секвенирования образцов библиотек HLA двух пациентов данные с помощью пакета программ NGSengine-Turbo 1.1.0 и базы данных IMGT/HLA 3.54. В целом, показатели качества полученных данных выглядели очень хорошо. Мы обнаружили низкий уровень шума, хорошую глубину прочтения и высокую картируемость.

При тщательном изучении HLA-A в обоих образцах NGSengine-Turbo показал предупреждение (красный фон) для шума и дельта-шума для сигнала (Рисунок 3).

Resolution: All fields		Quality metrics: All combined											
Locus	Map	Region	LRD	#HP	Noise	ΔSN	ESA	MM	?	IMGT	BMG		
[J] FAX12645_pass_7557be90_20347266_0													
 HLA-A	94%	Core+	1082	32	14.0%	28%	44%	0					
		Exon+	1068	46	34.8%	7%	45%	0	3.54.0	>10			A*11:01:01:01, A*24:02:01:01
		Amplicon	1068	89	34.8%	5%	45%	0					

Рисунок 3. Показатели шума и дельта-шума для образца первого пациента.

Однако данное предупреждение является ожидаемым артефактом. Он появляется благодаря наличию в экзоне 4 HLA-A гомополимерной области (Рисунок 4).

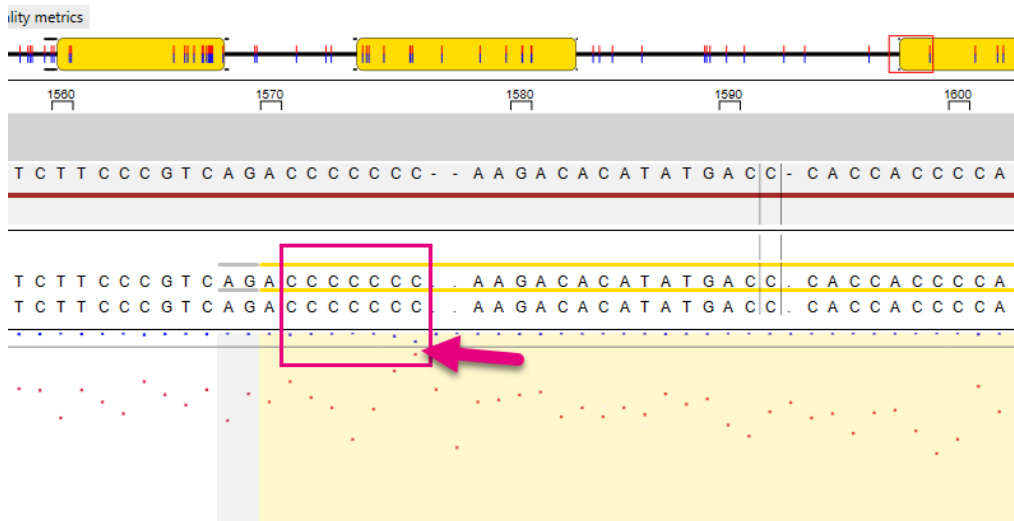


Рисунок 4. Гомополимерная (поли-С) область в четвёртом экзоне HLA-A, вызывающая артефактное повышение шума

Кроме того, при тщательном изучении HLA-B в образце 2 при помощи программы NGSengine-Turbo было выявлено несовпадение в области core-региона гена (Рисунок 5).



Рисунок 5. Несоответствие в области core-региона гена в образце 2.

Это несоответствие находится в области gDNA в позиции 819 в экзоне 3. В этой позиции обе референтные последовательности из базы данных содержат «С», тогда как по нашим данным там представлены «С» и «Т». Эти нуклеотиды распределены между разными прочтениями примерно в пропорции 50% на 50% (Рисунок 6).

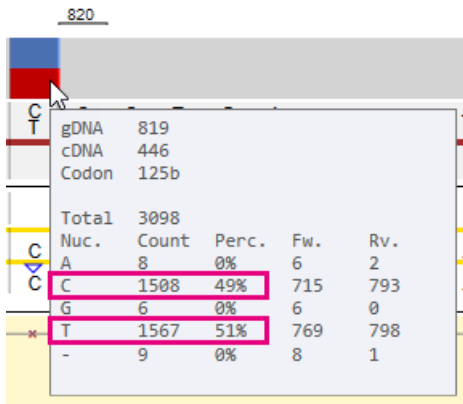


Рисунок 6. «С» или «Т» встречаются в равной пропорции в разных прочтениях в области gDNA в позиции 819 в экзоне 3 HLA-B.

Более детальный анализ прочтений позволил выявить, что все прочтения с нуклеотидом «Т» относятся исключительно к аллелю 2 (В*08:01:01:01). Более того, все нуклеотиды «Т» показывают высокое значение показателя QV (выше 10), тем самым исключая, что этот нуклеотид является результатом артефакта секвенирования.

Кроме того, мы провели анализ таблиц фазирования с правой и левой стороны от несоответствия (Рисунок 7).

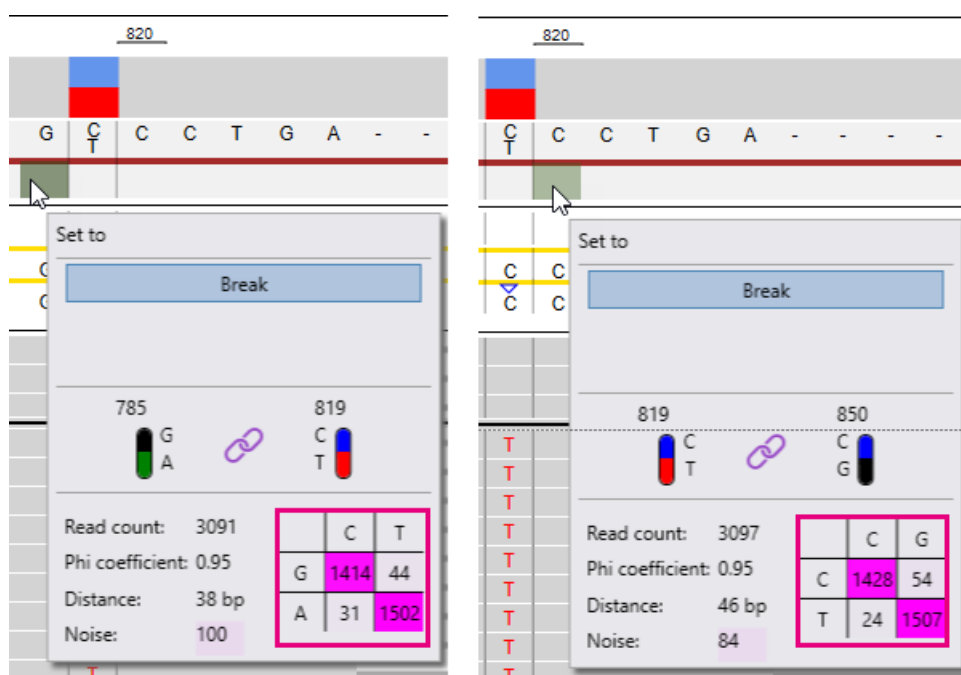


Рисунок 7. Таблицы фазирования с правой и левой стороны от несоответствия в позиции 819 в экзоне 3 HLA-B.

Таблицы фазирования содержат четкий диагональный паттерн (Рисунок 7, выделено розовым), подтверждающий, что это действительно несоответствие.

В целом наши наблюдения показывают, что нами обнаружена точечная мутация в области gDNA в позиции 819 в экзоне 3 HLA-B у пациента 1. Данная мутация приводит к изменению кодона с аланина ('GCC') на валин ('GTC'). Таким образом, нами выявлен предполагаемый новый аллель для HLA-B в образце ДНК данного пациента.

Заключение

Семейство генов главного комплекса гистосовместимости (МНС) кодирует классические человеческие лейкоцитарные антигены (HLA), которые, как известно, важны при трансплантации как органов, так и гемопоэтических стволовых клеток [22, 23], а также при иммунном ответе на инфекционные заболевания (например, ВИЧ, гепатит С, цитомегаловирусную инфекцию) [24], аутоиммунных заболеваниях (например, диабете,

ревматоидном артрите, целиакии) [25] и реакциях гиперчувствительности к лекарственным препаратам [26]. Процесс идентификации аллелей HLA эволюционировал от серологических методов до более современных методов на основе анализа ДНК, таких как RFLP, PCR-SSO, PCR-SSP и типирование на основе секвенирования по Сэнгеру (SSBT) [27, 28]. Сегодня секвенирование ДНК является золотым стандартом для типирования HLA во всем мире и является хорошо оптимизированным, надежным и эффективным методом, способным обнаруживать и идентифицировать оба аллеля в 6 основных локусах (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 и -DPB1). За прошедшие десятилетия в мире секвенирования ДНК произошла драматическая революция. Начиная с выпуска в 2005 году секвенатора 454/GS-FLX (Roche Diagnostics), появился совершенно новый подход, известный как секвенирование следующего поколения (NGS). Наблюдался большой рост в разработке и эксплуатации новых секвенаторов ДНК, в основном в исследовательском мире, а затем и в рутинной роли в диагностических лабораториях.

Быстрый прогресс в технологиях NGS затронул также и типирование HLA для исследовательских и медицинских целей. Было продемонстрировано, что NGS может успешно применяться в данной области и обеспечивать однопроходное типирование на уровне аллелей с минимальным количеством неоднозначностей. NGS преодолевает неоднозначности за счет сочетания клональной амплификации, которая обеспечивает последовательность на одной фазе и высокий уровень параллелизма, в результате чего производятся миллионы прочтений секвенирования, что позволяет расширить секвенированные регионы HLA [18]. Новые и улучшенные методы подготовки образцов и программное обеспечение позволили разработать экономически эффективные, простые в исполнении методы типирования HLA с использованием NGS [29, 30].

Нанопоровое секвенирование представляет собой инновационный метод секвенирования нового поколения, который имеет несколько преимуществ перед другими используемыми сейчас в типировании HLA методами. Одним из основных преимуществ нанопорового секвенирования является возможность получения прочтений значительно большей длины по сравнению с другими методами секвенирования. Это позволяет более быстро и точно исследовать анализируемую последовательность, а также обнаруживать её сложные изменения, такие, как хромосомные aberrации. Также нанопоровое секвенирование значительно сокращает время, необходимое для проведения секвенирования, что весьма критично в случаях, когда необходима оперативная диагностика заболевания и быстрое назначение лечения. Ещё одним преимуществом метода являются минимальные требования к оборудованию и быстрая пробоподготовка. Так, используемый нами набор реагентов NGS-

Turbo® разработан для HLA-типирования в ситуациях, когда время является критическим фактором и требует менее трёх часов для выполнения всей процедуры.

Наша работа показала хорошую применимость платформы для нанопорового секвенирования «Нанопорус» для быстрого типирования HLA в клинических и лабораторных условиях. Также нами был выявлен предполагаемый новый аллель для HLA-B в образце ДНК одного из двух пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bettinotti M.P. Evolution of HLA testing for hematopoietic stem cell transplantation: Importance of the candidate's antibody profile for donor selection. *Human Immunology*. 2022; 83: 721-9.
2. Kolb H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008; 112: 4371-83.
3. Kanate A.S., Majhail N.S., Savani B.N., Bredeson C., Champlin R.E., Crawford S., Giralt S.A., LeMaistre C.F., Marks D.I., Omel J.L. Indications for hematopoietic cell transplantation and immune effector cell therapy: guidelines from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2020; 26: 1247-56.
4. Duarte R.F., Labopin M., Bader P., Basak G.W., Bonini C., Chabannon C., Corbacioglu S., Dreger P., Dufour C., Gennery A.R. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone marrow transplantation*. 2019; 54: 1525-52.
5. Zhang X-h., Chen J., Han M-Z., Huang H., Jiang E.-l., Jiang M, Lai Y-r., Liu D-h., Liu Q-F., Liu T. The consensus from The Chinese Society of Hematology on indications, conditioning regimens and donor selection for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 2021 update. *Journal of hematology & oncology*. 2021; 14: 1-20.
6. Horton R., Wilming L., Rand V., Lovering R.C., Bruford E.A., Khodiyar V.K., Lush M.J., Povey S., Talbot Jr. C.C., Wright M.W. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5: 889-99.
7. Kelly A., Trowsdale J.. Introduction: MHC/KIR and governance of specificity. *Immunogenetics*. 2017; 69: 481-8.
8. Spencer C.T., Bezbradica J.S., Ramos M.G., Arico C.D., Conant S.B., Gilchuk P., Gray J.J., Zheng M., Niu X., Hildebrand W. Viral infection causes a shift in the self peptide repertoire presented by human MHC class I molecules. *PROTEOMICS–Clinical Applications*. 2015; 9: 1035-52.

9. Starr T.K., Jameson S.C., Hogquist K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology*. 2003; 21: 139-76.
10. Jenkins M.K., Moon J.J. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *The Journal of Immunology*. 2012; 188: 4135-40.
11. Anfossi N., André P., Guia S., Falk C.S., Roetynck S., Stewart C.A., Bresó V., Frassati C., Reviron D., Middleton D. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006; 25: 331-42.
12. Hilton H.G., Parham P. Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize HLA-C. *Immunogenetics*. 2017; 69: 567-79.
13. Bettinotti M.P., Ferriola D., Duke J.L., Mosbrugger T.L., Tairis N., Jennings L., Kalman L.V., Monos D.. Characterization of 108 Genomic DNA Reference Materials for 11 Human Leukocyte Antigen Loci: A GeT-RM Collaborative Project. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2018; 20: 703-15.
14. Marsh S.G., Albert E., Bodmer W., Bontrop R., Dupont B., Erlich H., Fernández-Viña M., Geraghty D., Holdsworth R., Hurley C. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue antigens*. 2010; 75: 291.
15. Nunes E., Heslop H., Fernandez-Vina M., Taves C., Wagenknecht D.R., Eisenbrey A.B., Fischer G., Poulton K., Wacker K., Hurley C.K. Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2011; 118: e180-e3.
16. Howard C.A., Fernandez-Vina M.A., Appelbaum F.R., Confer D.L., Devine S.M., Horowitz M.M., Mendizabal A., Laport G.G., Pasquini M.C., Spellman S.R. Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: consensus opinion of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015; 21: 4-7.
17. Latham K., Little A-M., Madrigal J.A. An overview of HLA typing for hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow and Stem Cell Transplantation*. 2014: 73-85.
18. Duke J., Lind C., Mackiewicz K., Ferriola D., Papazoglou A., Gasiewski A., Heron S., Huynh A., McLaughlin L., Rogers M. Determining performance characteristics of an NGS-based HLA typing method for clinical applications. *Hla*. 2016; 87: 141-52.
19. Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 251364.
20. Chen P., Sun Z., Wang J., Liu X., Bai Y., Chen J., Liu A., Qiao F., Chen Y, Yuan C., Sha J., Zhang J., Xu L.Q. Portable nanopore-sequencing technology: Trends in development and applications. *Front Microbiol*. 2023; 14: 1043967.

21. van Dijk E.L., Jaszczyszyn Y., Naquin D., Thermes C.. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* 2018; 34: 666-81.
22. Eapen M., Rubinstein P., Zhang M.J., Stevens C., Kurtzberg J., Scaradavou A., Loberiza F.R., Champlin R.E., Klein J.P., Horowitz M.M., Wagner J.E. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet.* 2007; 369: 1947-54.
23. Lee S.J., Klein J., Haagenson M., Baxter-Lowe L.A., Confer D.L., Eapen M., Fernandez-Vina M., Flomenberg N., Horowitz M., Hurley C.K., Noreen H., Oudshoorn M., Petersdorf E. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood.* 2007; 110: 4576-83.
24. Gao X., Bashirova A., Iversen A.K., Phair J., Goedert J.J., Buchbinder S., Hoots K., Vlahov D., Altfeld M., O'Brien S.J., Carrington M. AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat Med.* 2005; 11: 1290-2.
25. Lie B.A., Thorsby E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17: 526-31.
26. Mallal S., Nolan D., Witt C., Masel G., Martin A.M., Moore C., Sayer D., Castley A., Mamotte C., Maxwell D., James I., Christiansen F.T. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet.* 2002; 359: 727-32.
27. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens.* 2012; 80: 1-11.
28. Dunn P.P. Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. *Int J Immunogenet.* 2011; 38: 463-73.
29. Lange V., Böhme I., Hofmann J., Lang K., Sauter J., Schöne B., Paul P., Albrecht V., Andreas J.M., Baier D.M., Nething J., Ehninger U., Schwarzelt C. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics.* 2014; 15: 63.
30. Ozaki Y., Suzuki S., Kashiwase K., Shigenari A., Okudaira Y., Ito S., Masuya A., Azuma F., Yabe T., Morishima S., Mitsunaga S., Satake M., Ota M., et al. Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing. *BMC Genomics.* 2015; 16: 318.

References

1. Bettinotti M.P. Evolution of HLA testing for hematopoietic stem cell transplantation: Importance of the candidate's antibody profile for donor selection. *Human Immunology.* 2022; 83: 721-9.

2. Kolb H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008; 112: 4371-83.
3. Kanate A.S., Majhail N.S., Savani B.N., Bredeson C., Champlin R.E., Crawford S., Giralt S.A., LeMaistre C.F., Marks D.I., Omel J.L. Indications for hematopoietic cell transplantation and immune effector cell therapy: guidelines from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2020; 26: 1247-56.
4. Duarte R.F., Labopin M., Bader P., Basak G.W., Bonini C., Chabannon C., Corbacioglu S., Dreger P., Dufour C., Gennery A.R. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone marrow transplantation*. 2019; 54: 1525-52.
5. Zhang X-h., Chen J., Han M-Z., Huang H., Jiang E.-l., Jiang M, Lai Y-r., Liu D-h., Liu Q-F., Liu T. The consensus from The Chinese Society of Hematology on indications, conditioning regimens and donor selection for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 2021 update. *Journal of hematology & oncology*. 2021; 14: 1-20.
6. Horton R., Wilming L., Rand V., Lovering R.C., Bruford E.A., Khodiyar V.K., Lush M.J., Povey S., Talbot Jr. C.C., Wright M.W. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5: 889-99.
7. Kelly A., Trowsdale J.. Introduction: MHC/KIR and governance of specificity. *Immunogenetics*. 2017; 69: 481-8.
8. Spencer C.T., Bezbradica J.S., Ramos M.G., Arico C.D., Conant S.B., Gilchuk P., Gray J.J., Zheng M., Niu X., Hildebrand W. Viral infection causes a shift in the self peptide repertoire presented by human MHC class I molecules. *PROTEOMICS–Clinical Applications*. 2015; 9: 1035-52.
9. Starr T.K., Jameson S.C., Hogquist K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology*. 2003; 21: 139-76.
10. Jenkins M.K., Moon J.J. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *The Journal of Immunology*. 2012; 188: 4135-40.
11. Anfossi N., André P., Guia S., Falk C.S., Roetynck S., Stewart C.A., Bresó V., Frassati C., Reviron D., Middleton D. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006; 25: 331-42.
12. Hilton H.G., Parham P. Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize HLA-C. *Immunogenetics*. 2017; 69: 567-79.
13. Bettinotti M.P., Ferriola D., Duke J.L., Mosbrugger T.L., Tairis N., Jennings L., Kalman L.V., Monos D.. Characterization of 108 Genomic DNA Reference Materials for 11 Human

- Leukocyte Antigen Loci: A GeT-RM Collaborative Project. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2018; 20: 703-15.
14. Marsh S.G., Albert E., Bodmer W., Bontrop R., Dupont B., Erlich H., Fernández-Viña M., Geraghty D., Holdsworth R., Hurley C. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue antigens*. 2010; 75: 291.
15. Nunes E., Heslop H., Fernandez-Vina M., Taves C., Wagenknecht D.R., Eisenbrey A.B., Fischer G., Poulton K., Wacker K., Hurley C.K. Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2011; 118: e180-e3.
16. Howard C.A., Fernandez-Vina M.A., Appelbaum F.R., Confer D.L., Devine S.M., Horowitz M.M., Mendizabal A., Laport G.G., Pasquini M.C., Spellman S.R. Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: consensus opinion of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015; 21: 4-7.
17. Latham K., Little A-M., Madrigal J.A. An overview of HLA typing for hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow and Stem Cell Transplantation*. 2014: 73-85.
18. Duke J., Lind C., Mackiewicz K., Ferriola D., Papazoglou A., Gasiewski A., Heron S., Huynh A., McLaughlin L., Rogers M. Determining performance characteristics of an NGS-based HLA typing method for clinical applications. *Hla*. 2016; 87: 141-52.
19. Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 251364.
20. Chen P., Sun Z., Wang J., Liu X., Bai Y., Chen J., Liu A., Qiao F., Chen Y., Yuan C., Sha J., Zhang J., Xu L.Q. Portable nanopore-sequencing technology: Trends in development and applications. *Front Microbiol*. 2023; 14: 1043967.
21. van Dijk E.L., Jaszczyszyn Y., Naquin D., Thermes C.. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet*. 2018; 34: 666-81.
22. Eapen M., Rubinstein P., Zhang M.J., Stevens C., Kurtzberg J., Scaradavou A., Loberiza F.R., Champlin R.E., Klein J.P., Horowitz M.M., Wagner J.E. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*. 2007; 369: 1947-54.
23. Lee S.J., Klein J., Haagenson M., Baxter-Lowe L.A., Confer D.L., Eapen M., Fernandez-Vina M., Flomenberg N., Horowitz M., Hurley C.K., Noreen H., Oudshoorn M., Petersdorf E. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007; 110: 4576-83.

24. Gao X., Bashirova A., Iversen A.K., Phair J., Goedert J.J., Buchbinder S., Hoots K., Vlahov D., Altfeld M., O'Brien S.J., Carrington M. AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat Med.* 2005; 11: 1290-2.
25. Lie B.A., Thorsby E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17: 526-31.
26. Mallal S., Nolan D., Witt C., Masel G., Martin A.M., Moore C., Sayer D., Castley A., Mamotte C., Maxwell D., James I., Christiansen F.T. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet.* 2002; 359: 727-32.
27. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens.* 2012; 80: 1-11.
28. Dunn P.P. Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. *Int J Immunogenet.* 2011; 38: 463-73.
29. Lange V., Böhme I., Hofmann J., Lang K., Sauter J., Schöne B., Paul P., Albrecht V., Andreas J.M., Baier D.M., Nething J., Ehninger U., Schwarzelt C. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics.* 2014; 15: 63.
30. Ozaki Y., Suzuki S., Kashiwase K., Shigenari A., Okudaira Y., Ito S., Masuya A., Azuma F., Yabe T., Morishima S., Mitsunaga S., Satake M., Ota M., et al. Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing. *BMC Genomics.* 2015; 16: 318.