IMMUNOLÓGIAI ÉS BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZET

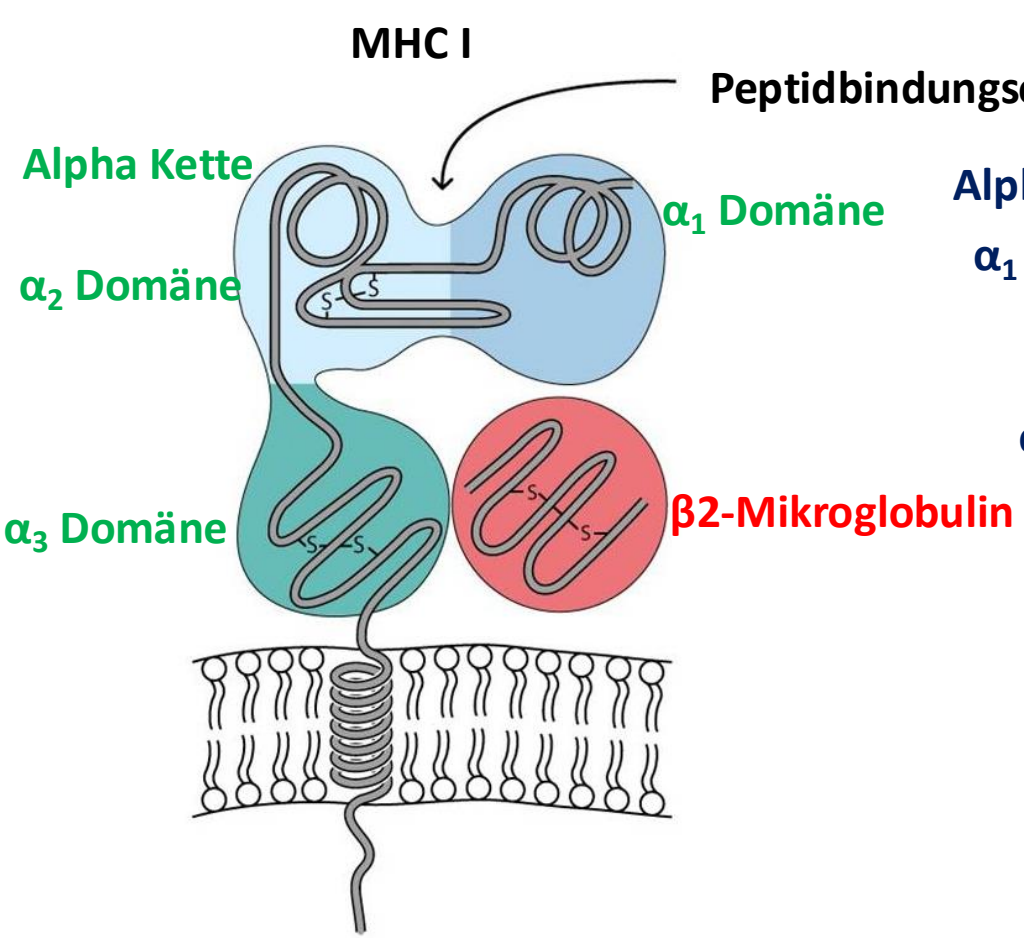
11. Praktikum: HLA Typisierung

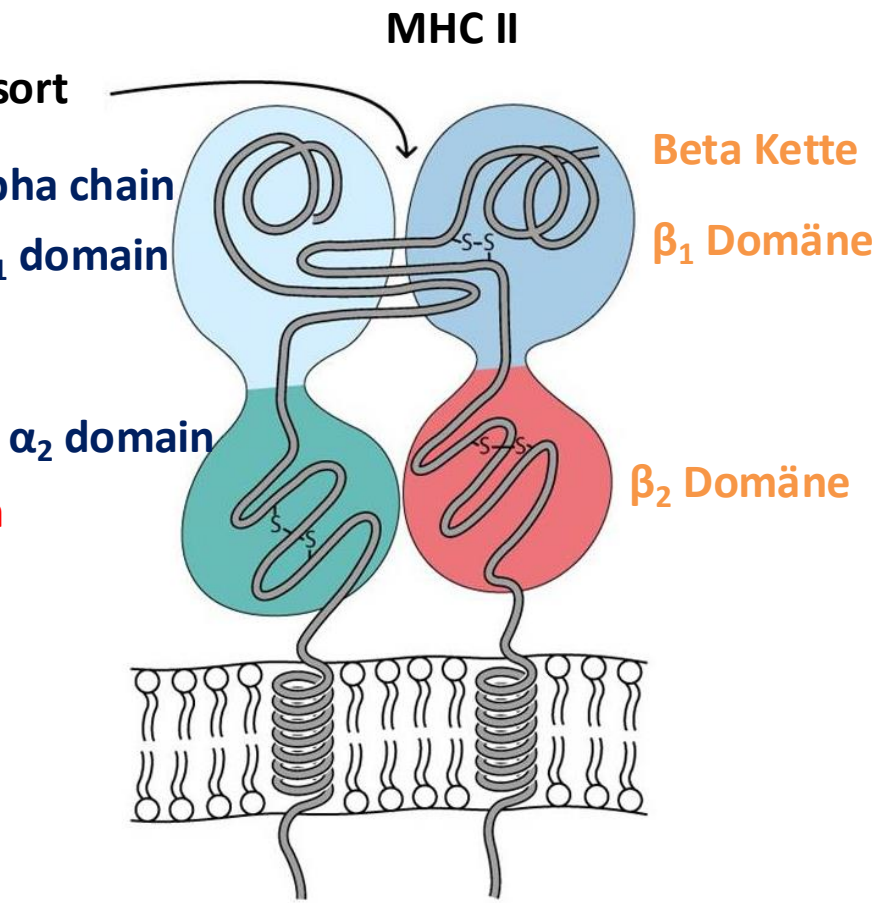
Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie

Pécs, 2026.

Grundlagen der HLA Typisierung I.

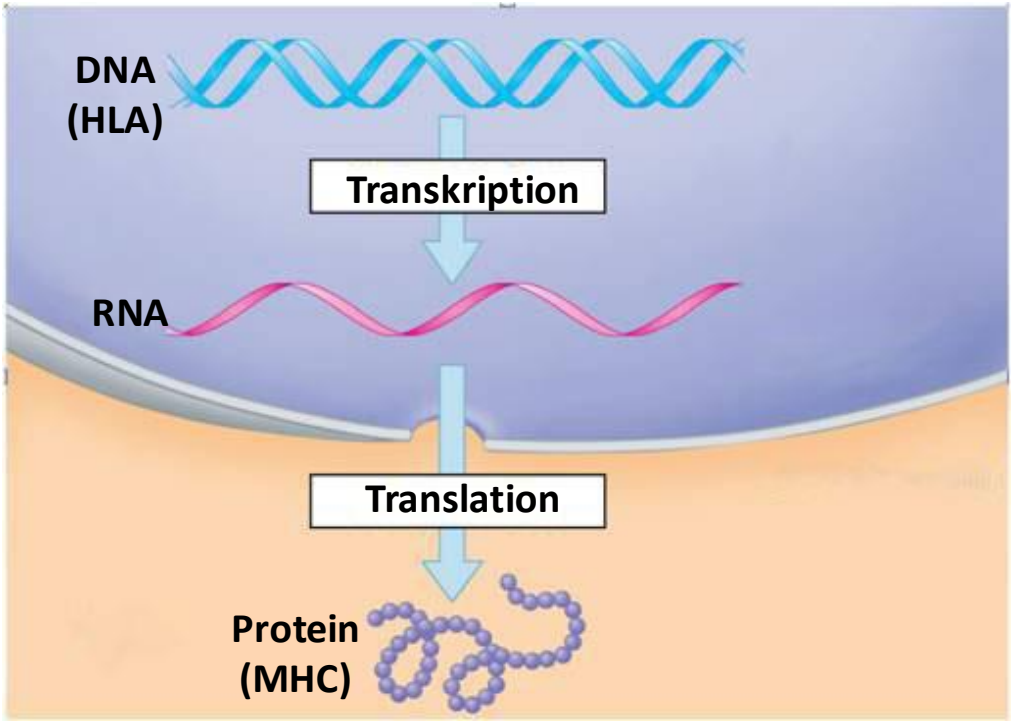


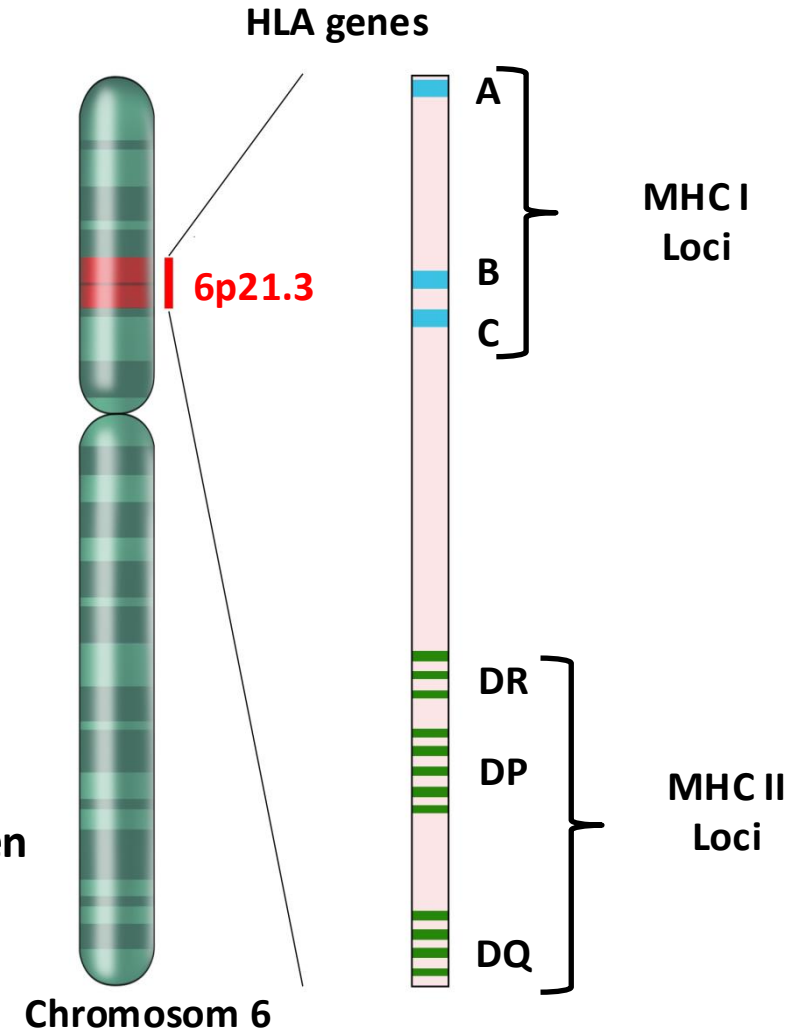


Auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten!

Auf Antigenpräsentierenden Zellen! (z.B. Makrophagen, Dendritische Zellen, B Zellen)

Grundlagen der HLA Typisierung II.





HLA (Humanes Leukozyten Antigen) → Kodierendes **Gen**
MHC (Major Histokompatibilitäts Komplex) → **Protein**

Im Menschen werden HLA-A, B, C, DQ, DR, und DP sowohl von väterlichen und mütterlichen Kromosomen gleichzeitig exprimiert → **Viele MHC Typen auf den Zellen.**

Erblichkeit der HLAs

- **Polygen**: Mehrere Gene kodieren MHC I und MHC II Moleküle. (z.B. HLA-A, B und C Typ I MHCs und DP, DQ und DR Typ II MHCs)
- **Polymorph**: Es gibt viele verschiedene Allele für jedes Gen in der Bevölkerung, deswegen ist es sehr variabel.
- **Kodominant**: Beide (mütterliche und väterliche) Allele werden gleichzeitig exprimiert.

↓

Jeder Mensch hat einen Charakteristischen **MHC Pool** mit verschiedenen Peptidbindenden Fähigkeiten.

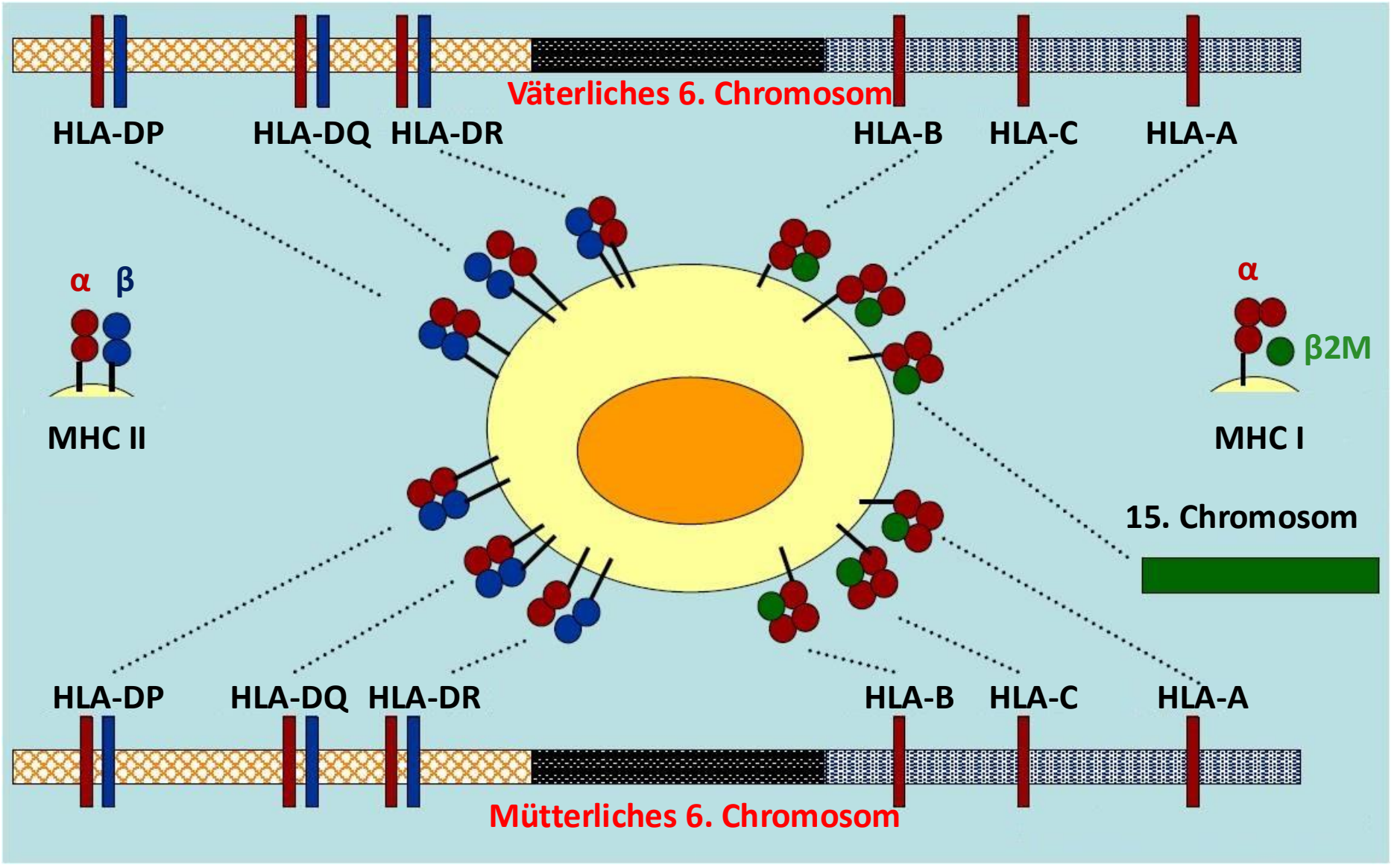
HLA Typisierung
(Bestimmung des MHC Pools einer Person)

↙ ↘

Serologisch
(durch immunogenität der MHC Proteine)

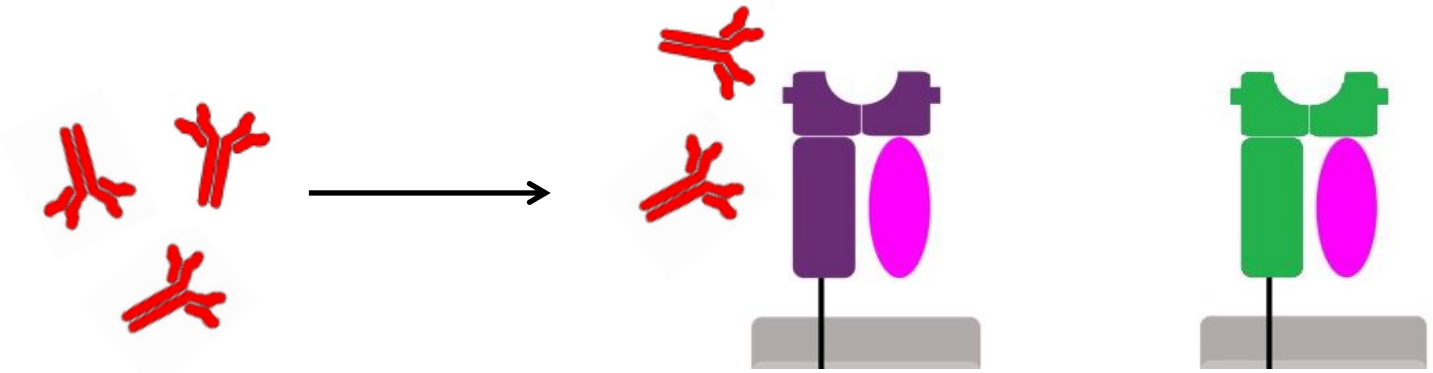
Genetisch
(Durch Identifikation der HLA Allele)

Kodominante Expression



HLA Serotyp vs Genotyp

- HLA **Serotyp**: MHC Moleküle werden anhand ihrerer Antigenität unterschieden. Z.B.:



Anti-HLA-B27 Antikörper | **HLA-B27** | **HLA-A2**

- HLA **Genotyp**: MHC Moleküle werden durch die Identifizierung **kodierenden HLA Allele** unterschieden. Ein anderer Genotyp bedeutet nicht zwangsläufig einen anderen Serotyp, **es gibt mehr Allele als HLA Serotypen.** (6959 HLA Allele waren 2010 bekannt, aber es werden jedes Jahr mehr. → Polymorphismus)

HLA Nomenklatur

2. **Locus (A1 = kodiert alpha Kette, B1= kodiert beta Kette)**

HLA-DQA1:05:01

3. **Zu welcher serologischen Gruppe gehört die Kette? (05 = Allele resultieren in einer α^5 Kette)**

1. **Welcher MHC Typ wird kodiert? z.B.: A, B, C, DQ, DR, DP**

4. **Das spezifische Allel der Gruppe**

- **MHC I** hat nur **1 Kette**, z.B.: **HLA-B*27:01** → B Typ MHC I der serologischen Gruppe 27
- **MHC II** ist ein **Heterodimer** mit 2 Ketten. Beispiel:

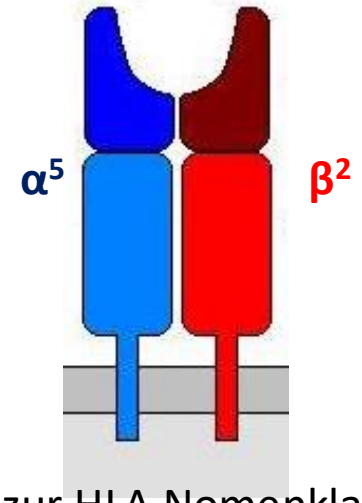
Im Fall der DQ Typ MHCs wird die Antigenität durch die Beta Kette bestimmt, DQ2 ist ein DQ Typ MHC II mit einer β^2 Kette, deswegen:

Benötigt **HLA-DQB1*02** Allelgruppe

Mehrere Subtypen existieren abhängig von der alpha Kette, z.B.:

HLA-DQA1*05:01 + HLA-DQB1*02:01 = **HLA-DQ2.5** ⟶

HLA-DQA1*02:01 + HLA-DQB1*02:02 = HLA-DQ2.2



Wichtig! Die Folie dient nur der Illustration, wir stellen keine Fragen zur HLA Nomenklatur.

Methoden der HLA Typisierung

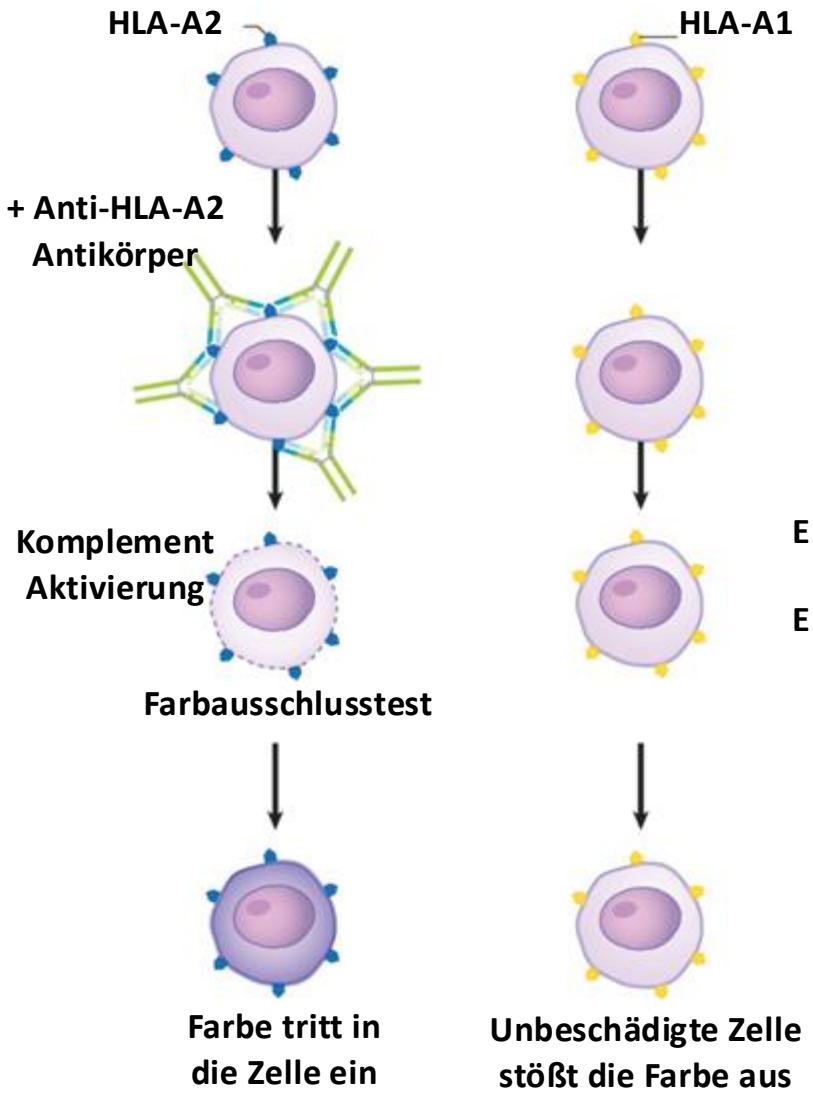
- **Serologische Methoden**:
  - Mikrozytotoxizitäts Assay (MCA)
  - Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

- **Molekular biologische Methoden**: (→ siehe molekulare Zellbiologie)
  - Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (RFLP)
  - Sequenzspezifische Oligonukleotid Sonden (SSOP) → DNA Hybridisierung
  - **Sequenzspezifische Primer → SSP-PCR**
  - DNA-Sequenzierung

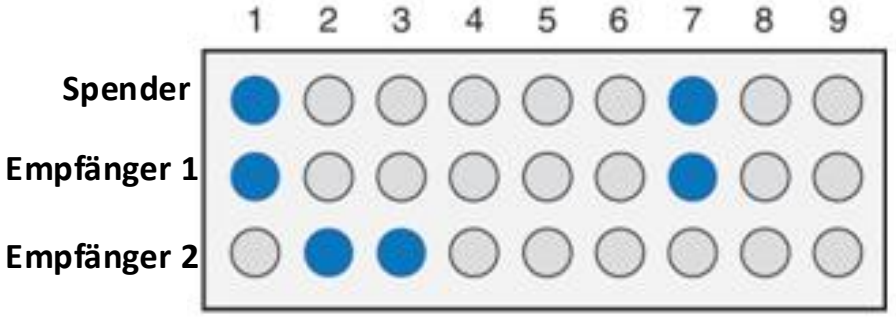
Die **Molekularbiologischen Methoden** werden bevorzugt da sie … sind:

- **Spezifischer** (klar definierte Sonden werden genutzt)
- **Flexibler** (Neue oligonukleotid Sonden oder Primer können entwickelt werden sobald ein neues Allel beschrieben wird)
- **Zuverlässiger** (Brauchen keinen spezifischen Zelltyp und sind weniger abhängig vom Zustand des Patienten)

Mikrozytotoxizitäts Assay (MCA)

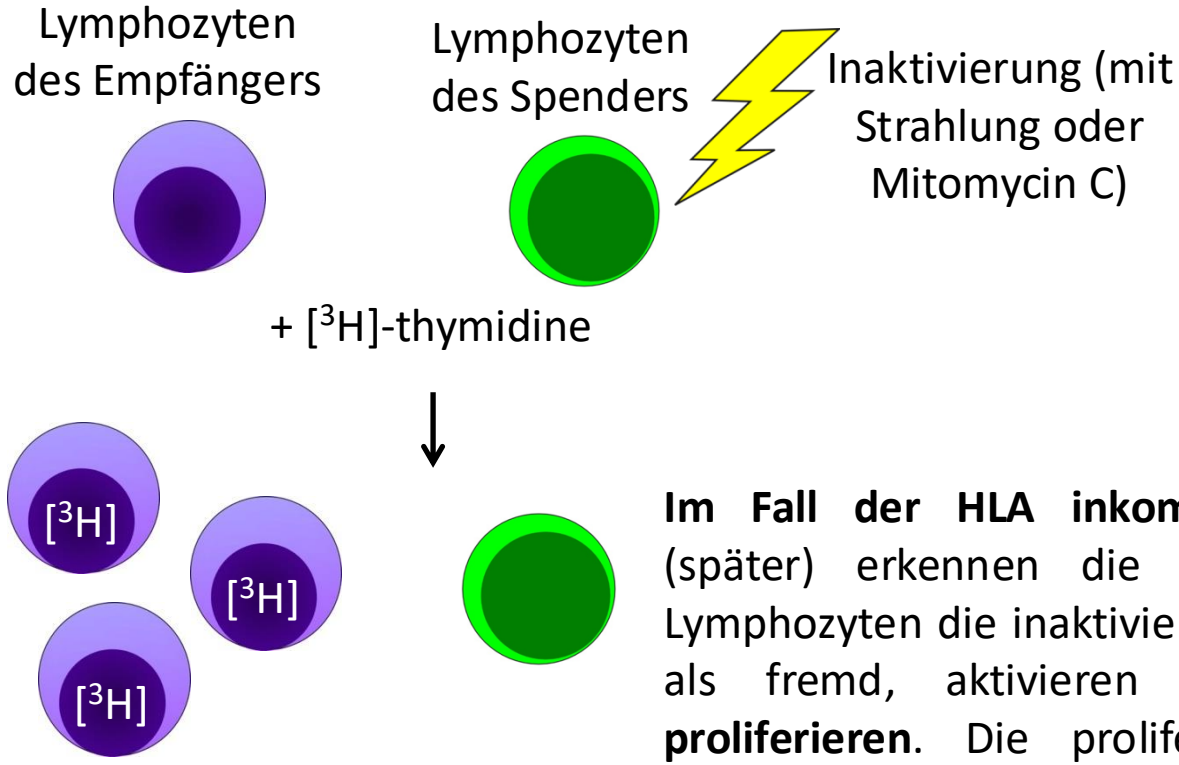


Wird genutzt um **Immunologische Inkompatibilität** des Spenders und des Empfängers vor Transplantationen auszuschließen. Z.B..:



Der Spender und Empfänger 1 passen auf basis des serologischen Tests zueinander.

Gemischte Lymphozytenkultur (Erinnerung)

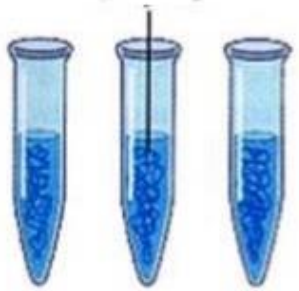


Im Fall der HLA inkompatibilität (später) erkennen die getesteten Lymphozyten die inaktivierten Zellen als fremd, aktivieren sich und **proliferieren**. Die proliferierenden Zellen **bauen das markierte Thymidin in ihre DNA ein**.

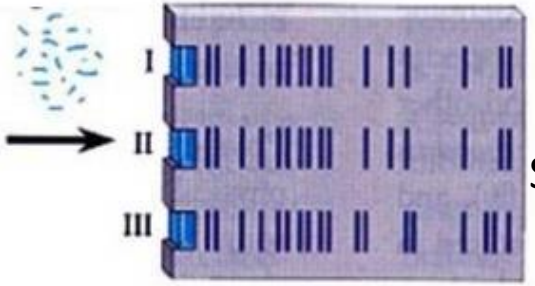
Anwendung:
Um **immunologische Inkompatibilität** des Spenders und Empfängers vor Transplantationen zu überprüfen.

RFLP

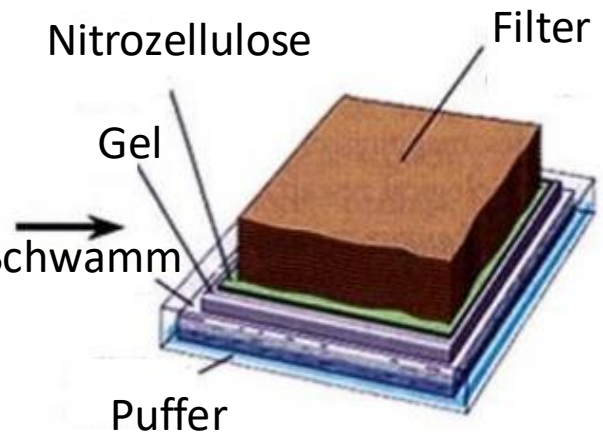
DNA + Restriktions Endonuklease



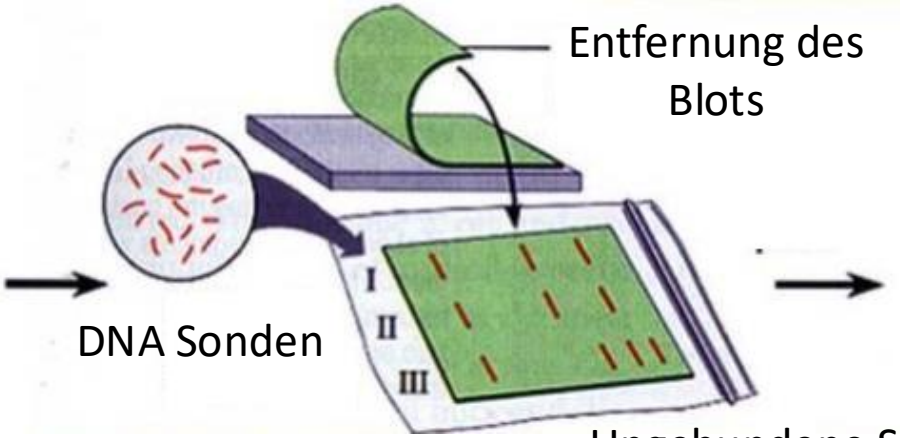
Elektrophorese



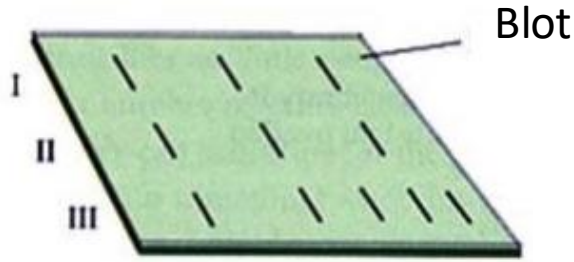
Blotting



Hybridisierung

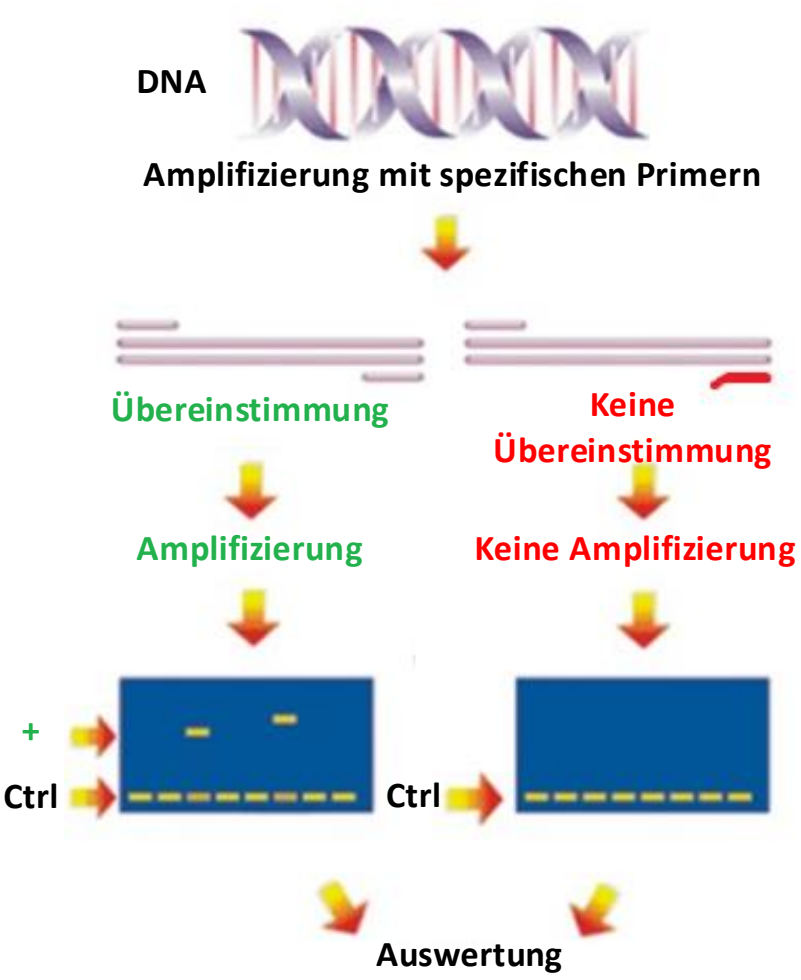


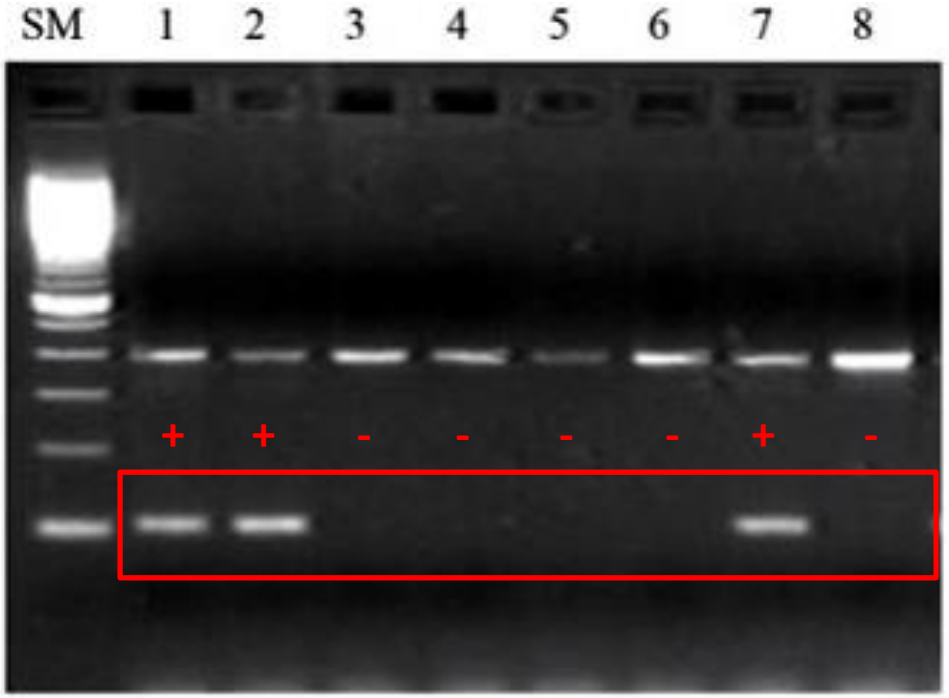
Nachweis



Ungebundene Sonden warden durch waschen entfernt

PCR mit Sequenzspeifischen Primern





HLA-A*01 Genotypisierung: Die sichtbaren Banden in Proben 1, 2 und 7 markieren HLA-A*01 Allele.

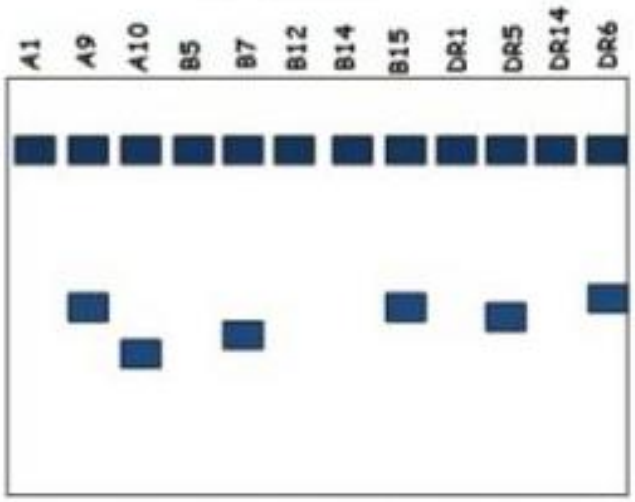
Klinische Signifikanz der HLA Typisierung

- Prüfen der immunologischen Kompatibilität des Spenders und Empfängers vor **Transplantationen** um Abstoßungsreaktionen zu verhindern.
- Weitere diagnostische Bestätigung einiger **autoimmuner Krankheiten** da bestimmte HLA Typen häufiger bei Autoimmunen Störungen zu finden sind z.B.:
  - **HLA-B27**: Morbus Bechterew, Entzündliche Darmkrankheiten (IBD), Psoriasis
  - HLA-DR1: Rheumatoide Arthritis, Colitis Ulzerosa
  - HLA-DR3: Typ I Diabetes Mellitus, Myasthenia gravis, Hashimoto Thyroiditis
  - HLA-DR4: Rheumatoide Arthritis, SLE
  - **HLA-DQ2**: Zöliakie, Typ I Diabetes Mellitus
  - **HLA-DQ8**: Zöliakie, Typ I Diabetes Mellitus

HLA Übereinstimmung vor einer Nierentransplantation

Das Überleben des Grafts ist vor allem vom Grad der Übereinstimmung von **HLA-A, HLA-B** und **HLA-DR** Allelen abhängig, diese warden vor Transplantationen untersucht.

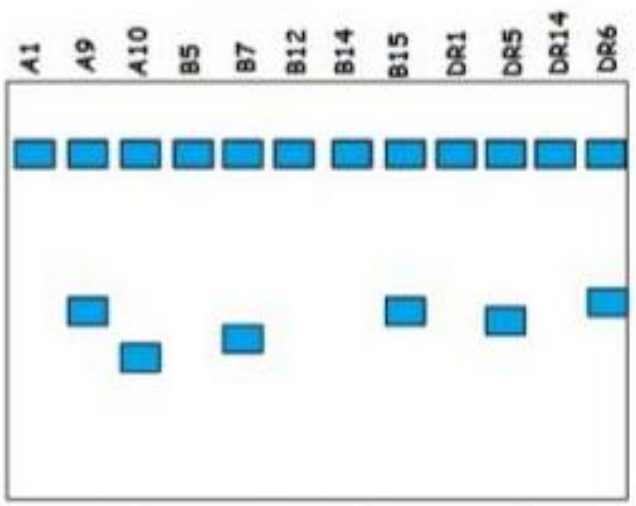
Empfänger



HLA Genotyp:

- **A9, A10**
- **B7, B15**
- **DR5, DR6**

Spender



HLA Genotyp:

- **A9, A10**
- **B7, B15**
- **DR5, DR6**

12/12 Übereinstimmungen ✓

Graft versus Host 1. (GVHD)

- Kann sich nach allogener **hämatopoetische Stammzellen Transplantation** (HSCT) bilden.
- Die Spender-Immunzellen greifen die Wirtsgewebe an und beschädigen sie.
- Hauptrisikofaktoren: **HLA nicht übereinstimmung** zwischen Spender und Empfänger.
- Therapie: Steroide (Immunsuppression), Letalität ist ca. 15%, aber Steroidresistenter akuter GVHD hat eine Letalität von 90%.

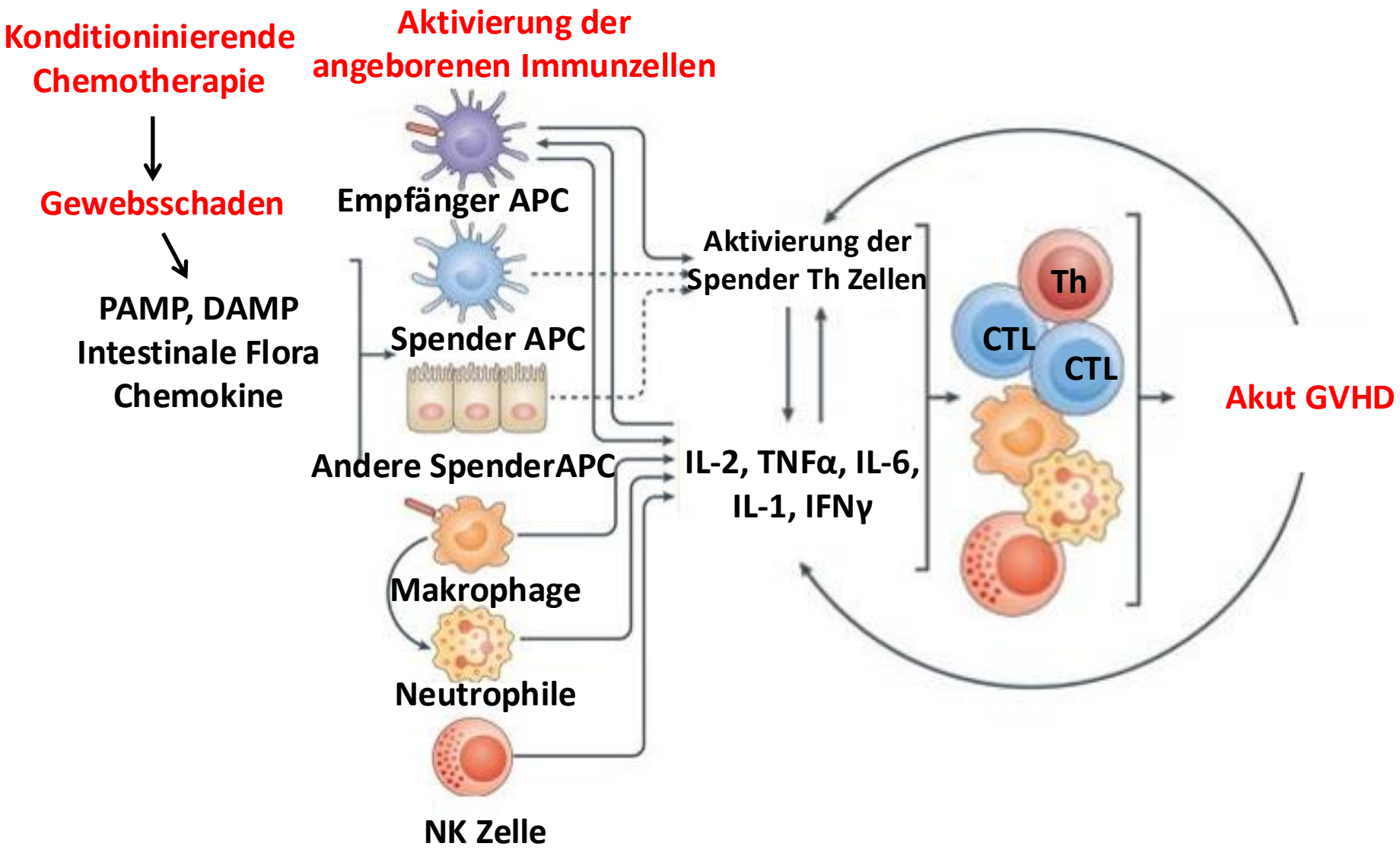


Schwere Haut GVHD



Akute Intestinale GVHD
(endoskopisches Bild)

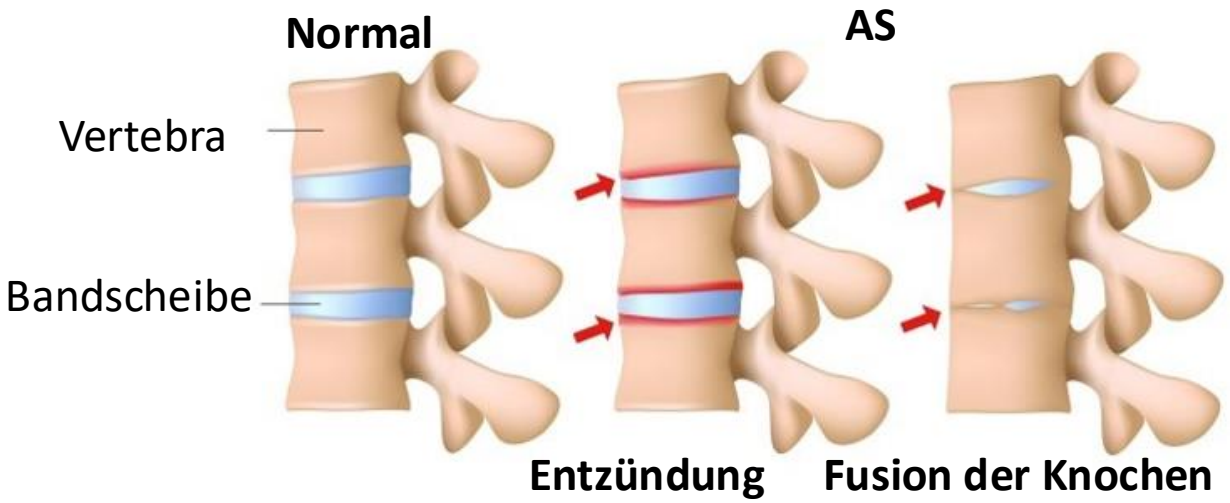
Graft versus Host 2. (GVHD)



HLA und Krankheitsassoziationen 1.

- **Morbus Bechterew** (Ankylosierende Spondylitis, AS): **HLA-B27**
- Ca. **90%** der AS Patienten sind HLA-B27 positiv.
- Prävalenz von HLA-B27 in der Kaukasischen Population ist 8%, in Skandinavien erreicht es 24%.
- Ca. 1,8% der HLA-B27 positiven Individuen entwickeln manifeste AS.

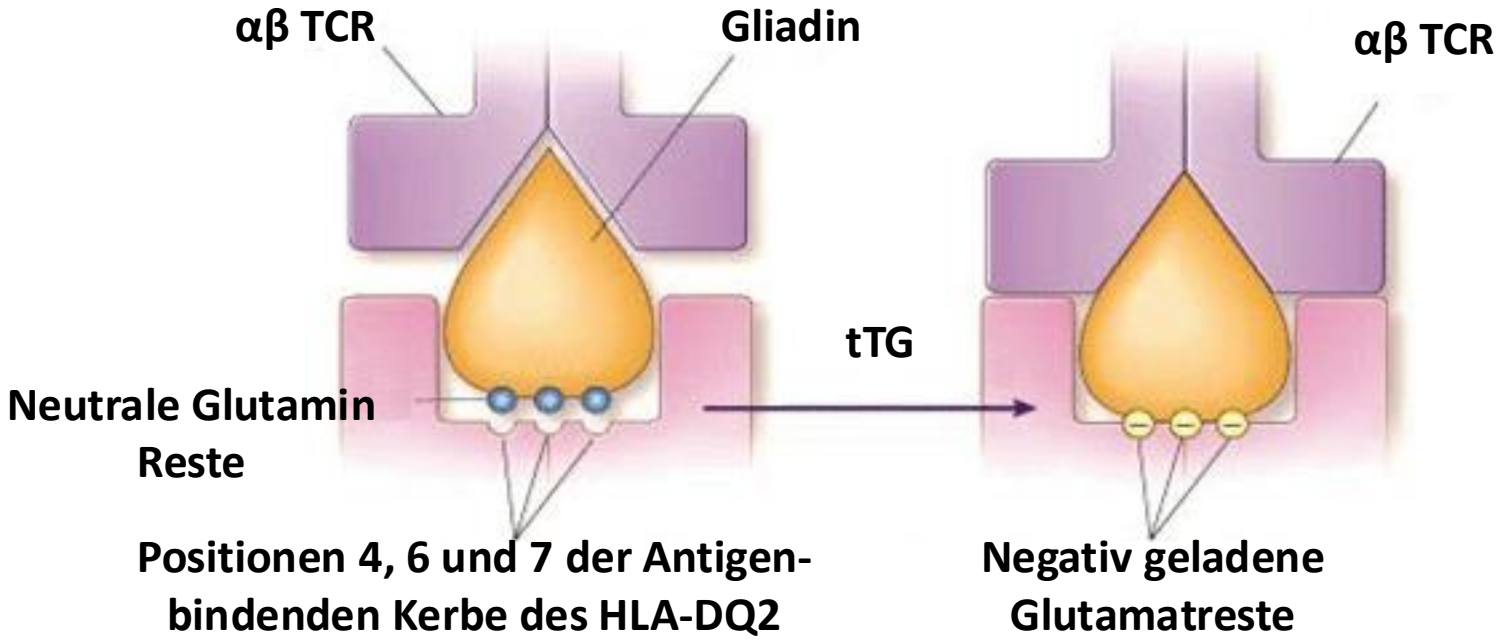
HLA-B27 positivität **erhöht nur das Risiko der Krankheit**, es ist **allein nicht genug** um de Krankheit zu entwickeln! (Das gilt für alle HLA Assoziationen.)





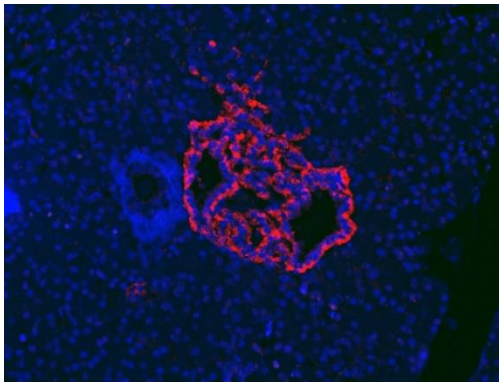
HLA und Krankheitsassoziationen 2.

- **Zöliakie** (Gluten-sensitive Enteropathie): **HLA-DQ2** und **HLA-DQ8**
- Mindestens eins von beiden Allelen ist in **98%** der Patienten. (Stärkste bekannte HLA Assoziation und am besten verstandene Rolle in der Pathogenese)
- Prävalenz von HLA-DQ2 in der Kaukasischen Population ist 30%, aber Prävalenz der Krankheit ist nur 1%. → Positivität reicht nicht um die Krankheit zu entwickeln.
- Diese zeigen eine **höhere Affinität für Gliadin** als andere MHC Typen, besonders wenn sie deaminierte Formen binden.



HLA und Krankheitsassoziationen 3.

- **Typ I Diabetes Mellitus** (IDDM): **HLA-DR3, HLA-DR4**
- HLA-DR3-DQ2 → 3X Risiko
- HLA-DR4-DQ8 → 10X Risiko
- **HLA-DR3-DR4 heterozygotes → 25X risk**
- HLA-DQ6.2 → 0,1X Risiko (protektiv)



Direkt IF: Humane Langerhans Insel (Patient mit IDDM)
Grün: Insulin (fehlt)
Rod: Glukagon
Blau: Zellkerne



Quellen (keine bestimmte Reiehnfolge)

- Nunes E[1], et al.: **Definitions of histocompatibility typing terms.** *Blood.* 2011 Dec 1;118(23):e180-3. doi: 10.1182/blood-2011-05-353490. Epub 2011 Oct 14.
- Petersdorf EW[1]: **The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease.** *Blood.* 2013 Sep 12;122(11):1863-72. doi: 10.1182/blood-2013-05-355982. Epub 2013 Jul 22.
- Bontadini A[1]: **HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics.** *Methods.* 2012 Apr;56(4):471-6. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.03.025. Epub 2012 Mar 28.
- Marsh SG[1], et al.: **An update to HLA nomenclature, 2010.** *Bone Marrow Transplant.* 2010 May;45(5):846-8. doi: 10.1038/bmt.2010.79. Epub 2010 Mar 29.
- Dunn PP[1]: **Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal.** *Int J Immunogenet.* 2011 Dec;38(6):463-73. doi: 10.1111/j.1744-313X.2011.01040.x.
- Erlich H[1]: **HLA DNA typing: past, present, and future.** *Tissue Antigens.* 2012 Jul;80(1):1-11. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01881.x.
- Sanchez-Mazas A[1], Meyer D[2]: **The relevance of HLA sequencing in population genetics studies.** *J Immunol Res.* 2014;2014:971818. doi: 10.1155/2014/971818. Epub 2014 Jul 15.
- Lim WH[1], et al.: **Human leukocyte antigen mismatches associated with increased risk of rejection, graft failure, and death independent of initial immunosuppression in renal transplant recipients.** *Clin Transplant.* 2012 Jul-Aug;26(4):E428-37. doi: 10.1111/j.1399-0012.2012.01654.x. Epub 2012 Jun 4.
- Becker LE[1], Morath C[2], Suesal C[3]: **Immune mechanisms of acute and chronic rejection.** *Clin Biochem.* 2016 Mar;49(4-5):320-3. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.02.001. Epub 2016 Feb 3.
- Shlomchik WD[1]: **Graft-versus-host disease.** *Nat Rev Immunol.* 2007 May;7(5):340-52.
- Blazar BR[1], Murphy WJ, Abedi M: **Advances in graft-versus-host disease biology and therapy.** *Nat Rev Immunol.* 2012 May 11;12(6):443-58. doi: 10.1038/nri3212.

Quellen

- Nunes E[1], et al.: **Definitions of histocompatibility typing terms.** *Blood.* 2011 Dec 1;118(23):e180-3. doi: 10.1182/blood-2011-05-353490. Epub 2011 Oct 14.
- Kanda J[1]: **Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease.** *Int J Hematol.* 2013 Sep;98(3):300-8. doi: 10.1007/s12185-013-1405-x. Epub 2013 Jul 28.
- Brown MA[1], Kenna T[1], Wordsworth BP[2]: **Genetics of ankylosing spondylitis-insights into pathogenesis.** *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Feb;12(2):81-91. doi: 10.1038/nrrheum.2015.133. Epub 2015 Oct 6.
- Sheehan NJ[1]: **The ramifications of HLA-B27.** *J R Soc Med.* 2004 Jan;97(1):10-4.
- Karell K[1], et al.: **HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease.** *Hum Immunol.* 2003 Apr;64(4):469-77.
- Schuppan D[1], Junker Y, Barisani D: **Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies.** *Gastroenterology.* 2009 Dec;137(6):1912-33. doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.008. Epub 2009 Sep 18.
- Noble JA[1], Valdes AM: **Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes.** *Curr Diab Rep.* 2011 Dec;11(6):533-42. doi: 10.1007/s11892-011-0223-x.
- Rayner ML[1], et al.: **Sequencing of the second exon of the MHC class II DQ6 alleles in patients with type 1 diabetes.** *Autoimmunity.* 2002 Mar;35(2):155-7.