IMMUNOLÓGIAI ÉS BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZET

10. gyakorlat: HLA tipizálás

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet
Pécs

A HLA-rendszer felfedezése

- **George Snell** egereken végzett vizsgálatokat.
  Egérdaganatok átoltását végezte különböző egyedekbe.
  A kilökődést vagy a megtapadást a sejtekre jellemző, genetikailag meghatározott különbségek vagy azonosságok határozzák meg.
  Genetikai rendszer: MHC (Major Histocompatibility Complex-Fő Hisztokompatibilitási Komplex)

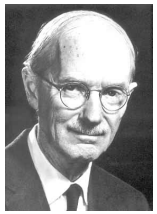
- **Jean Dausset** emberben ugyanez a rendszer (1950-es évek):
  HLA-rendszer: Humán Leukocita Antigén

- **Baruj Benacerraf**: a kilökődési reakció erősségét a donor és a recipiens közötti hisztoinkompatibilitás mértéke határozza meg.

- **Nobel-díj (1980)**

Baruj Benacerraf (1920 - 2011)

Jean Dausset (1916 - 2009)

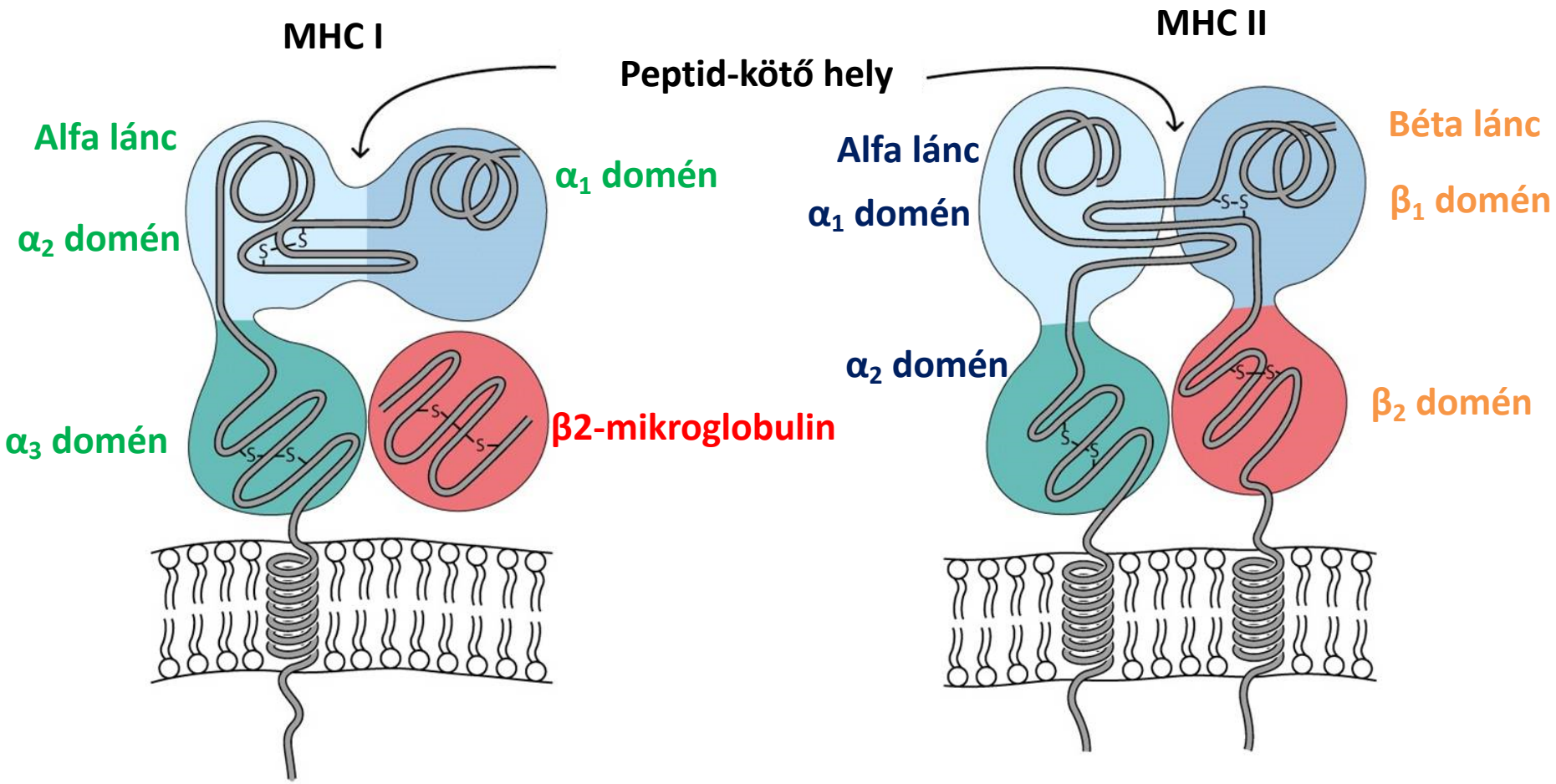

George D. Snell (1903 - 1996)

HLA tipizálás orvosi jelentősége

- **Transzplantációknál** a donor és a recipiens immunológiai kompatibilitásának vizsgálata (megfelelő donort kell találni)
- **Autoimmun kórképek** gyanújának megerősítése vagy kizárása, bizonyos HLA típusok gyakrabban fordulnak elő autoimmun kórképekben, pl.:
  - **HLA-B27**: Becheterew-kór, gyulladásos bélbetegségek (IBD), Psoriasis
  - HLA-DR1: Rheumatoid arthritis, Colitis ulcerosa
  - HLA-DR3: I-es típusú diabetes mellitus, Myasthenia gravis, Hashimoto thyreoiditis
  - HLA-DR4: Rheumatoid arthritis, SLE
  - **HLA-DQ2**: Coeliakia, I-es típusú diabetes mellitus
  - **HLA-DQ8**: Coeliakia, I-es típusú diabetes mellitus

HLA tipizálás alapok I.

HLA (Human leukocyte antigen)
MHC (Major histocompatibility complex)



Minden magvas sejten és trombocitákon!

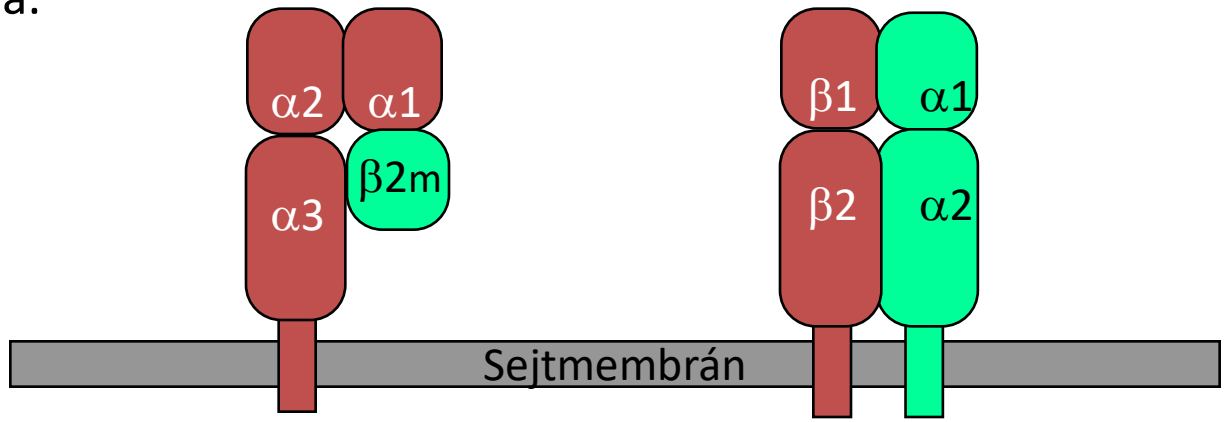
Antigén-prezentáló sejteken!
(pl. makrofág, dendritikus sejt, B-sejt)

HLA I. osztály

- HLA-A, B, C gének
- Minden magvas sejt felszínén és a TCT is megtalálhatók.
- A kifejeződés szintje eltérő:
  - erőteljes az immunrendszer sejtjein;
  - alacsony pl. az idegsejteken, szívizomsejteken
  - alfa lánc és β2 microglobulin alkotja.

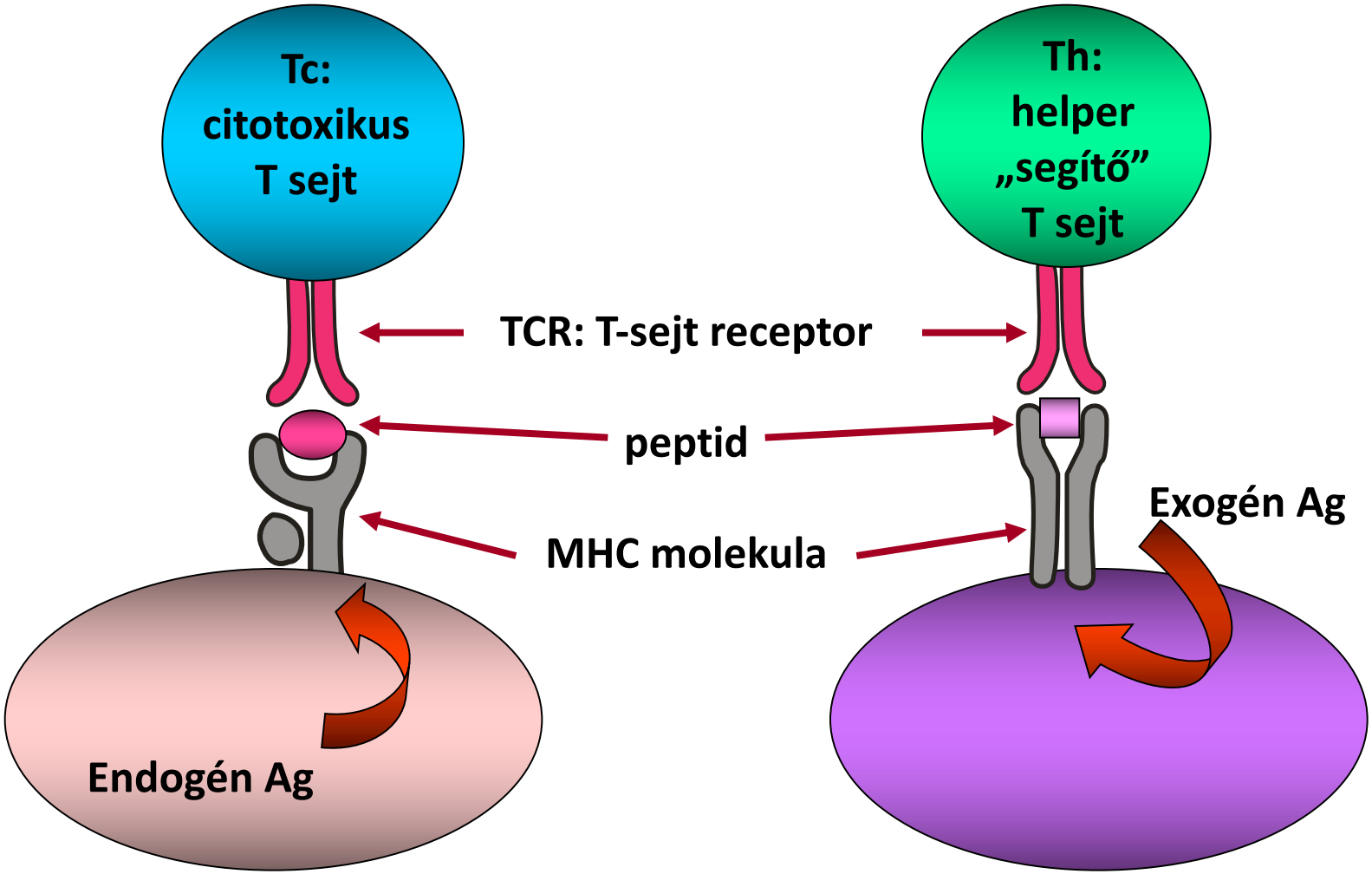
HLA II. osztály

- HLA-DR, DQ, DP gének
- Az immunrendszer sejtjeinek felszínén találhatók (hivatásos antigén prezentáló sejtek):
  - B limfociták
  - dendritikus sejtek
  - makrofágok
- Indukálhatók: endotélen.
- Alfa és béta lánc alkotja.



HLA I. osztály

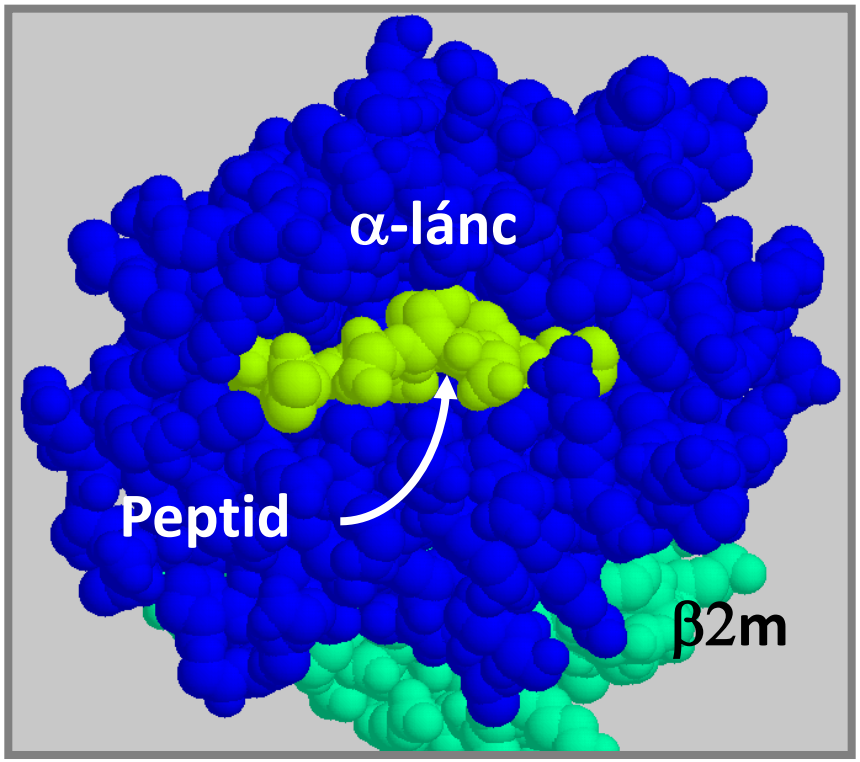
HLA II. osztály

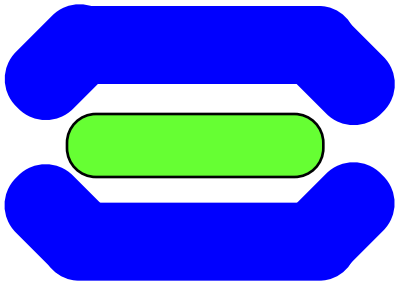


Endogén fehérjékből származó peptidek
(saját, vírus, intracelluláris baktérium, tumor)

Exogén fehérjékből származó peptidek
(extracelluláris patogén, allergén)

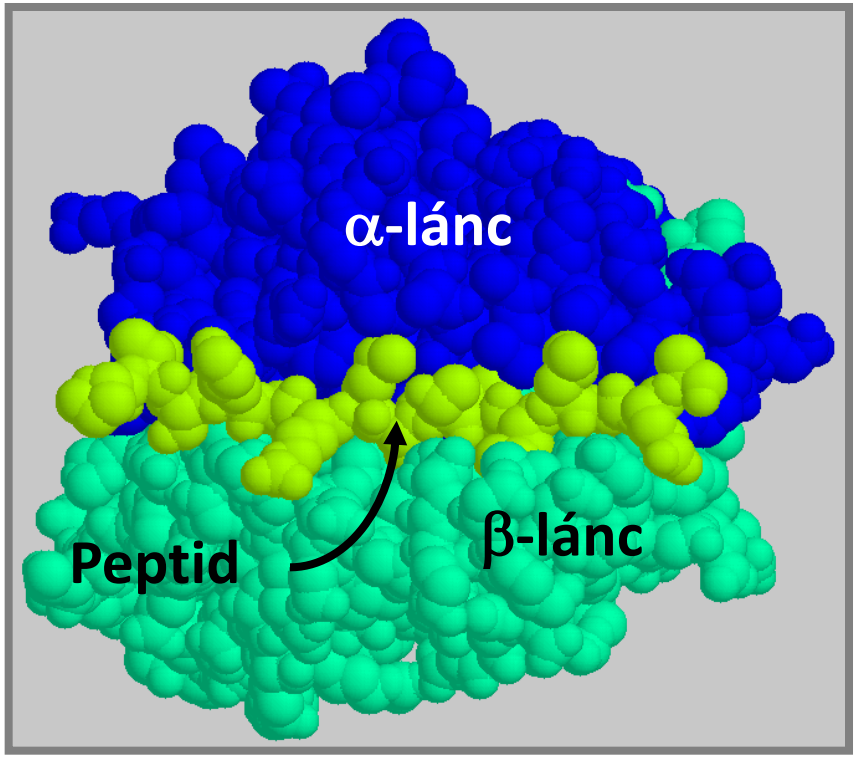
HLA I. osztály

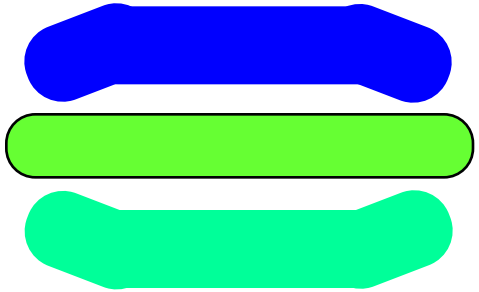




8-10 aminosav
hosszúságú peptideket köt

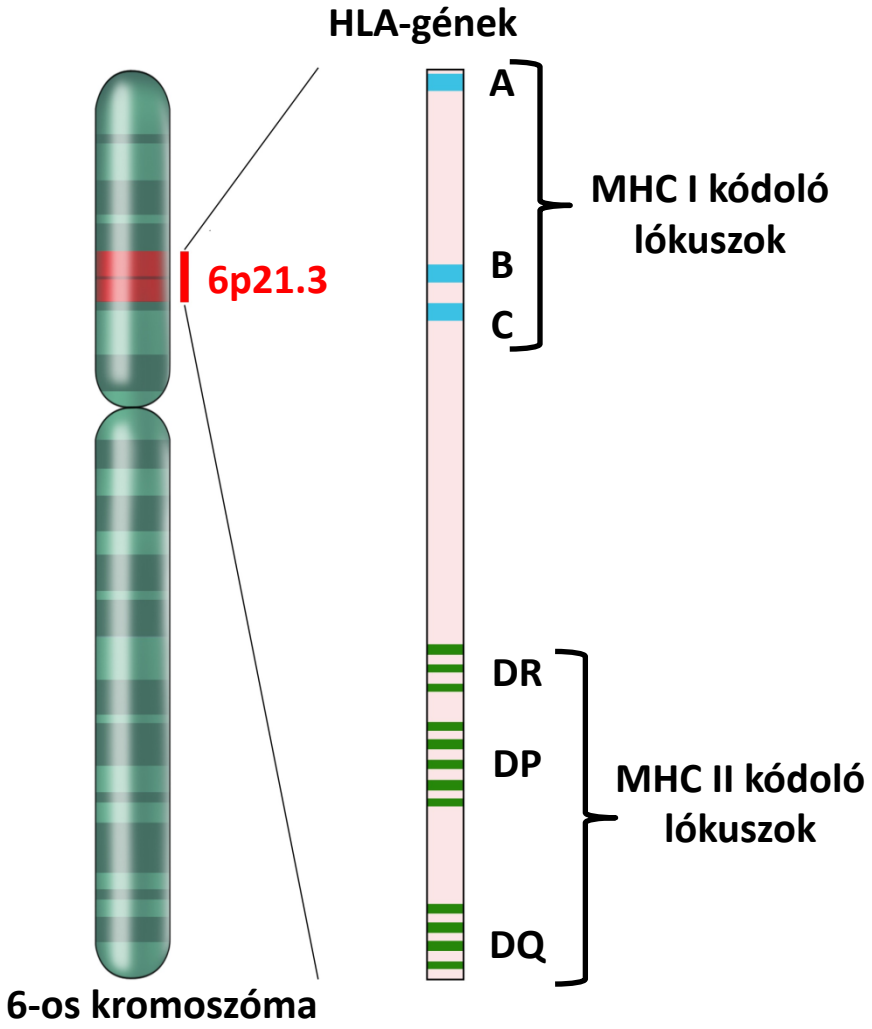
HLA II. osztály





>13 aminosav
hosszúságú peptideket köt

HLA öröklődés: MHC lókuszok



Az emberben kifejeződik a HLA-A, B, C és a DR, DP és DQ is, ráadásul mind az anyai, mind az apai kromoszómáról. → **Sokféle MHC** van egyidejűleg jelen a sejteken!

A HLA nevezéktan alapjai

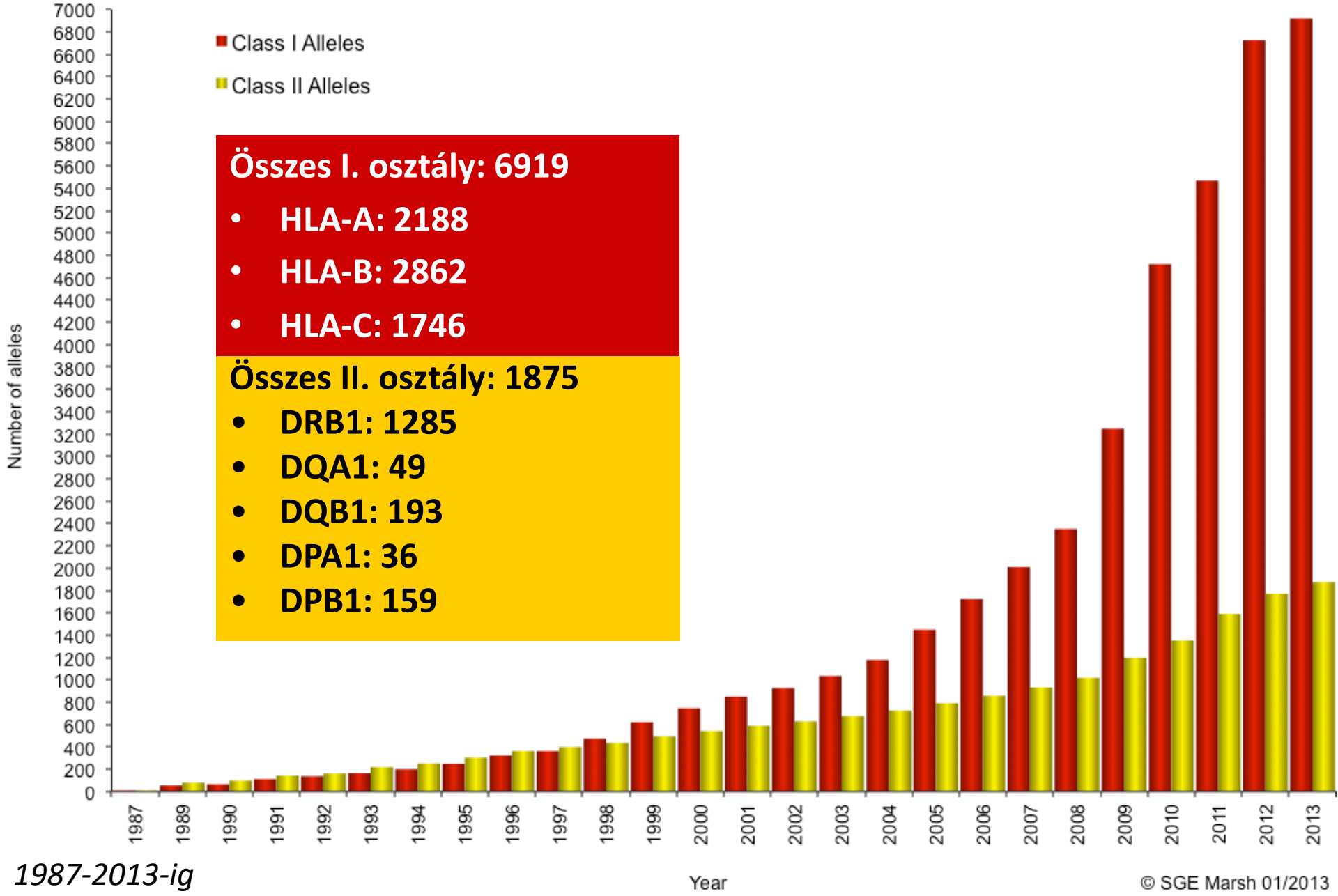
- **MHC I**-nél csak **egy lánc** van, pl: **HLA-B*27:01** → 27-es szerológiai csoportú B típusú MHC I
- Az **MHC II** két fehérjeláncból álló **heterodimer**.

HLA-DQA1:05:01

1. **Milyen típusú MHC gént kódol? Pl: A, B, C, DQ, DR, DP**
2. **Lókusz (A1 = alfa láncot kódoló szakasz, B1= béta láncot kódoló szakasz)**
3. **Milyen szerológiai csoportba tartozó láncot kódol? (05 = α^5 típusú láncot eredményező allélcsoport)**
4. **Konkrét allél a csoporton belül**

Figyelem! Szemléltető dia, nem fogunk HLA nevezéktant kérdezni.

Azonosított HLA allélek száma



1987-2013-ig

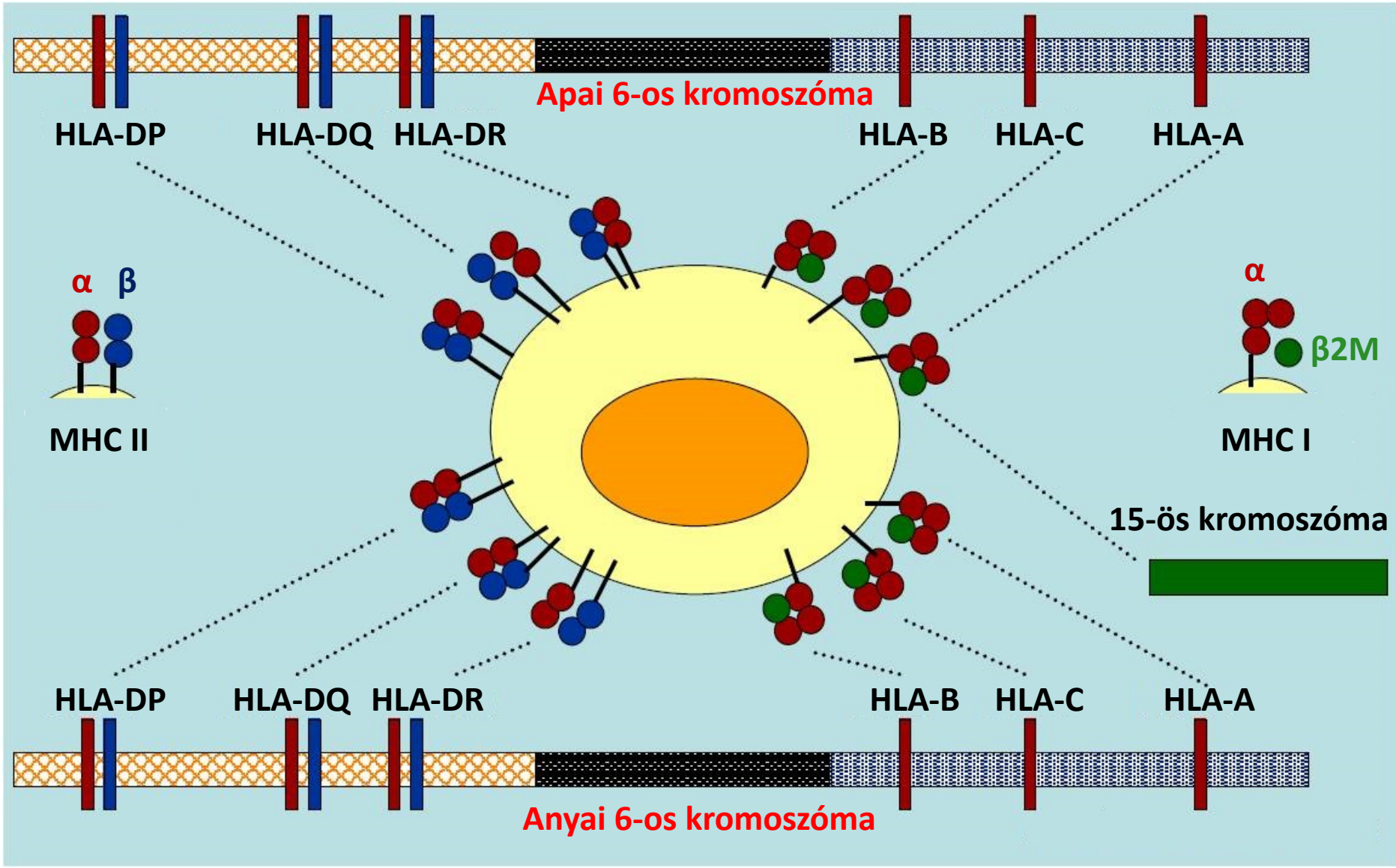
HLA-k öröklődése

- **Poligénes**: Több gén is kódol MHC I és MHC II láncokat. (pl. HLA-A, B és C típusú MHC I és DP, DQ és DR típusú MHC II)
- **Polimorf**: A népességben az egyes allélok tekintetében nagyfokú a változatosság. (sokféle variáció van mindegyik allélból)
- **Kodomináns**: Az egyénben kifejeződik mind az anyai, mind az apai kromoszómán található allél.

↓

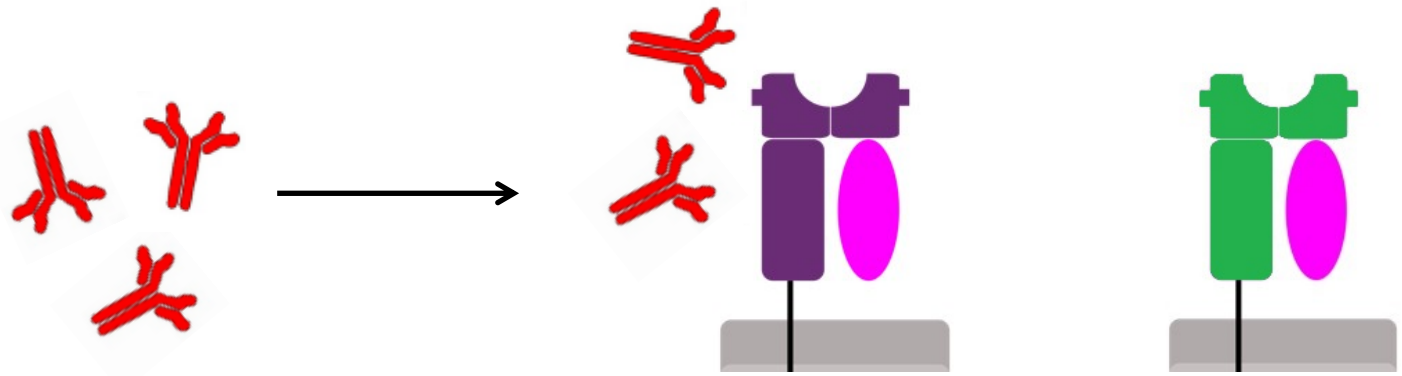
Mindenki egy rá jellemző **MHC készlettel** rendelkezik, eltérő peptid-kötő tulajdonságokkal.

Kodomináns expresszió



HLA szerotípus vs genotípus

- HLA **szerotípus**: Az MHC fehérjéket **antigenitás alapján** különböztetik meg. Pl.:



Anti-HLA-B27 antitest **HLA-B27** **HLA-A2**

- HLA **genotípus**: Az MHC fehérjéket az őket kódoló HLA **allélok azonosításán keresztül** különböztetik meg. Eltérő genotípus nem feltétlenül eredményez eltérő antigenitást, HLA **allélból sokkal több változat van**, mint HLA szerotípusból. (2010-ben 6959 HLA allél volt ismeretes, a szám azóta is növekszik. → Polimorf)

HLA tipizálás módszerei

- **Szerológiai módszerek**:
  - **Mikrocitotoxicitási teszt (MCA: Microcytotoxicity assay)**
  - Kevert limfocita kultúra (MLC: Mixed lymphocyte culture)

- **Molekuláris biológiai módszerek**: (→ lásd molekuláris sejtbiológiából)
  - Restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP)
  - Szekvencia-specifikus oligonukleotid próbák (SSOP) → DNS hibridizáció
  - **Szekvencia-specifikus primerek → SSP-PCR**
  - **DNS szekvenálás**

Többnyire a molekuláris **biológiai módszereket részesítik előnyben**, mert:

- **Specifikusabbak** (jól definiált szekvenciájú primereket és próbákat használnak)
- **Rugalmasabbak** (új oligonukleotidok tervezhetők szinte azonnal, amint egy új allélt leírnak)
- **Megbízhatóbbak** (Nem szükséges hozzájuk specifikus sejttípus, és a beteg állapota vagy a sejtek életképessége kevésbé befolyásolja a vizsgálatokat)

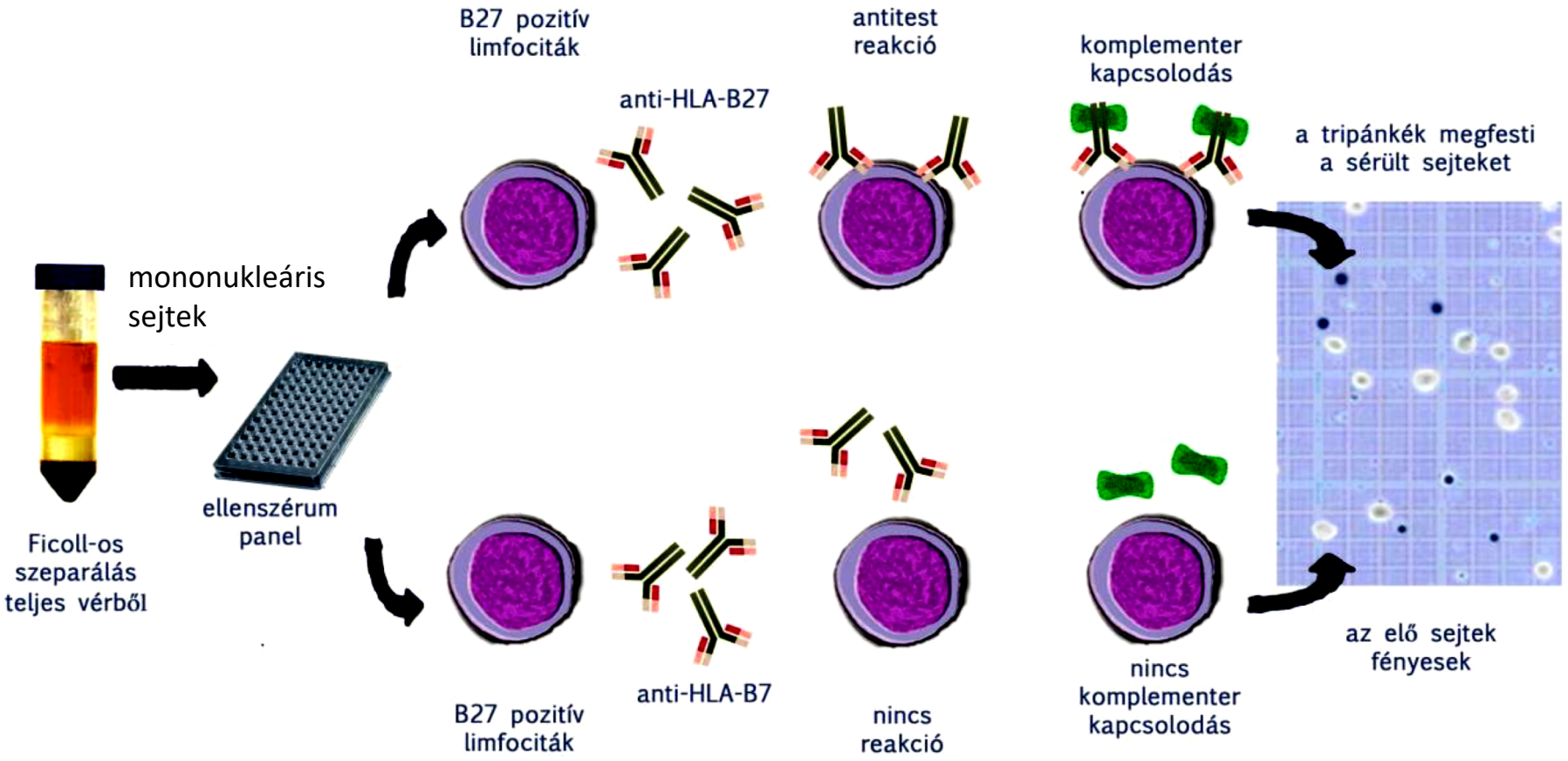
HLA szerológia

1. **Tipizálás** - HLA antigének polimorfizmusának vizsgálata: ismert specificitású ellenanyagokhoz adunk ismeretlen antigenitású limfocitákat.

2. **Antitestszűrés - PRA** (panel reaktív antitest) vizsgálat - HLA antigénekkel szemben képződő ellenanyagok kimutatása: ismert antigenitású sejtpanelhez adunk kivizsgálandó szérumot.

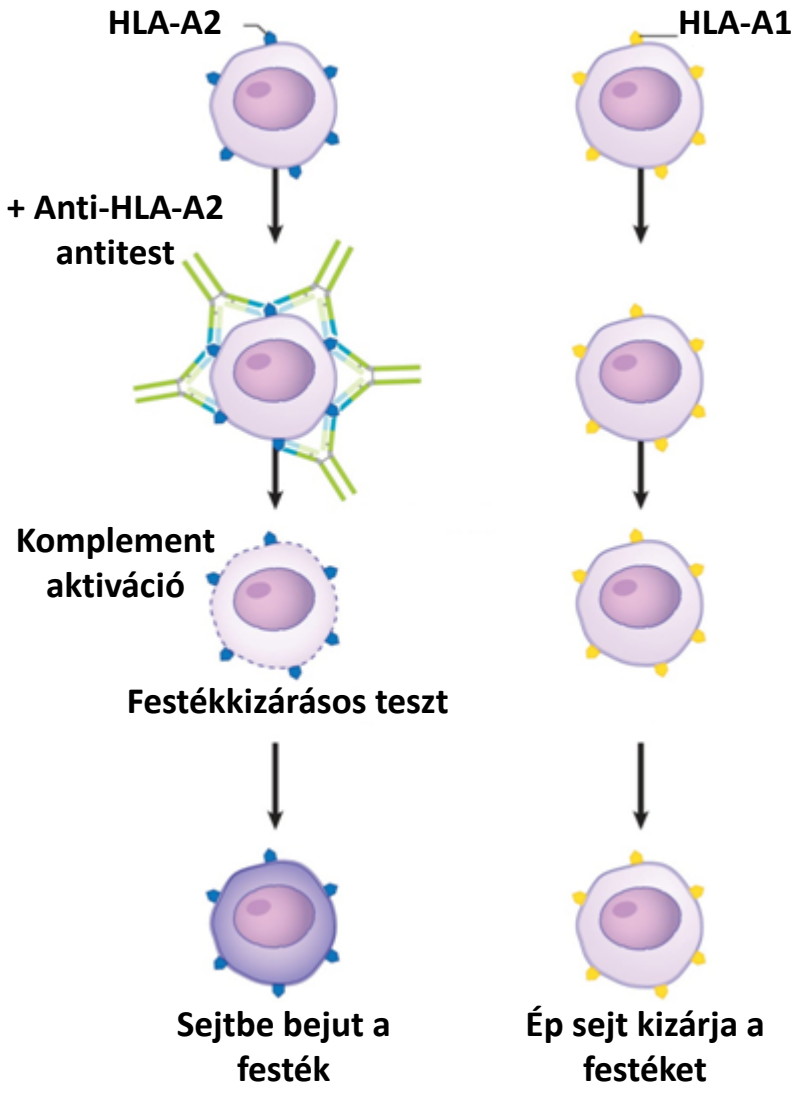
3. **Keresztpróba**: in vitro modellezi a transzplantáció során esetlegesen kialakuló antigén-antitest reakciót, melynek in vivo következménye a szervkilökődés lehet.

Mikrocitotoxicitási teszt (Terasaki)

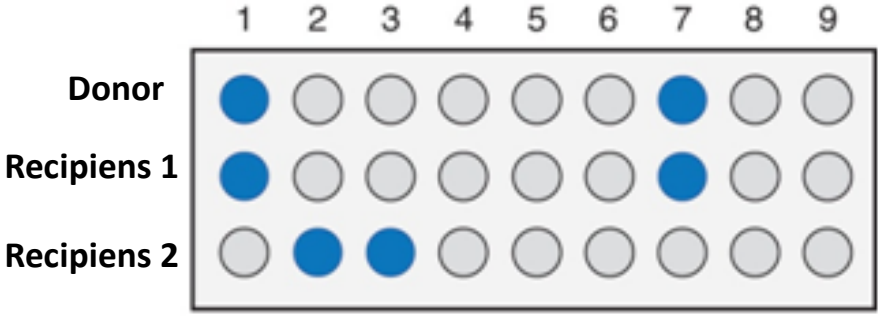


Mikrocitotoxicitási teszt (MCA)

Terasaki tálcán

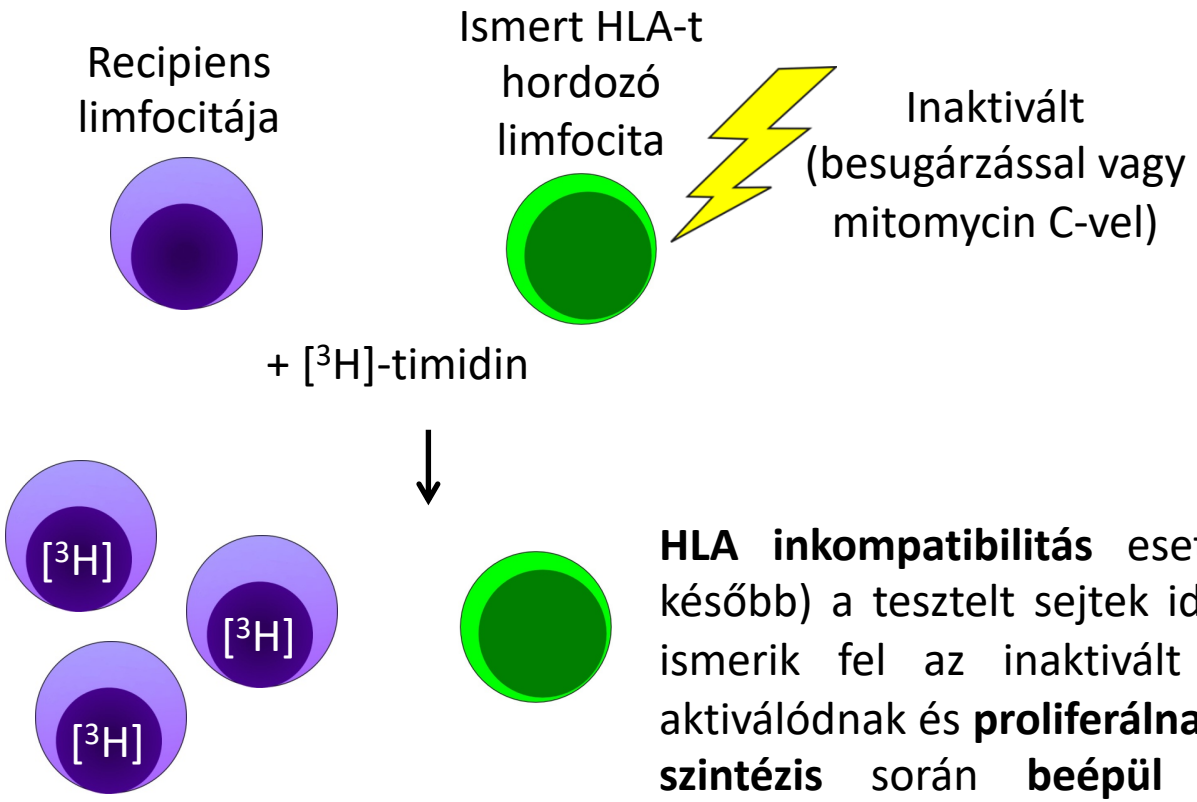


Transzplantációk előtt a donor és a recipiens kompatibilitásának vizsgálatára használják. Pl.:



Donor és az 1-es recipiens egyezik a szerológiai teszt alapján

Kevert limfocita kultúra

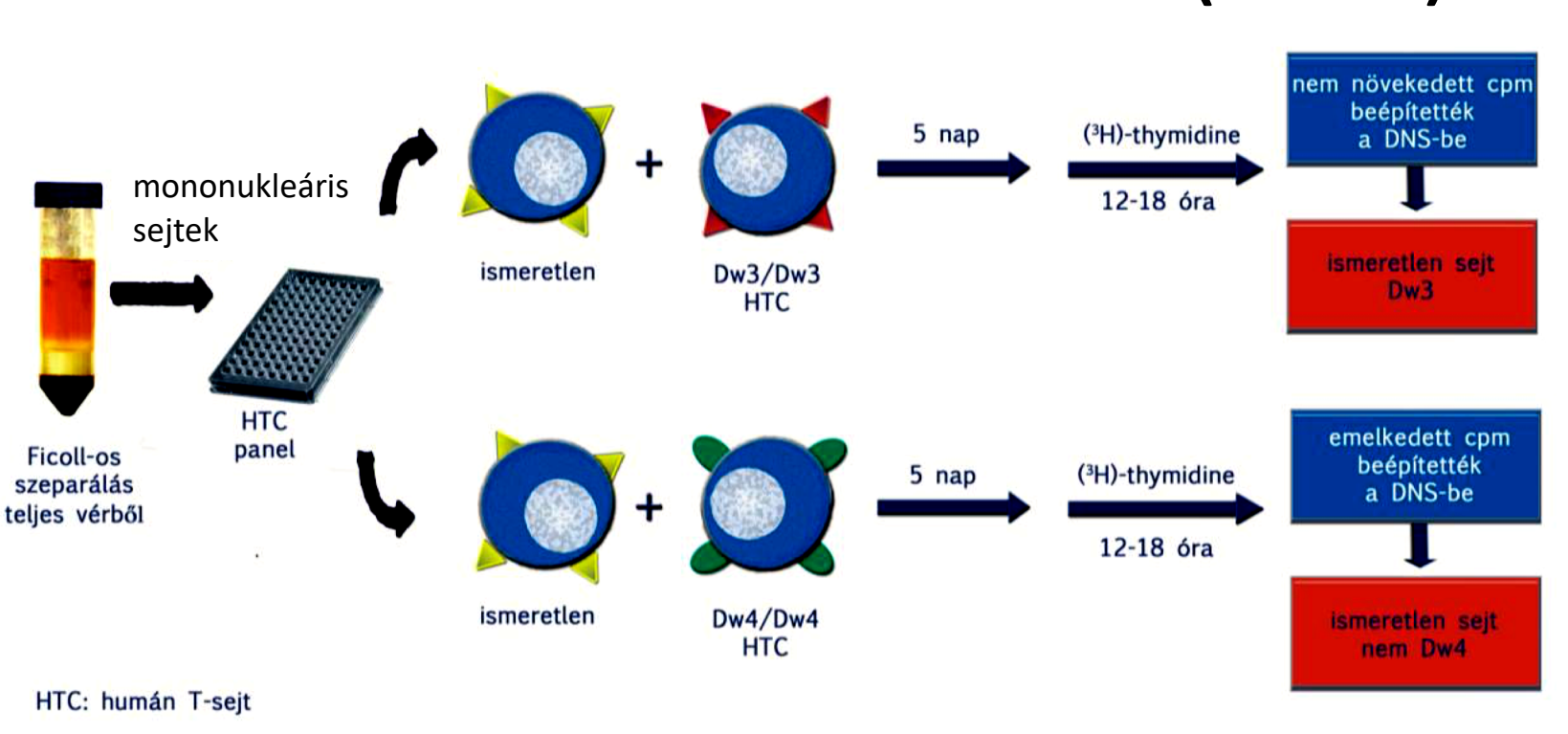


HLA inkompatibilitás esetén (lásd később) a tesztelt sejtek idegenként ismerik fel az inaktivált sejteket, aktiválódnak és **proliferálnak**, a **DNS-szintézis** során **beépül a jelölt timidin**, mely kimutatható.

Felhasználás:

Transzplantációk előtt a donor és a recipiens immunológiai inkompatibilitásának vizsgálata.

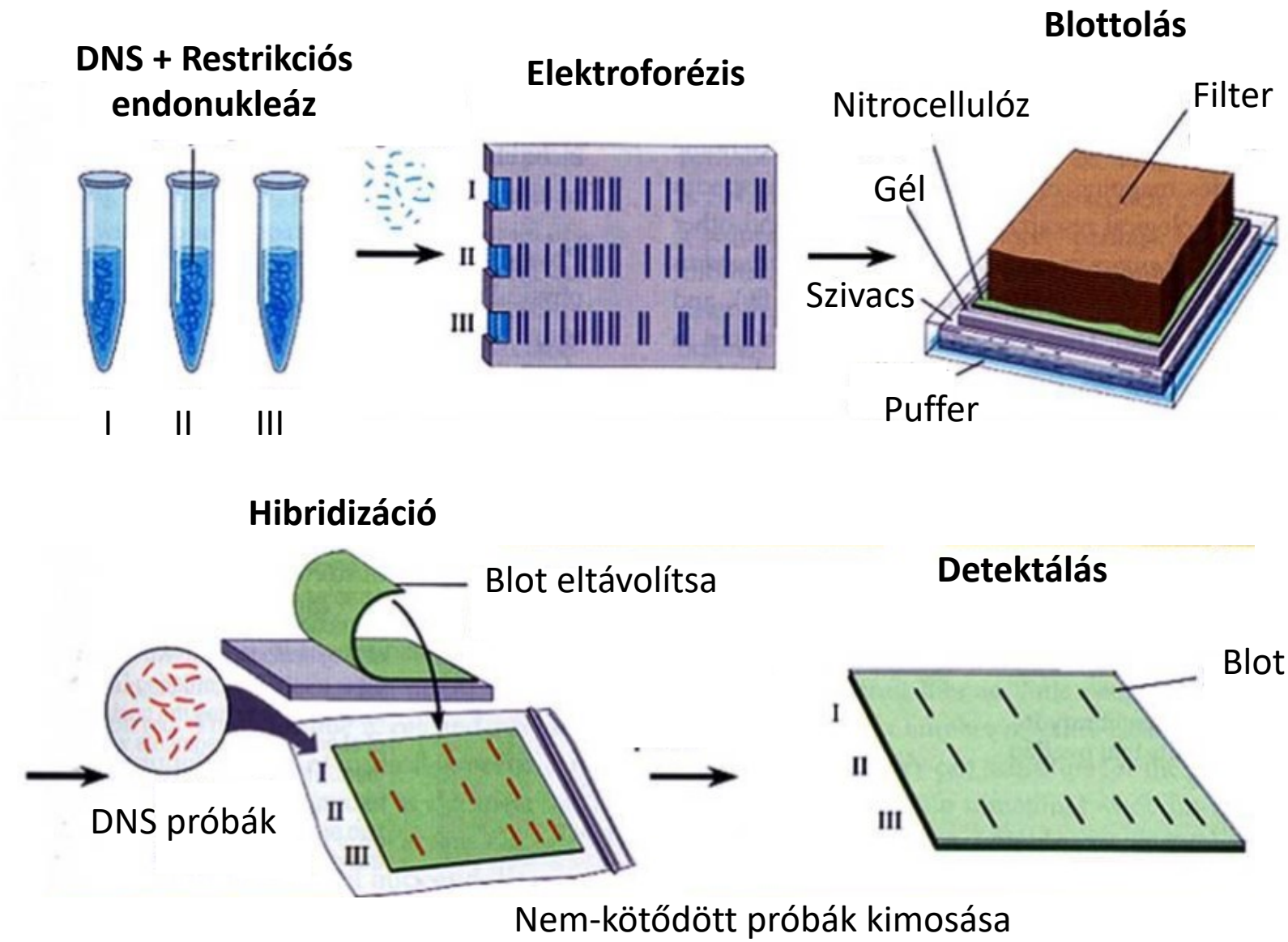
Kevert limfocita kultúra (MLC)



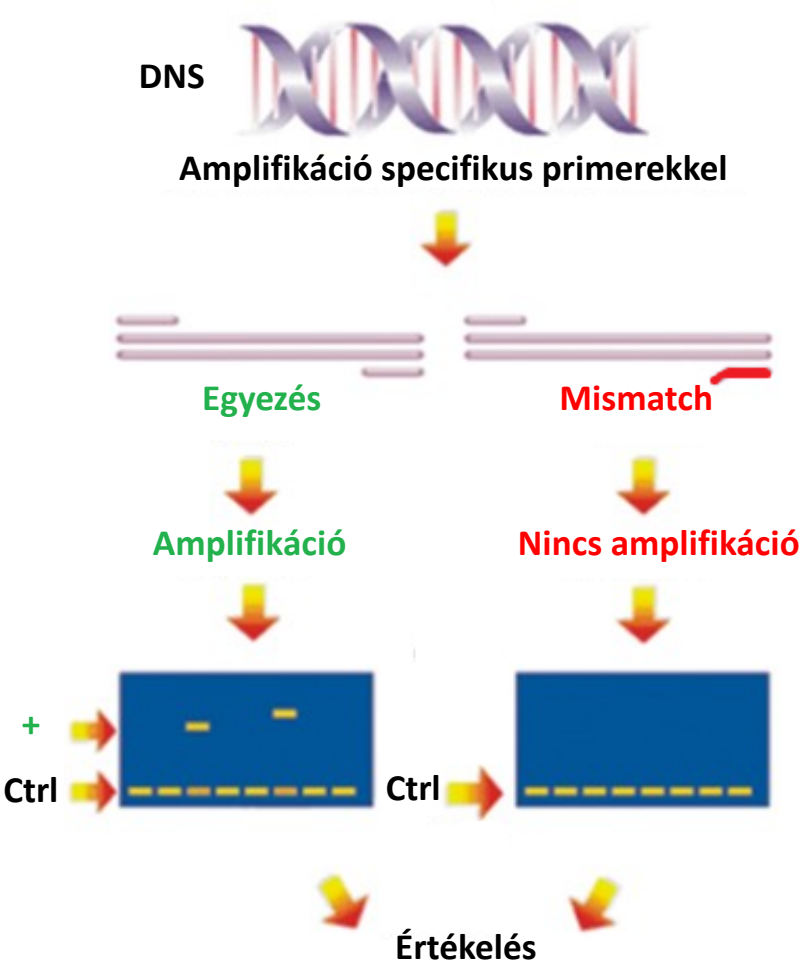
Kevert limfocita kultúra (Mixed Lymphocyte Culture): Két egyén (pl. a beteg illetve egy laboratóriumban fenntartott, ismert, pl. HLA-Dw-t expresszáló) limfocitáit összekeverik egy Petri csészébe és pár napig együtt inkubálják őket sejttenyészetben. Amennyiben az ismeretlen (pl. a betegből származó) limfocita nem hordoz HLA-Dw-t, ami a teszt limfocitán megtalálható, akkor a limfocita stimulált állapotba kerül, proliferálni fog, melyet timidin inkorporáció alapján mérnek.

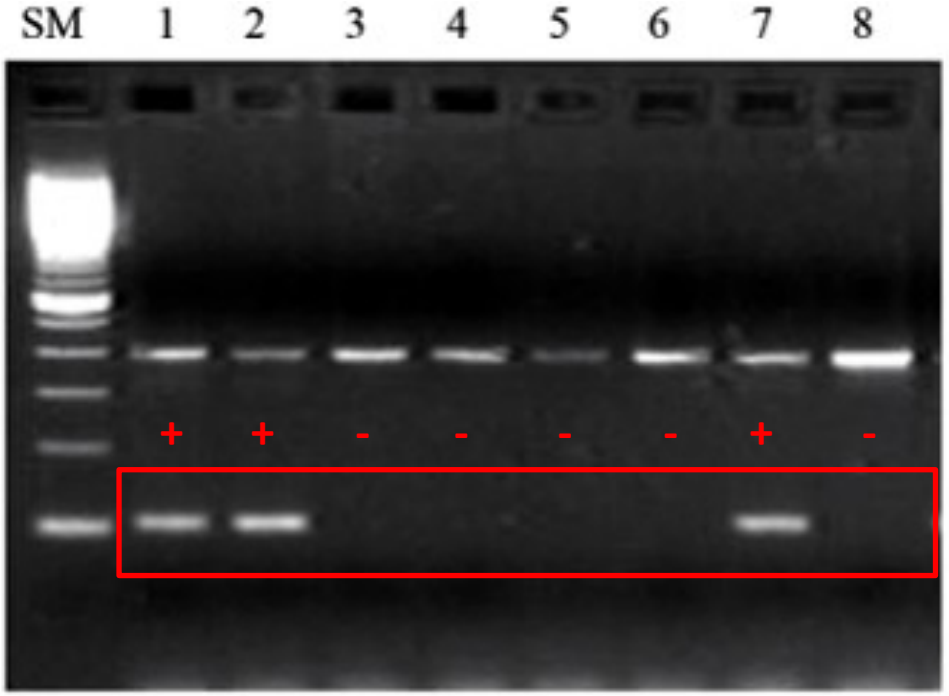
Csak MHCII meghatározására alkalmazzák, transzplantáció esetén helye van a klinikai gyakorlatban. Homogén tipizáló sejt populáció fenntartását igényli szövettenyésztő laboratóriumokban. Izotópos vizsgálat.

RFLP
(Restriction fragment length polymorphism)



PCR szekvencia-specifikus primerrel





HLA-A*01 genotipizálás: az 1-es, 2-es és 7-es mintákban a pozitív csíkok HLA-A*01 allélt jeleznek.

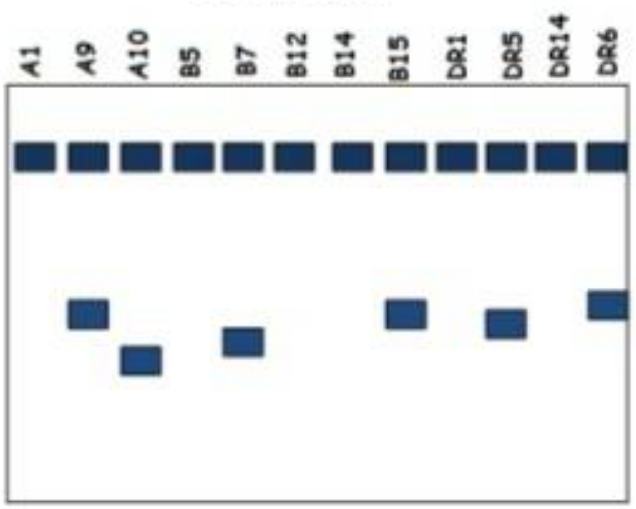
Szervtranszplantációs riadó lépései

- Beérkezik a donor vérmintája
- A lehetséges recipiensek kiválasztása a regiszterből
- DNS izolálás, SSP PCR HLA-A, B és DRB1 génekre, gél elektroforézis, értékelés
- Keresztpróba→ a donor sejtjeit a lehetséges recipiensek szérumával komplement jelenlétében vizsgáljuk. A recipiens szenzitizációját ellenőrizzük

Vizsgált HLA-k vesetranszplantációk előtt

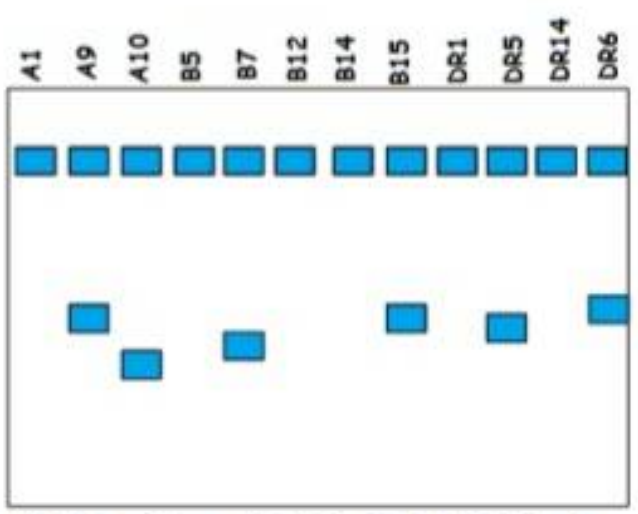
Vese átültetéskor a graft túlélése szempontjából a **HLA-A**, **HLA-B** és a **HLA-DRB** egyezésének van jelentősége, ezeket vizsgálják a donor és a recipiens esetében is.

Recipiens



HLA genotípus:
- **A9, A10**
- **B7, B15**
- **DRB5, DRB6**

Donor



HLA genotípus:
- **A9, A10**
- **B7, B15**
- **DRB5, DRB6**

12/12 egyezés ✓

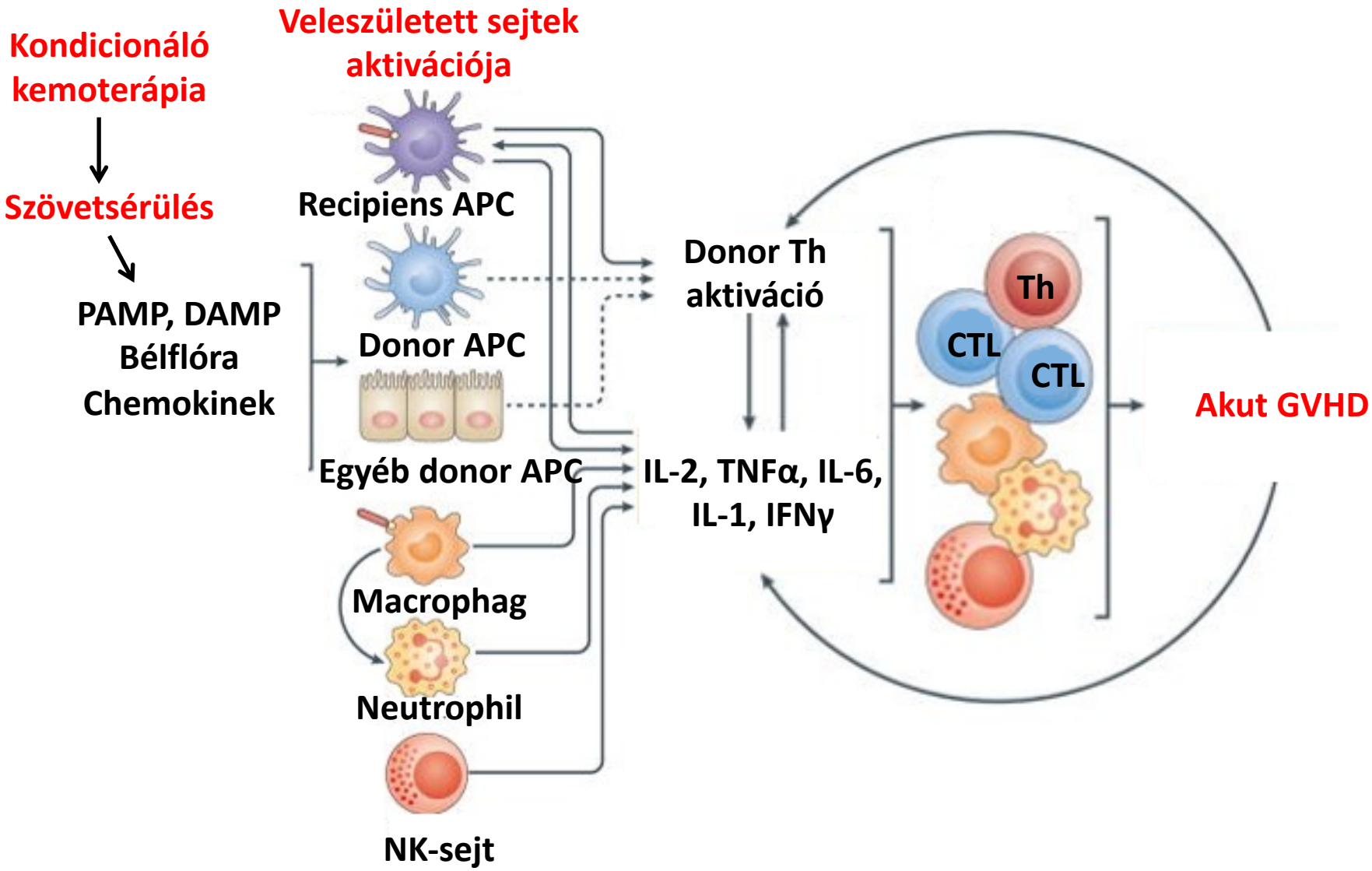
Graft versus host betegség 1. (GVHD)

- **Allogén hemopoetikus őssejt transzplantációt** (HSCT) követően alakulhat ki.
- Lényeg: A donorból származó immunsejtek megtámadják a recipiens szöveteit.
- Fő rizikótényező: **HLA-mismatch** a donor és a recipiens között.
- Fő terápiás lehetőség: szteroidok (immunszuppresszió), halálozás kb. 15%, de a szteroid-rezisztens akut GVHD halálozása 90%.

Súlyos bőr GVHD

Akut intesztinális GVHD (endoszkópos felvétel)

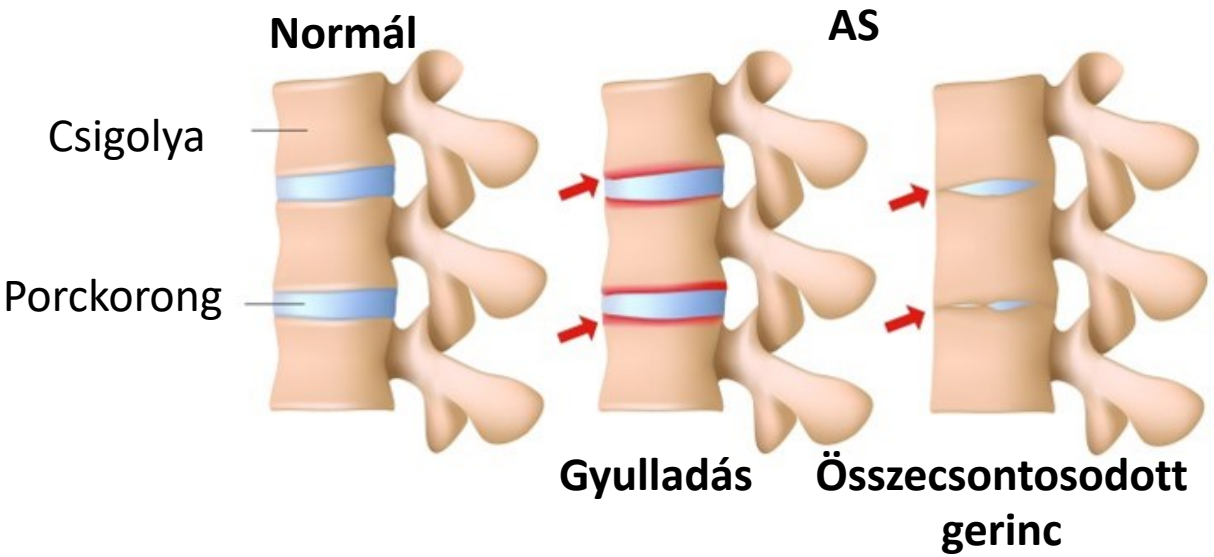
Graft versus host betegség 2. (GVHD)



HLA betegség-asszociációk 1.

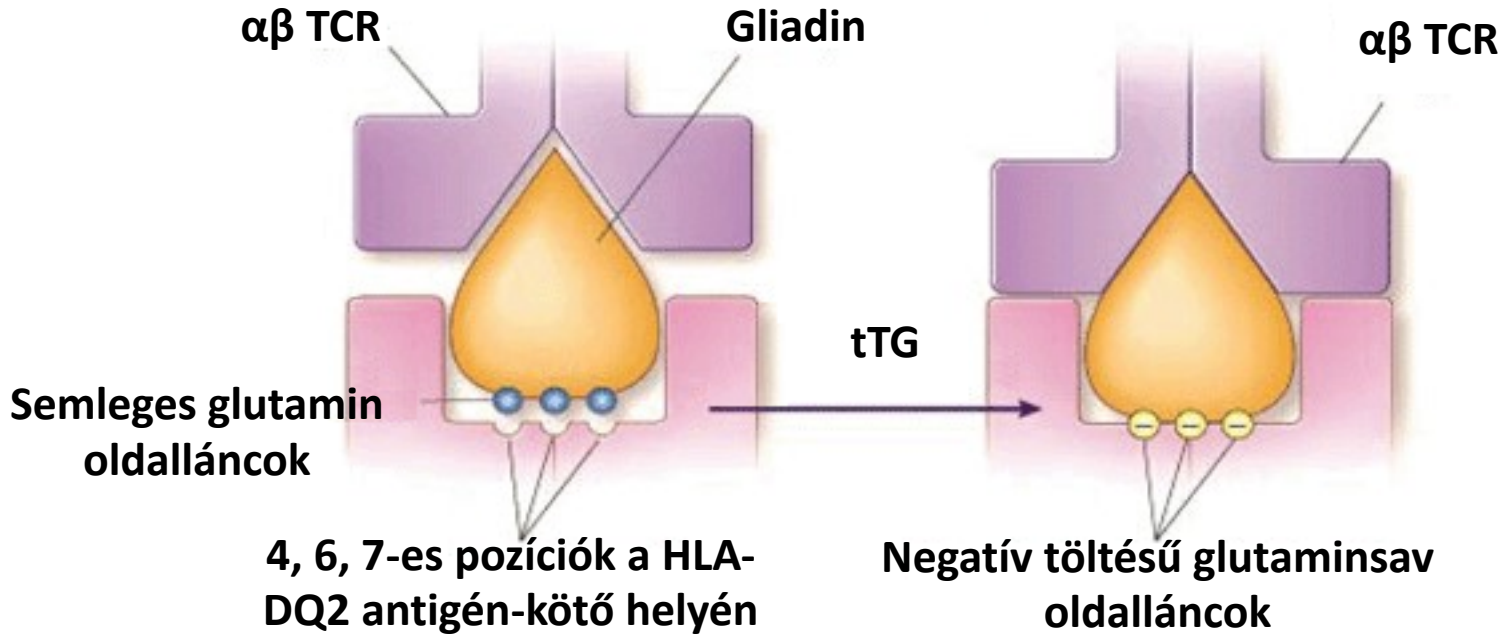
- **Bechterew-kór** (Spondylitis ankylopoetica, AS): **HLA-B27**
- Az AS-es betegek kb. **90%-a** HLA-B27 pozitív.
- A kaukázusi emberrasszban a HLA-B27 gyakorisága 8%, de Skandináviában már 24%.
- A HLA-B27 pozitív emberek kb. 1,8%-ában jelentkezik manifeszt AS.

A HLA-B27 pozitivitás **csak növeli a valószínűségét** a betegségnek, de **önmagában nem elégséges** annak kialakulásához! (Ez a megállapítás igaz valamennyi HLA-asszociált betegség esetében.)



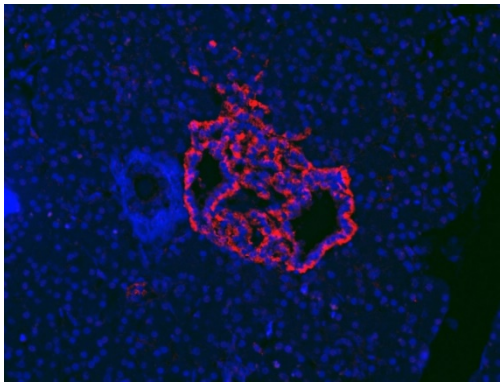
HLA betegség-asszociációk 2.

- **Lisztérzékenység** (Coeliakia, glutén-szenzitív enteropathia): **HLA-DQ2** és **HLA-DQ8**
- A lisztérzékeny betegek kb. **98%-ában** jelen van legalább az egyik. (legerősebb ismert HLA-asszociáció, és a legjobban értett szerep a patogenezisben)
- A kaukázusi emberrasszban a HLA-DQ2 gyakorisága 30%, a betegség prevalenciája viszont csak 1%. → Önmagában nem elégséges a betegséghez.
- A többi MHC-hez képest ezek **erősebben képesek megkötni a gliadint**, különösen a deamidált formát.



HLA betegség-asszociációk 3.

- **I-es típusú diabetes mellitus** (IDDM): **HLA-DR3, HLA-DR4**
- HLA-DR3-DQ2 → 3X kockázat
- HLA-DR4-DQ8 → 10X kockázat
- **HLA-DR3-DR4 heterozigóta → 25X kockázat**
- HLA-DQ6.2 → 0,1X kockázat (védőszerep)



Direkt IF: Humán Langerhans sziget (IDDM-es beteg)
Zöld: Inzulin (hiányzik)
Piros: glukagon
Kék: sejtmagok

TDK

- Intézetünk főbb kutatási profiljai röviden:
  - A **nyirokszövetek szerveződésének** és az **immunsejtek recirkulációjának** vizsgálata
  - A **T-sejtek** szerepének vizsgálata **rheumatoid arthritis egérmodellen**
  - **Regulatórikus T-sejtek** jelátvitele, szerepük autoimmun kórképekben (főleg SSc-ben)
  - **Glükortikoidok** hatásmechanizmusai, hatásuk T-sejtekre
  - Az **immunrendszer evolúciójának** vizsgálata **gerinctelen állatmodellen**
  - A **védőoltások hatékonyságának** monitorozása **immunszerológiai** módszerekkel
- A pontos témák az alábbi linken érhetők el, érdeklődni a témavezetőknél lehet. **Saját ötlettel** is elő lehet állni, ha immunológiai szempontból érdekes és intézetünkben vizsgálható is. **http://www.immbio.hu/hu/tdk-temak**

I WANT YOU

FOR STUDENT RESEARCH!

Hivatkozások (nincs sorban)

- 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.

Hivatkozások

- 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.