



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



14. gyakorlat: HLA tipizálás

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Pécs, 2024

Tumor Specifikus Antigén

- TSA- testi sejteket érintő mutációk, amelyeket valamilyen kémiai karcinogének, vírusok vagy sugárzások indukálnak
- Minden egyes karcinogén hatás egy egyedi és specifikus antigént érint. **NINCS ÁLTALÁNOS TUMOR SPECIFIKUS ANTIGÉN!**
- Az immunrendszer a TSA-t az egyedi MHC-haplotípus alapján ismeri fel és támadó típusú immunválasz *vagy* tolerancia indukálódik

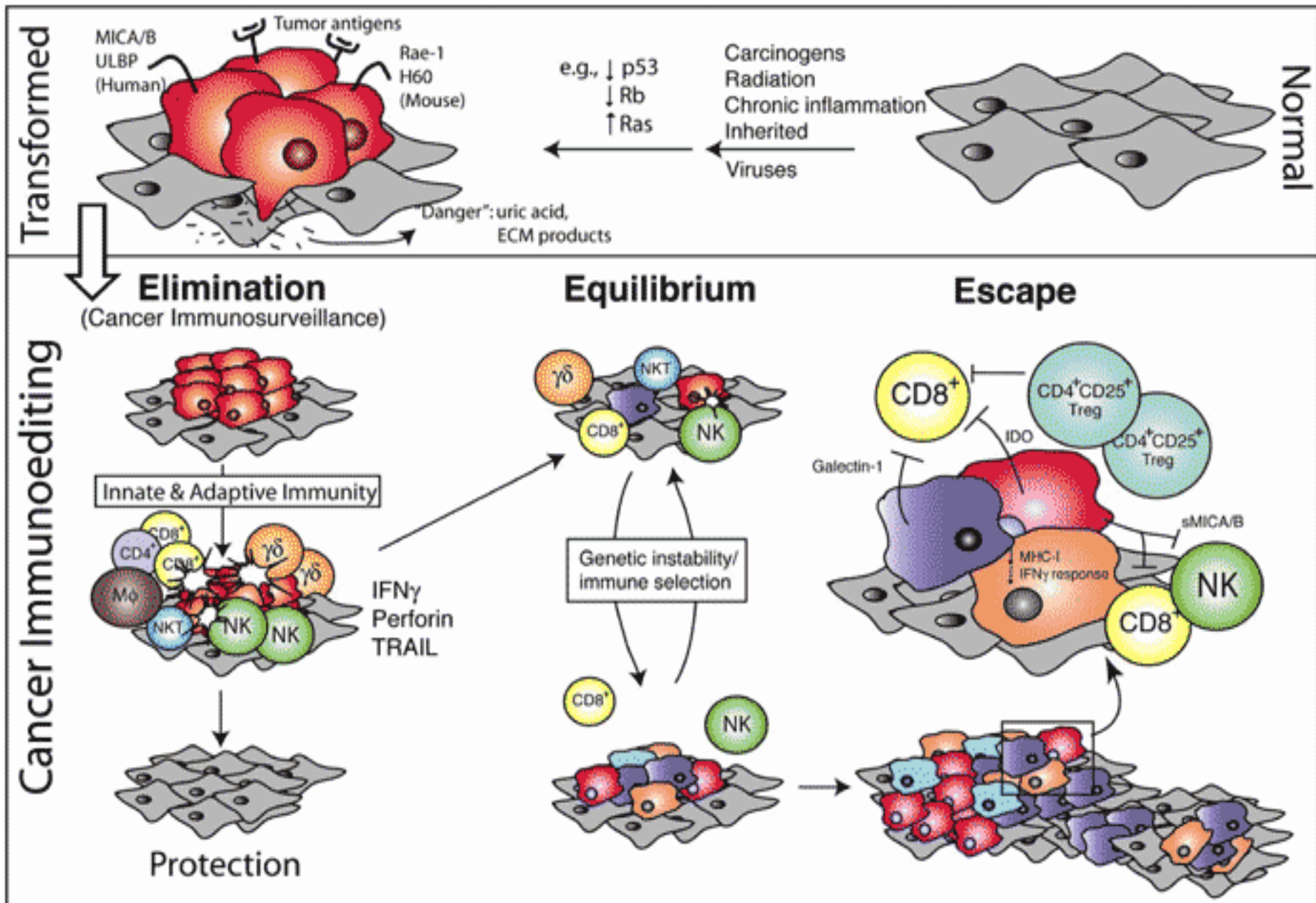
Tumor Asszociált Antigén

Normál és sérült sejtekből származó molekulák is lehetnek tumor asszociált antigének (pl.: hormonok, növekedési faktorok, sejtfelszíni molekulák stb.)

TA antigének nem kizárólag tumoros transzformáció következtében képződhetnek, ugyanakkor a TAA-k expressziós mintázata jellemző lehet egyes tumortípusokra és használhatóak a továbbiakban differenciál *diagnosztikai markerként* vagy a terápia hatékonyságának nyomonkövetésére.

Tumor markerek

Tumormarker	Rövidítés	Onkológiai alkalmazás
Alfa-foetoprotein	AFP	Liver and germ cell tumors
Cancer antigen 125	CA 125	ovarian tumors
Cancer antigen 15,3	CA 15,3	Breast cancer
Cancer antigen 72,4	CA 72,4	Gastric cancer
Cancer antigen 19,9	CA 19,9	Pancreatic cancer
Carcinoembrional antigen	CEA	Gastrointestinal cancers
Neuronspecific enolase	NSE	Small cell lung cancer
Prostate specific antigen	PSA	Prostate cancer
Squamous cell carcinoma antigen	SCC	Planocellular cancers
Tissue polypeptide antigen	TPA	Urinary bladder and lung cancer
Tissue polypeptide-specific antigen	TPS	Metastatic breast cancer



Tumorelleses terápia

Sebészi beavatkozás, sugár- vagy kemoterápia kiegészítő kezeléseként alkalmazható immunológiai terápiák:

- **Monoklonális antitest terápia**
- **Checkpoint inhibitorok (PD-1/PDL-1)**
- **Immun-moduláció**
- **Tumor vakcinák**
- **Onkolitikus vírusok**

Host versus graft reakció

- Előzetesen meglévő antitestek által okozott hiperakut kilökődés
- ADCC és DTH- mediálta akut kilökődés
- Krónikus endotél sérülés és komplement aktiváció okozta krónikus kilökődés

Csontvelő transzplantáció

Előnyök	Hátrányok
Autológ	Allogén
Nincs GVH Nincs kilökődés Nem kell HLA egyezés	GVH Kilökődés HLA egyezés Tumorsejt a donorból
Allogén	Autológ
Nincs tumor átvitel graft vs. tumor hatás myeloszuppresszió elkerülhető	Tumorsejt átvitel (myeloszuppresszió lehetséges)

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 hisztokompatibilitás mértéke határozza meg.

- **Nobel-díj (1980)**



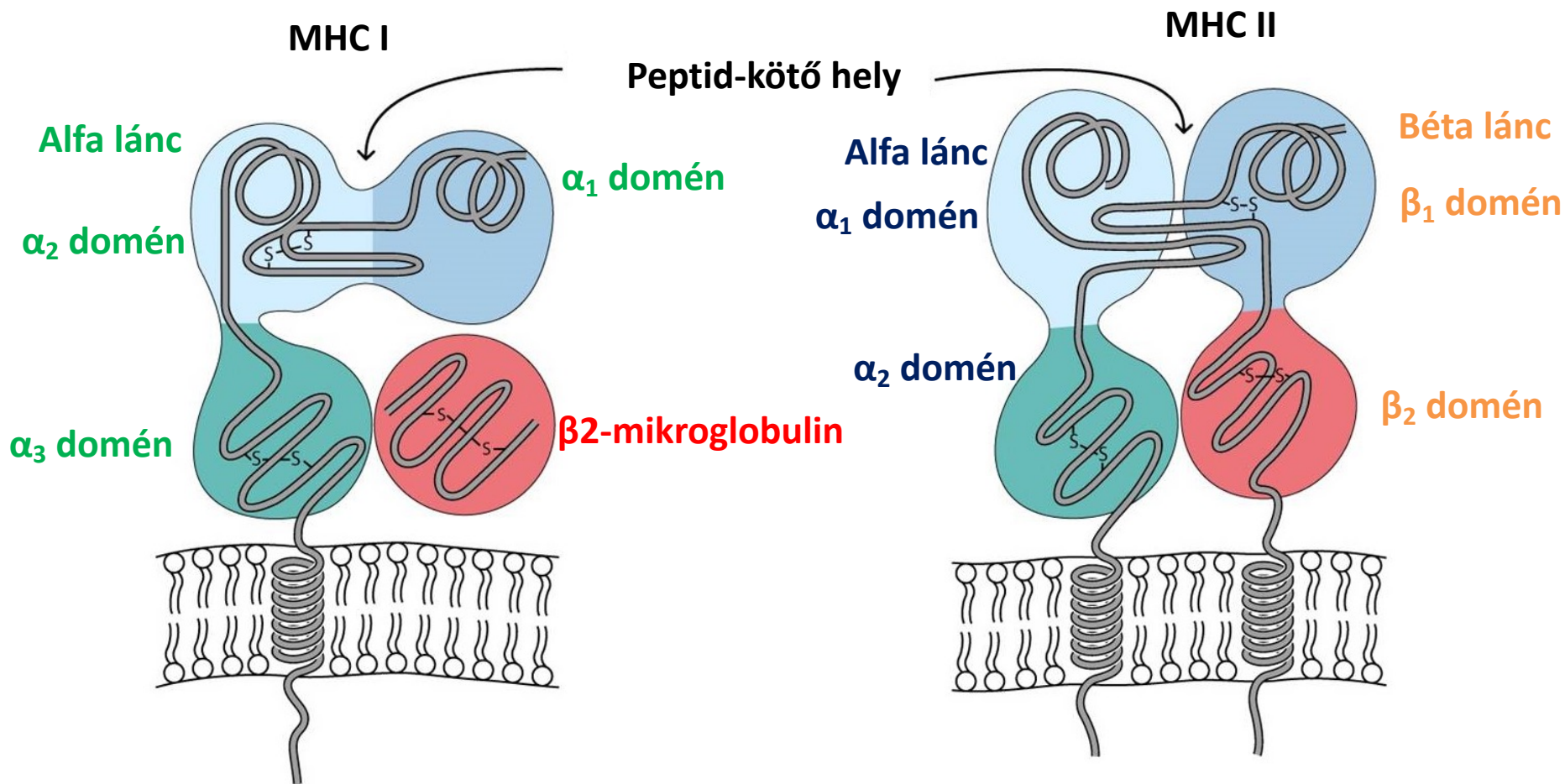
Baruj Benacerraf Jean Dausset George D. Snell
(1920 - 2011) (1916 - 2009) (1903 - 1996)

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**: Bechterew-kór, gyulladáisos 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)

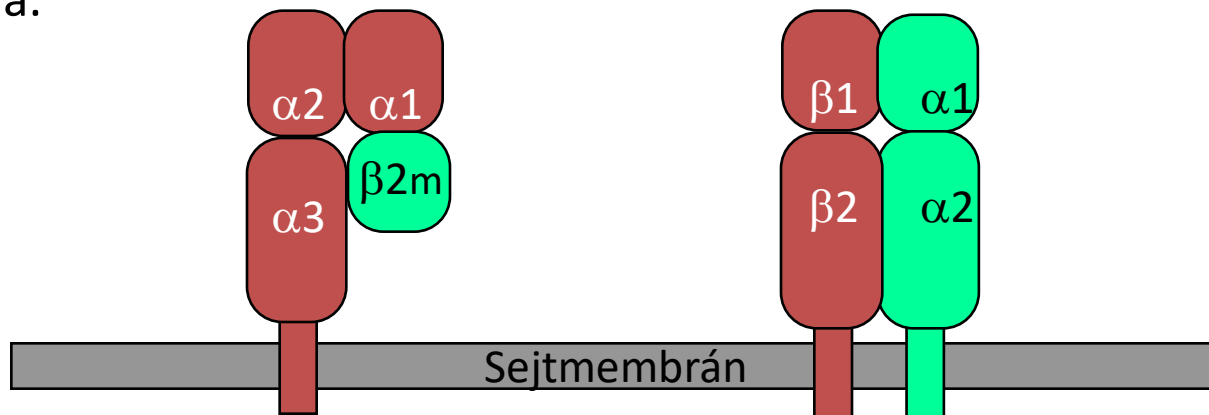


Minden magvas sejten és trombocitákon!

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

HLA I. osztály

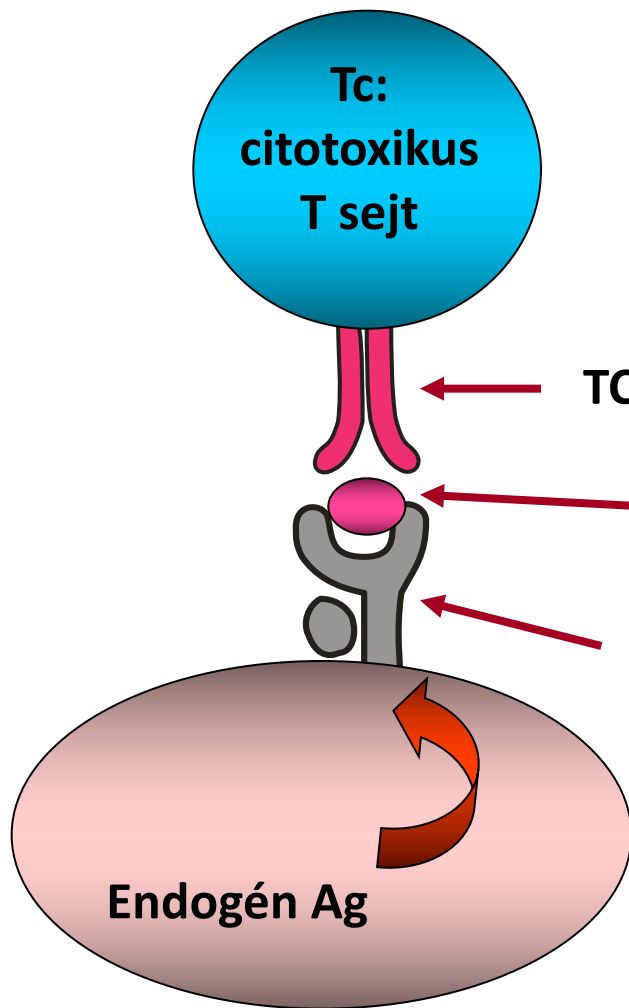
- HLA-A, B, C gének
- Minden magvas sejt felszínén és a TCT is megtalálhatóak.
- A kifejeződés szintje eltérő:
 - erőteljes az immunrendszer sejtjein;
 - alacsony pl. az idegsejteken, szívizomsejteken
 - alfa lánc és $\beta 2$ microglobulin alkotja.



HLA II. osztály

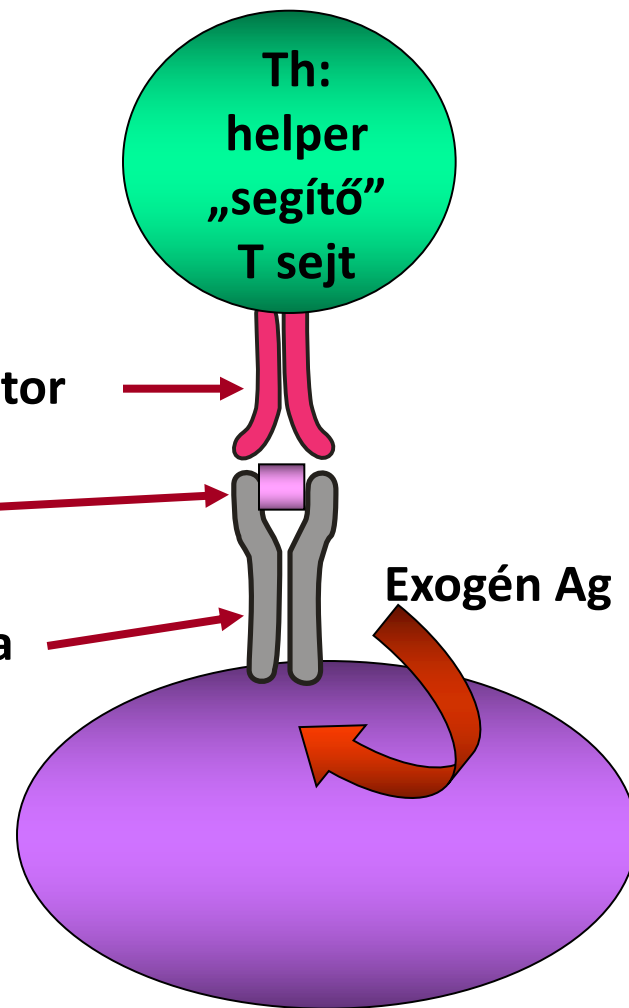
- HLA-DR, DQ, DP gének
- Az immunrendszer sejtjeinek felszínén találhatóak (hivatásos antigén prezentáló sejtek):
 - B limfociták
 - dendritikus sejtek
 - makrofágok
- Indukálhatóak: endotélien.
- Alfa és béta lánc alkotja.

HLA I. osztály



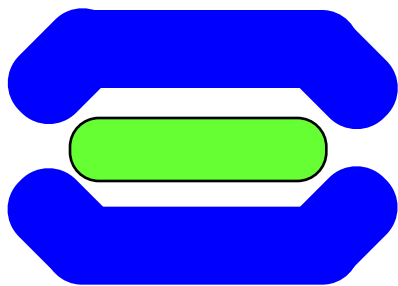
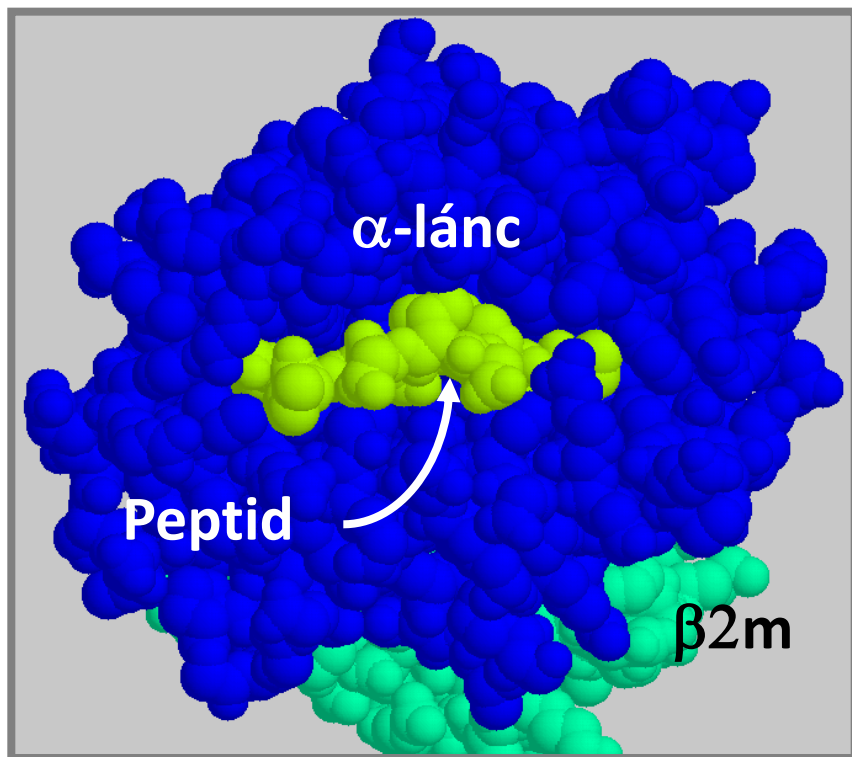
Endogén fehérjékből származó peptidek
(saját, vírus, intracelluláris baktérium, tumor)

HLA II. osztály



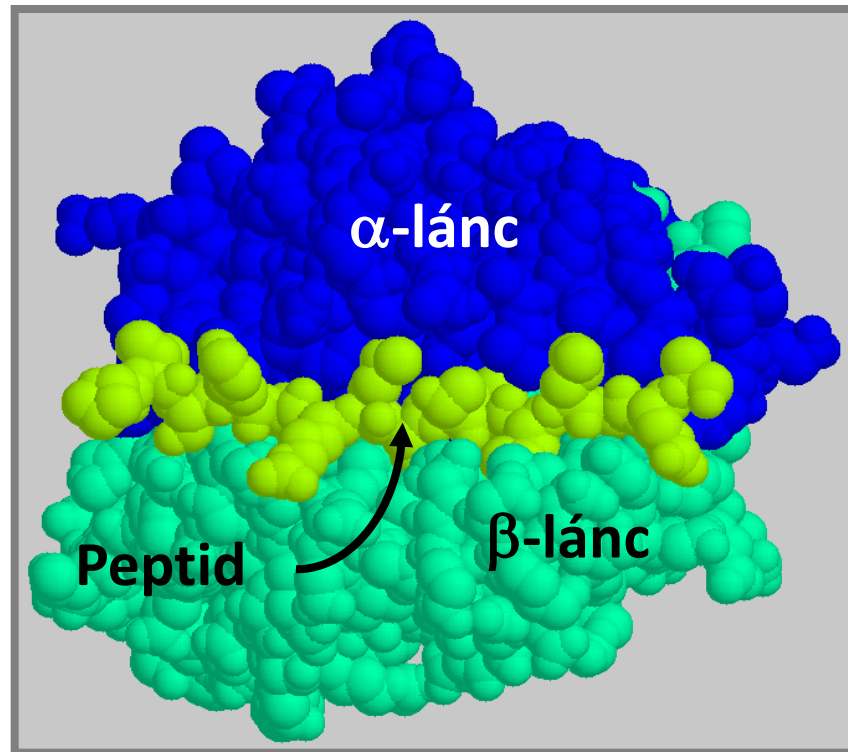
Exogén fehérjékből származó peptidek
(extracelluláris patogén, allergén)

HLA I. osztály



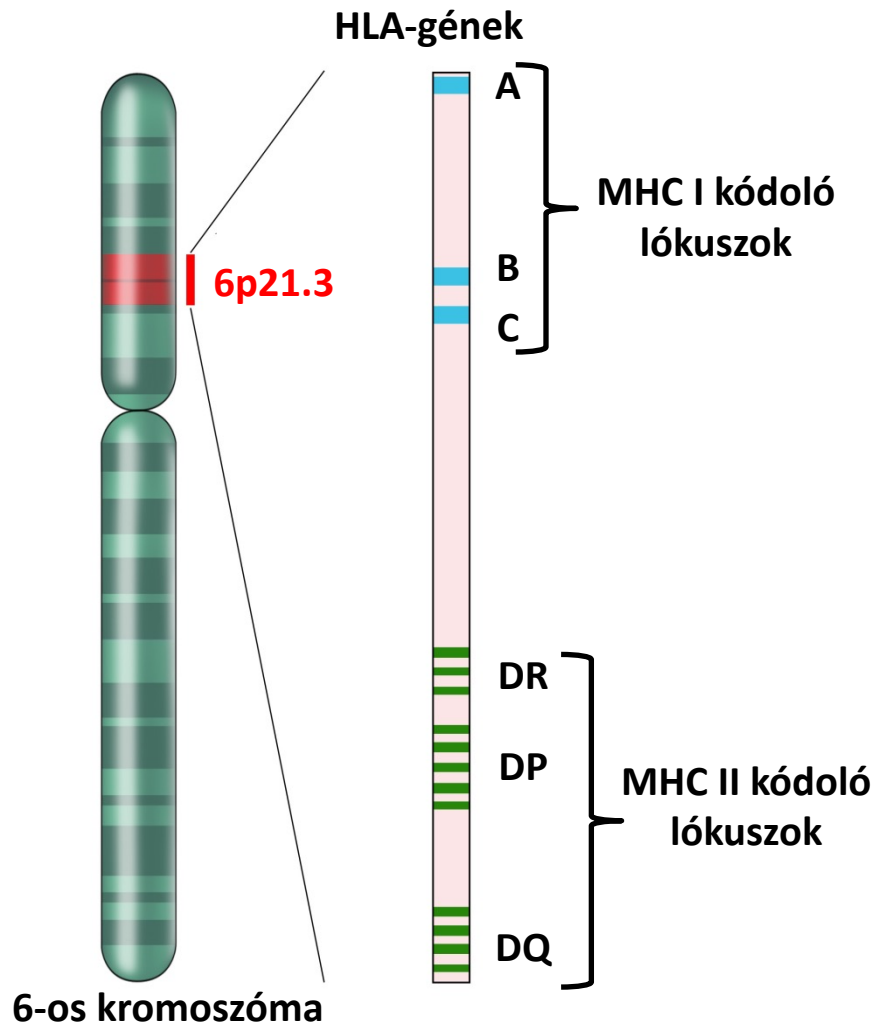
8-10 aminosav
hosszúságú peptideket köt

HLA II. osztály



>13 aminosav
hosszúságú peptideket köt

HLA öröklődés: MHC lókuszek



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

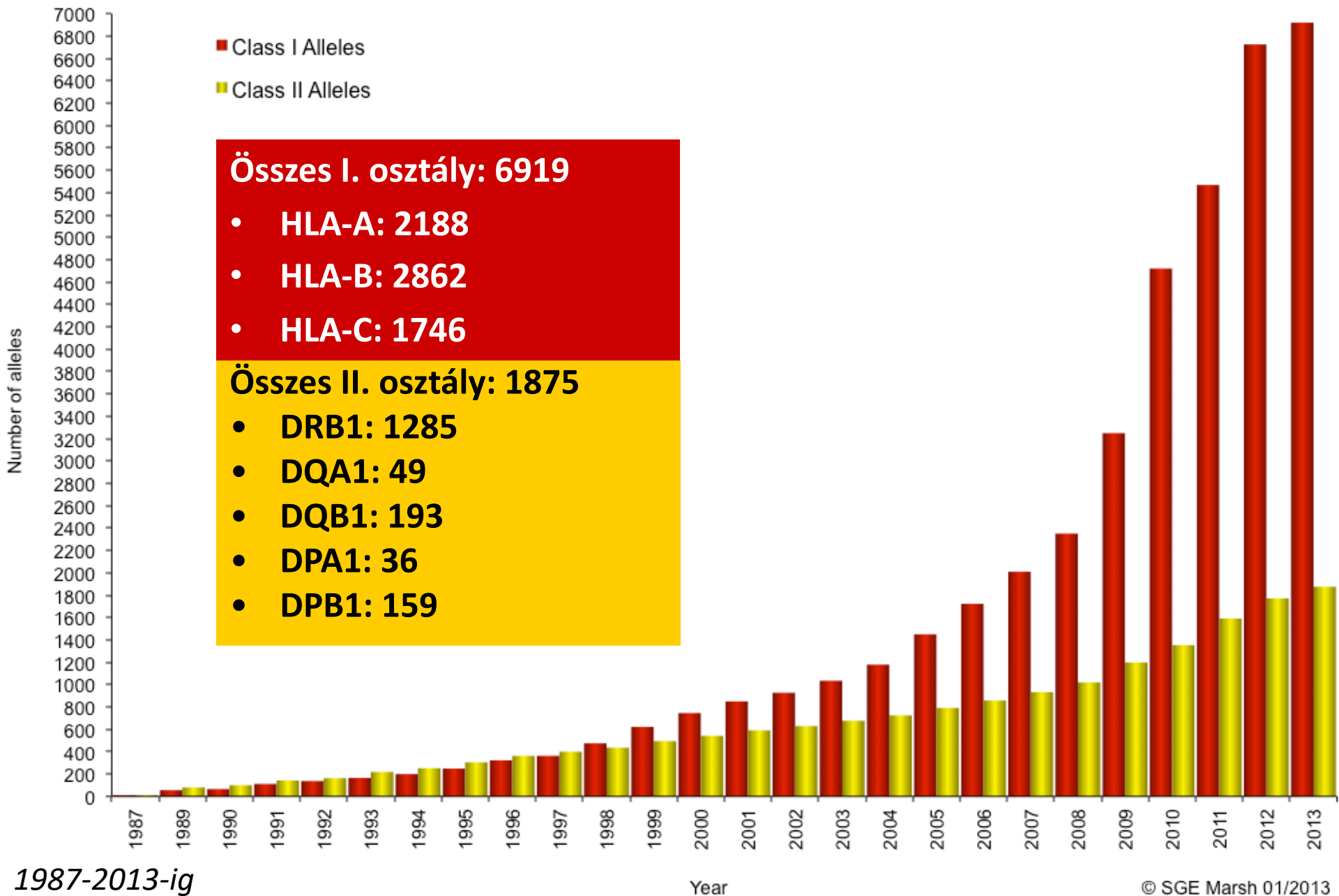
- **MHC I**-nél csak **egy lánc** van, pl: **HLA-B*27:01** → 27-es szerológiai csoportú B típusú MHC I
- Az **MHC II** két fehérjeláncból álló **heterodimer**.

HLA-DQA1:05:01

1. **Milyen típusú MHC gént kódol?**
PI: A, B, C, DQ, DR, DP
2. **Lókuszt (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



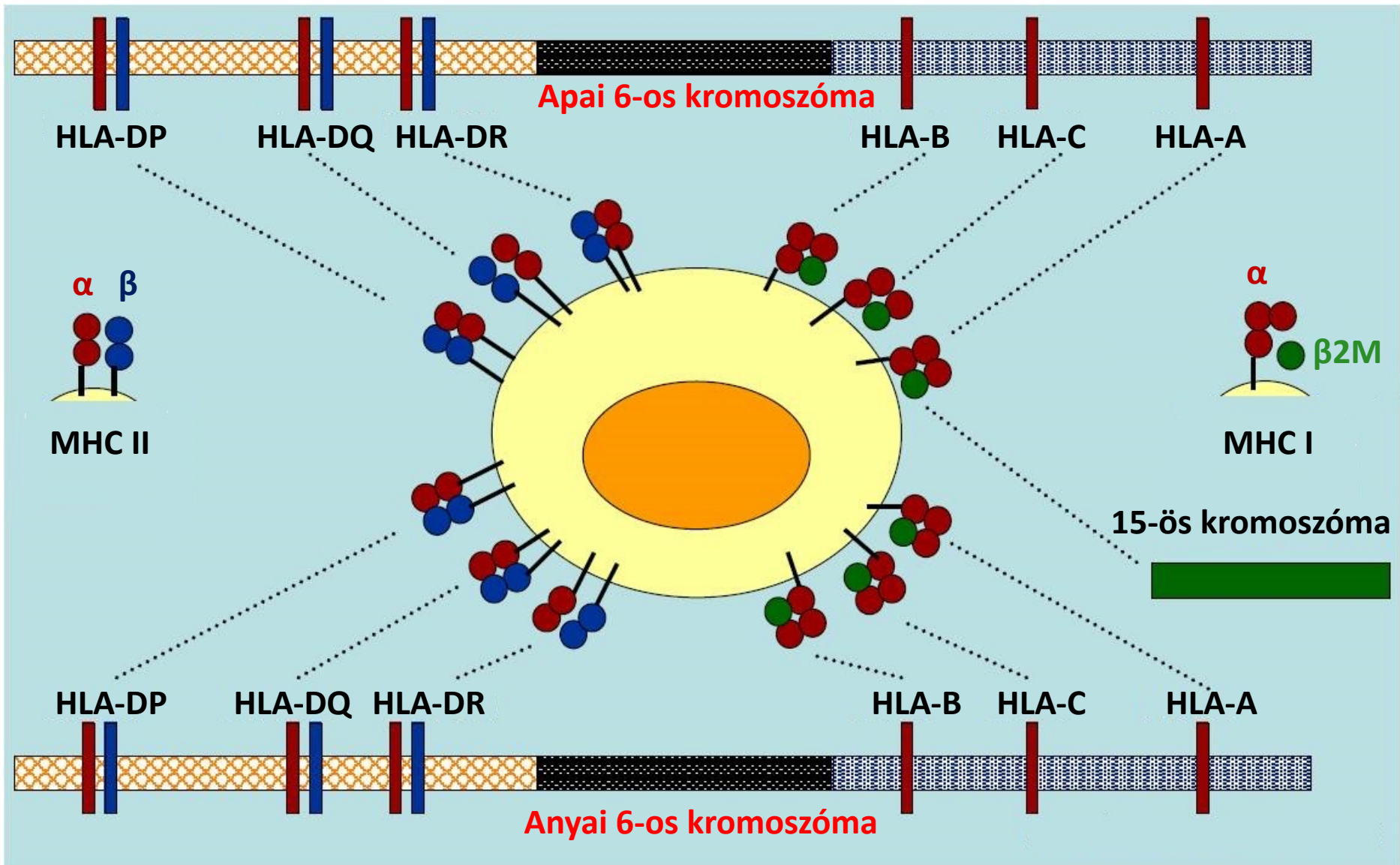
HLA-k öröklődése

- **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.



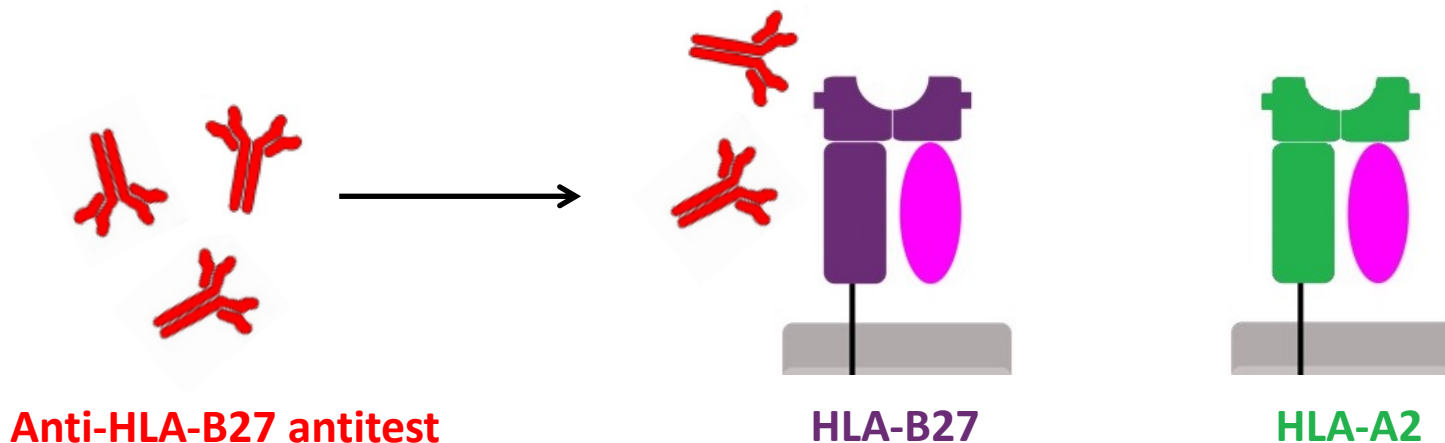
Mindenki egy rá jellemző **MHC készlettel** rendelkezik, eltérő peptid-kötő tulajdonságokkal.

Kodomináns expresszió



HLA szerotípus vs genotípus

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



- HLA **genotípus**: Az MHC fehérjét 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**

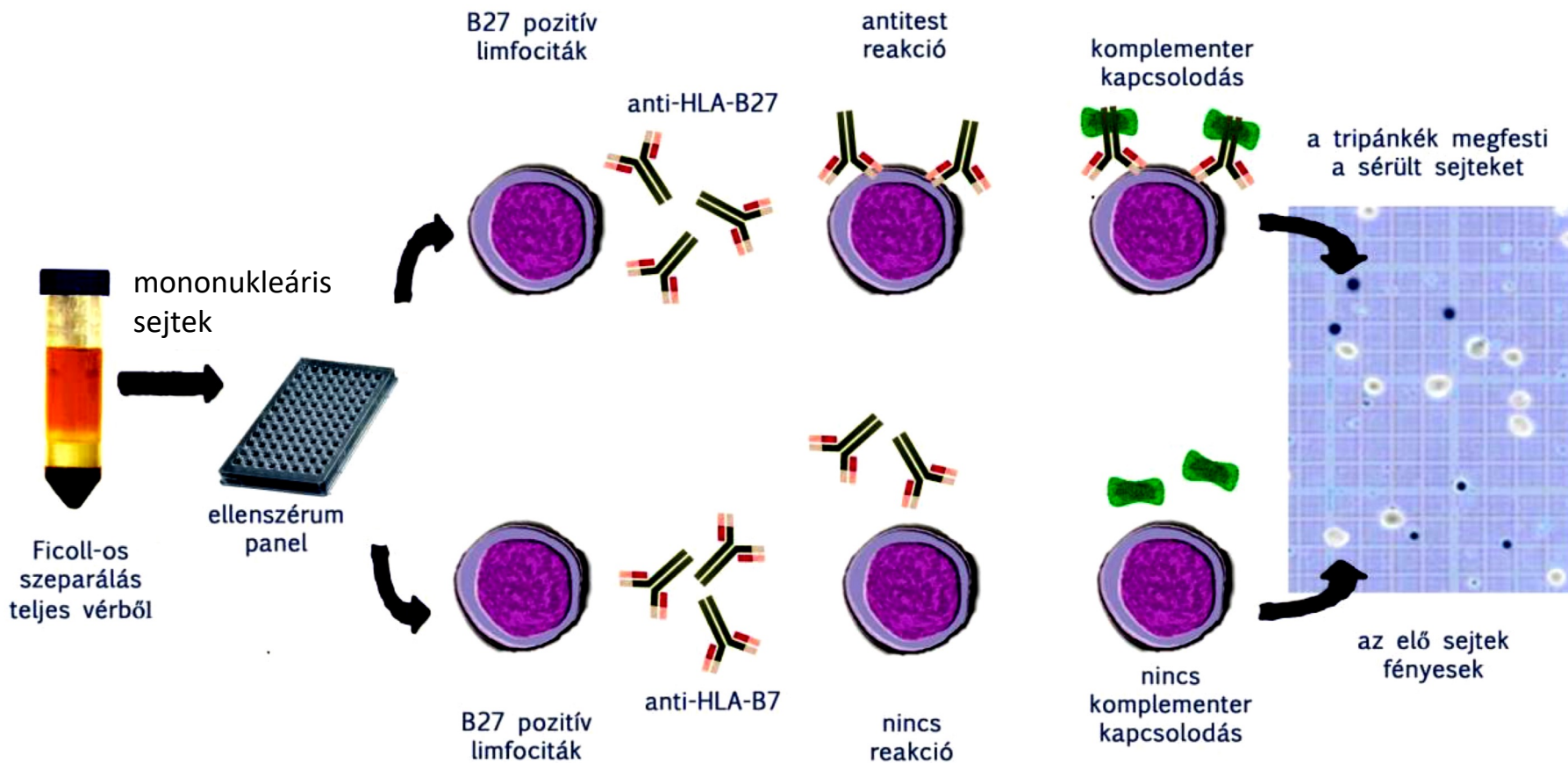
Többnyire a molekuláris **biológiai módszereket részesítik előnyben**, mert:

- **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

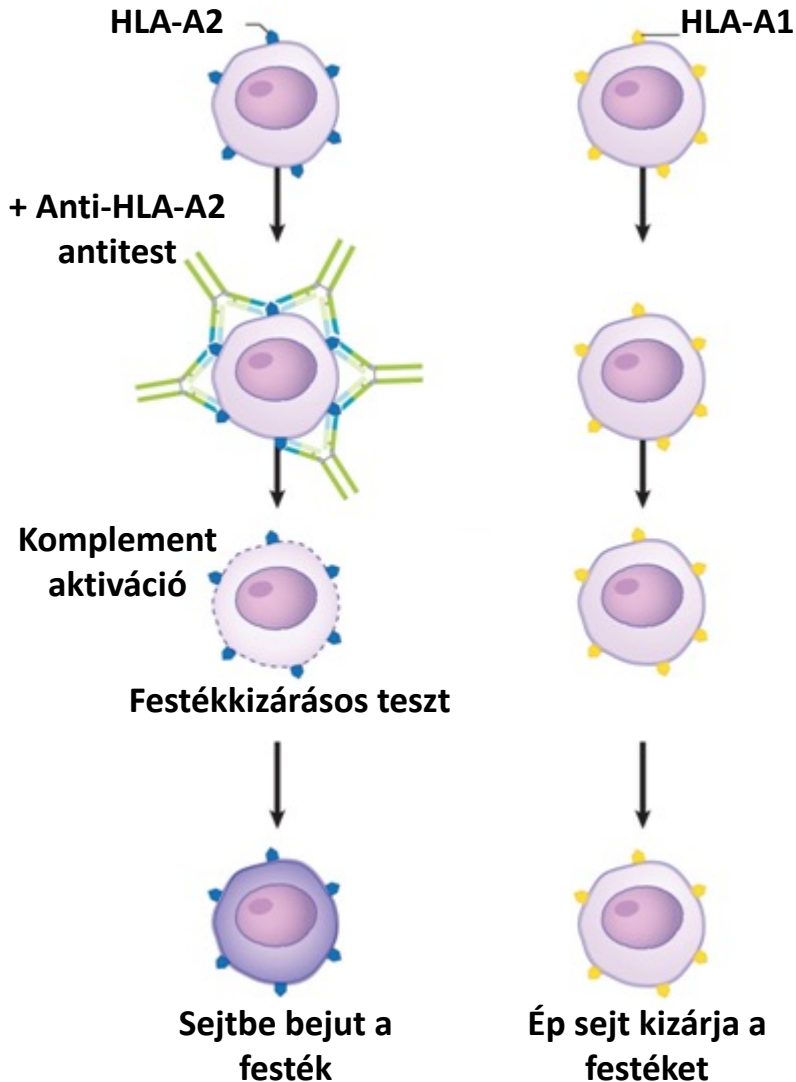
- 1. Tipizálás** - HLA antigének polimorfizmusának vizsgálata: ismert specificitású ellenanyagokhoz adunk ismeretlen antigenitású limfocitákat.
- 2. Antitestszűrés - PRA** (panel reaktív antitest) vizsgálat - HLA antigénekkal szemben képződő ellenanyagok kimutatása: ismert antigenitású sejtpanelhez adunk kivizsgálendő 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

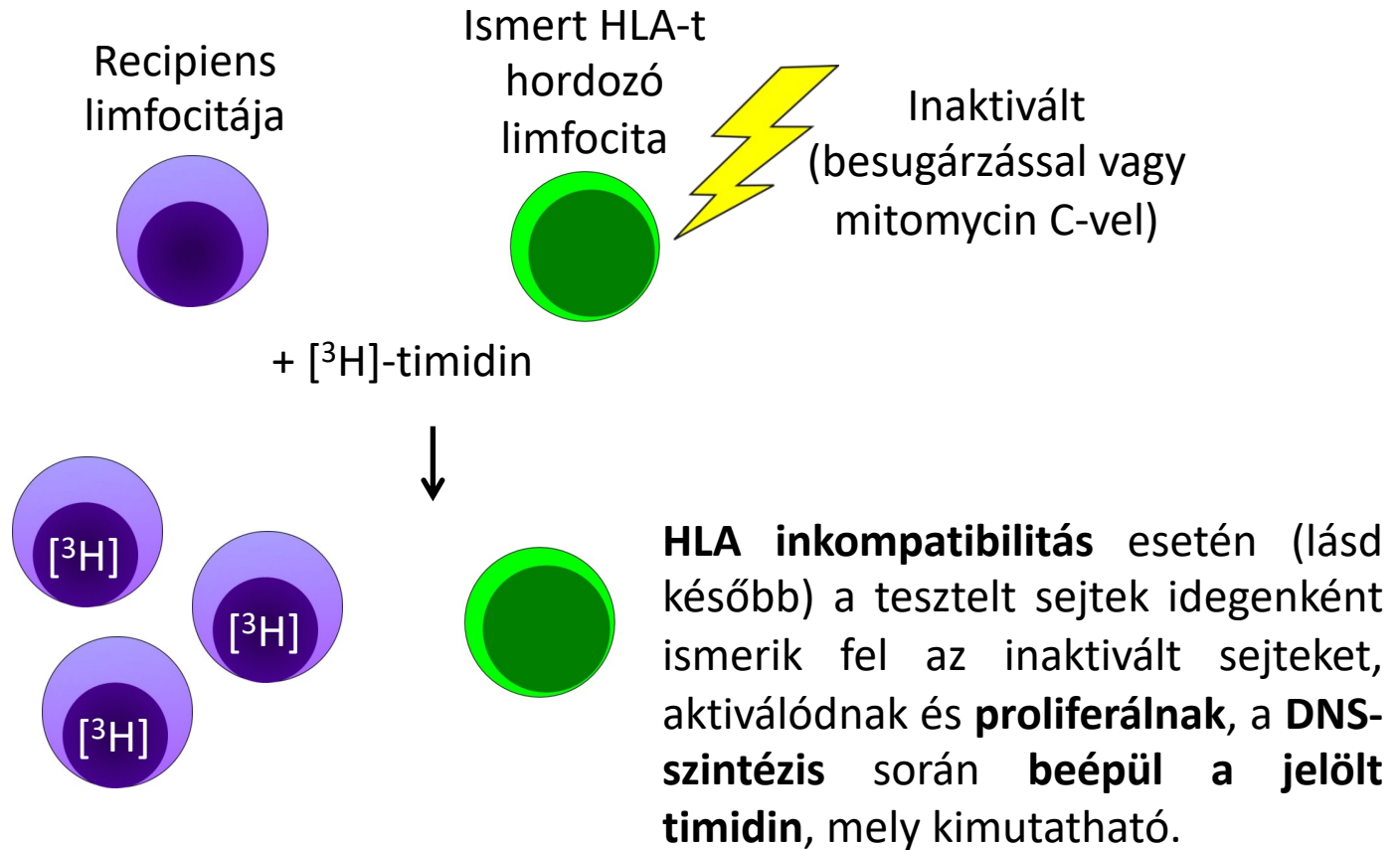


Transzplantációk előtt a donor és a recipiens kompatibilitásának vizsgálatára használják. Pl.:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Donor	●	○	○	○	○	○	●	○	○
Recipiens 1	●	○	○	○	○	○	●	○	○
Recipiens 2	○	●	●	○	○	○	○	○	○

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

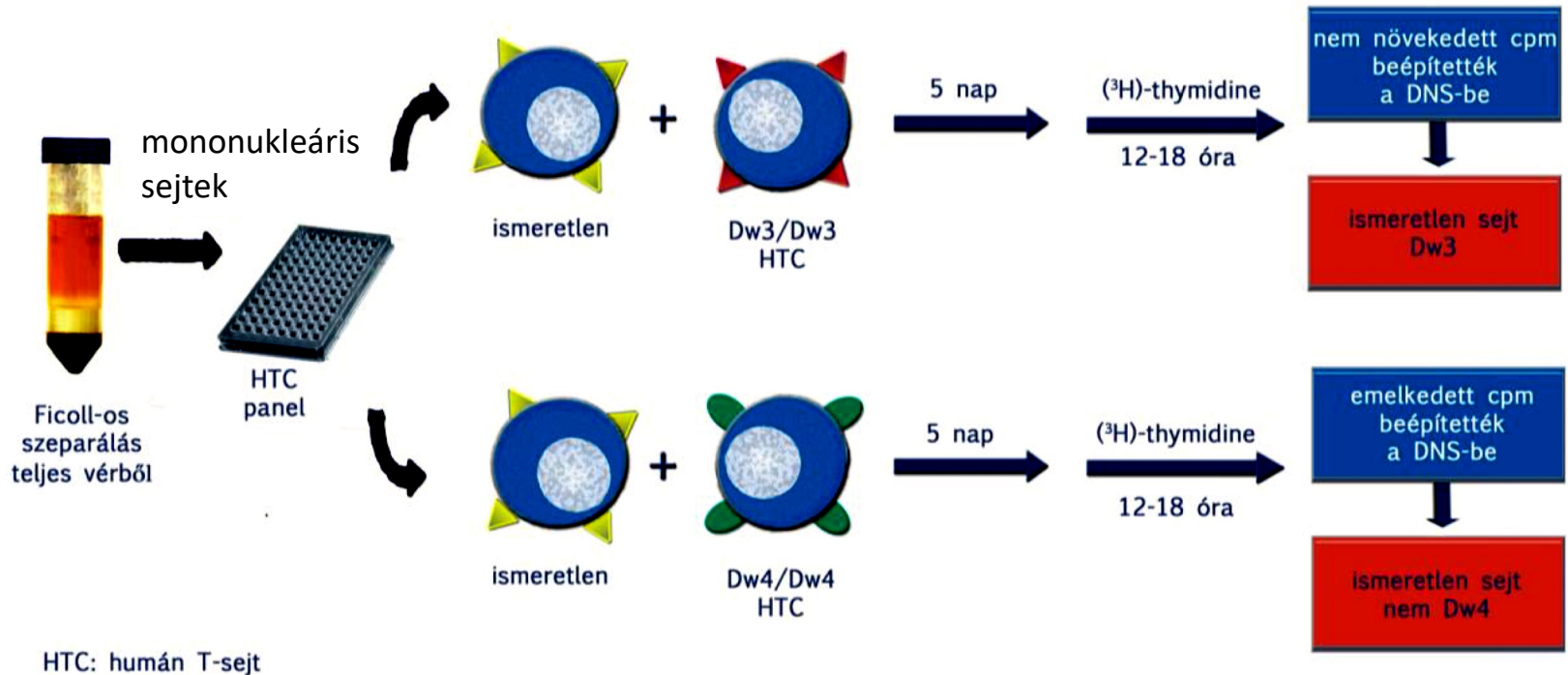
Kevert limfocita kultúra



Felhasználás:

Transzplantációk előtt a donor és a recipiens immunológiai inkompatibilitásának vizsgálata.

Kevert limfocita kultúra (MLC)



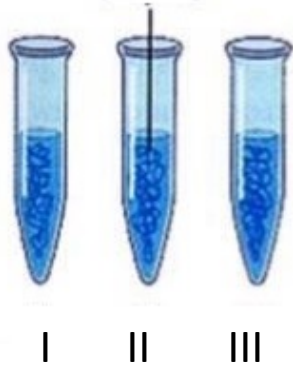
Kevert limfocita kultúra (Mixed Lymphocyte Culture): Két egyén (pl. a beteg illetve egy laboratóriumban fenntartott, ismert, pl. HLA-Dw-t expresszáló) limfocitáit összekeverik egy Petri csészébe és pár napig együtt inkubálják őket sejtenyészetben. Amennyiben az ismeretlen (pl. a betegből származó) limfocita 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.

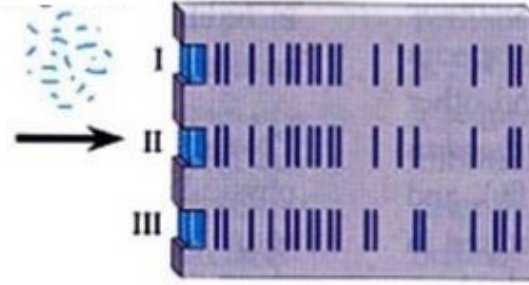
RFLP

(Restriction fragment length polymorphism)

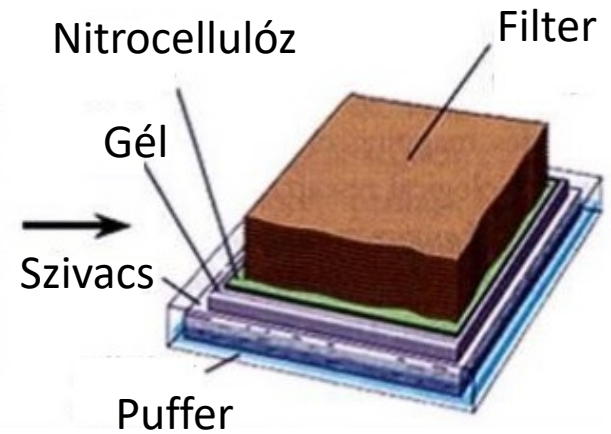
DNS + Restriktációs
endonukleáz



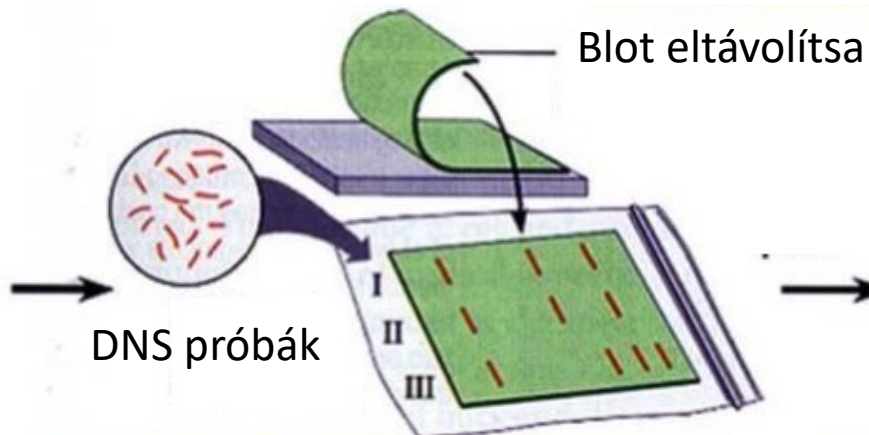
Elektroforézis



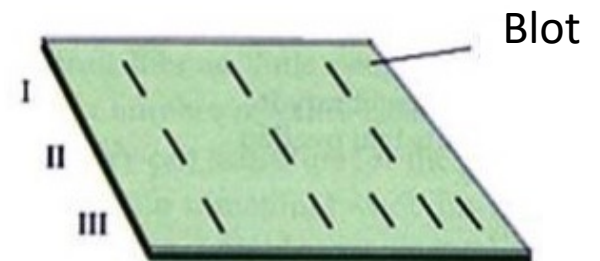
Blottolás



Hibridizáció

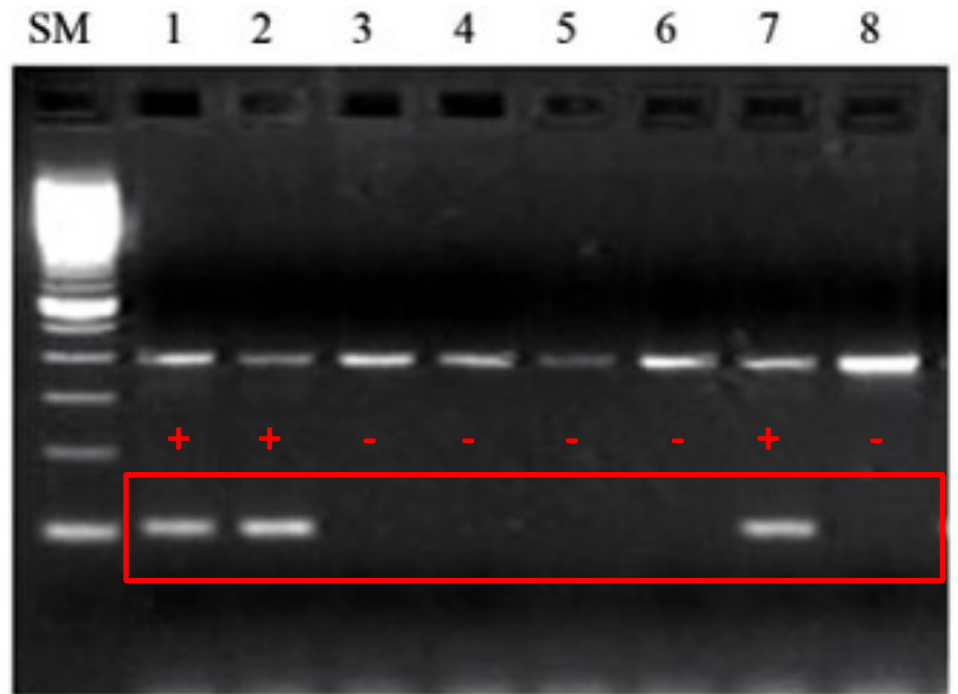
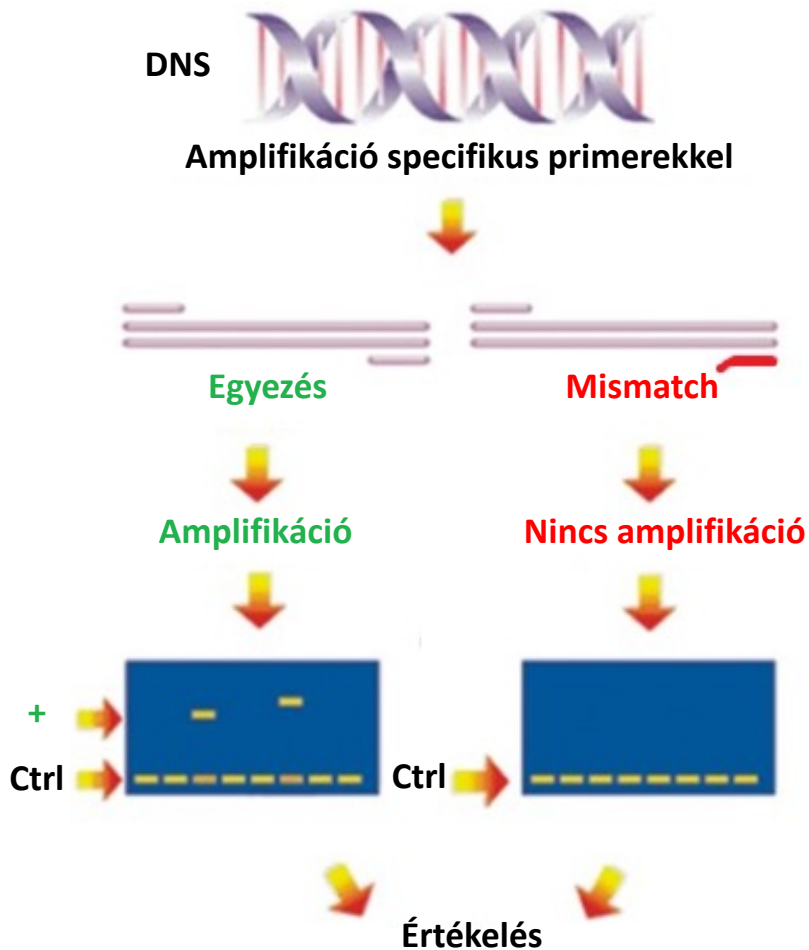


Detektálás



Nem-kötődött próbák kimosása

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.

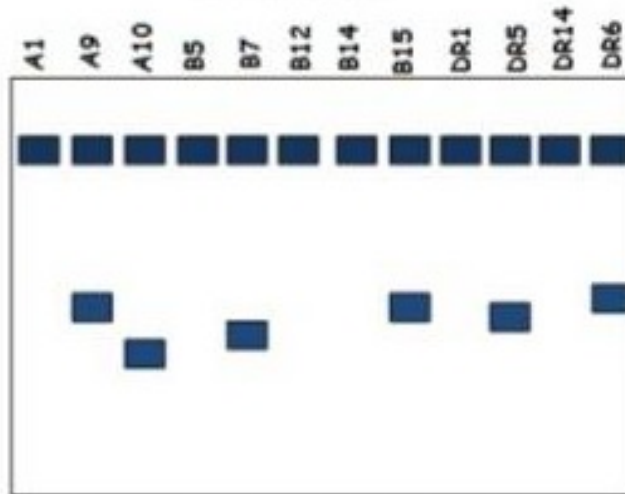
Szervtranszplantációs riadó lépései

- 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.

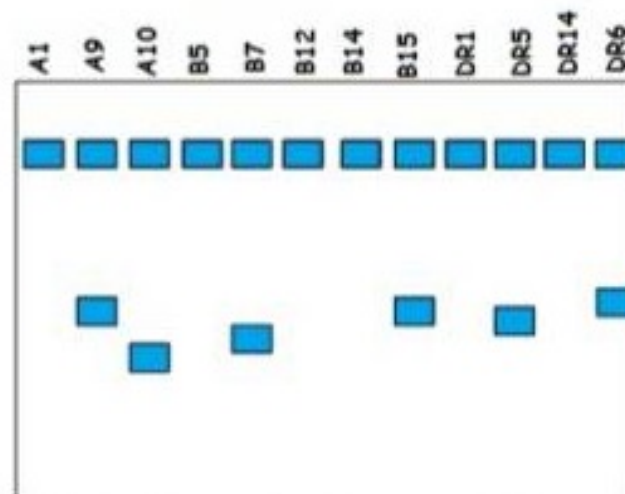
Recipiens



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%.

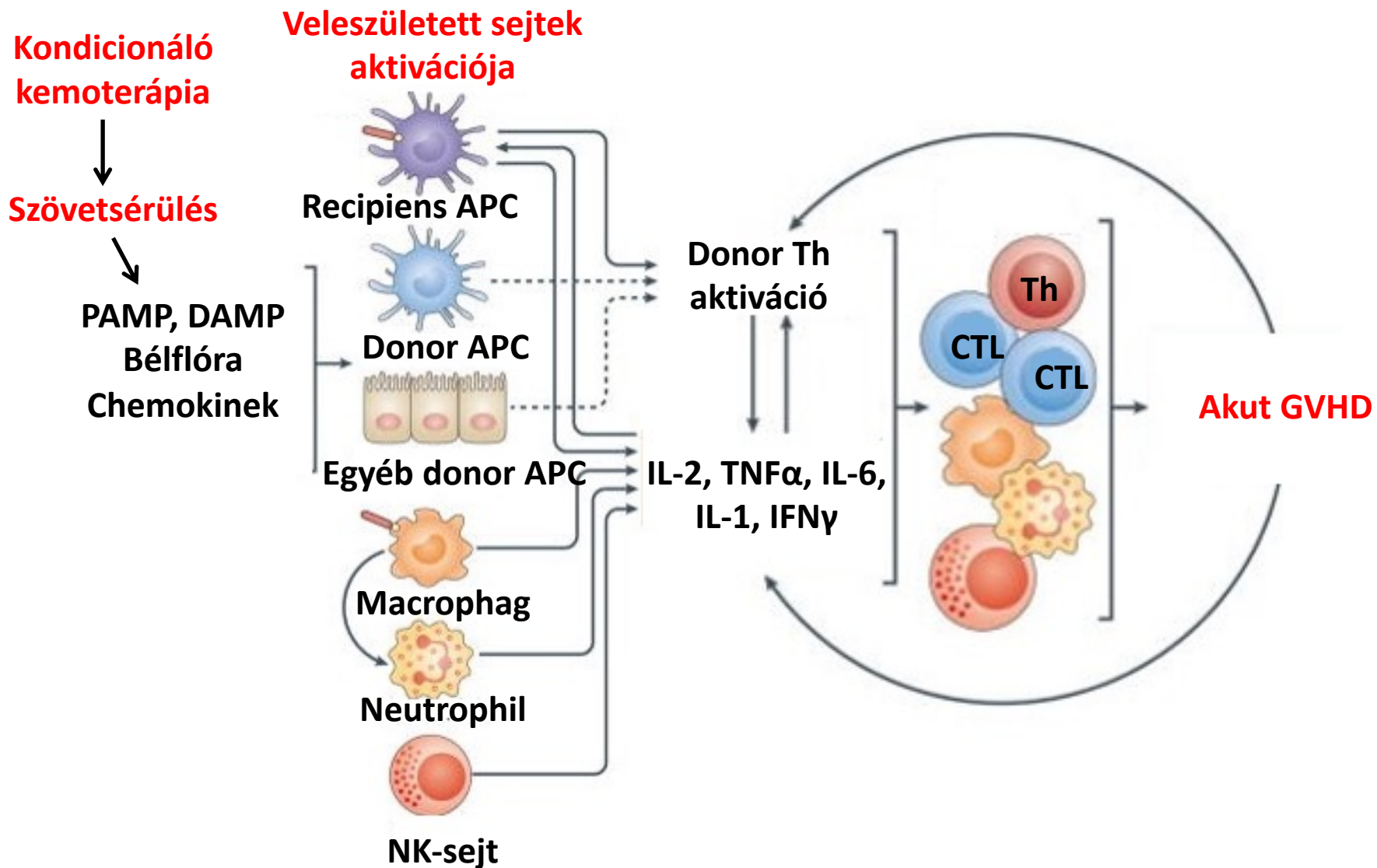


Súlyos bőr GVHD



Akut intesztinális GVHD
(endoszkópos felvétel)

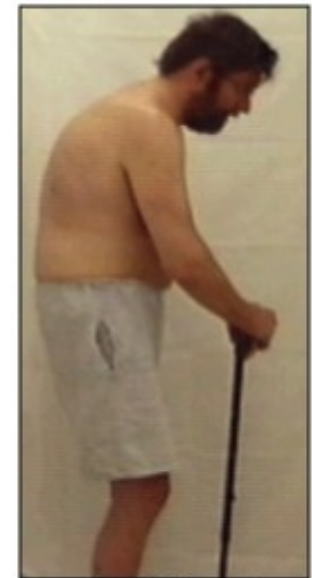
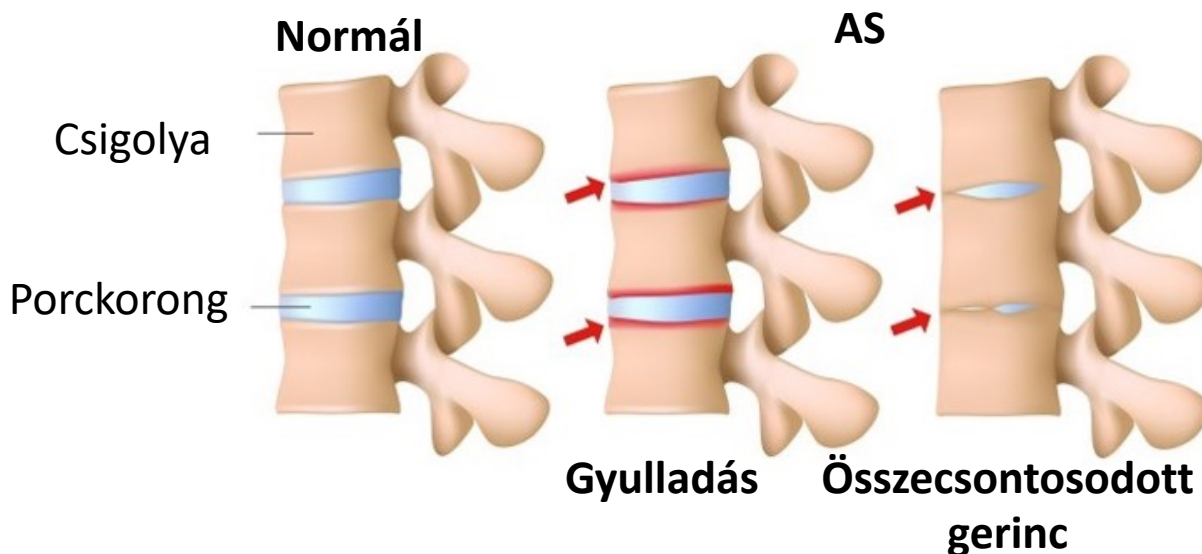
Graft versus host betegség 2. (GVHD)



HLA betegség-asszociációk 1.

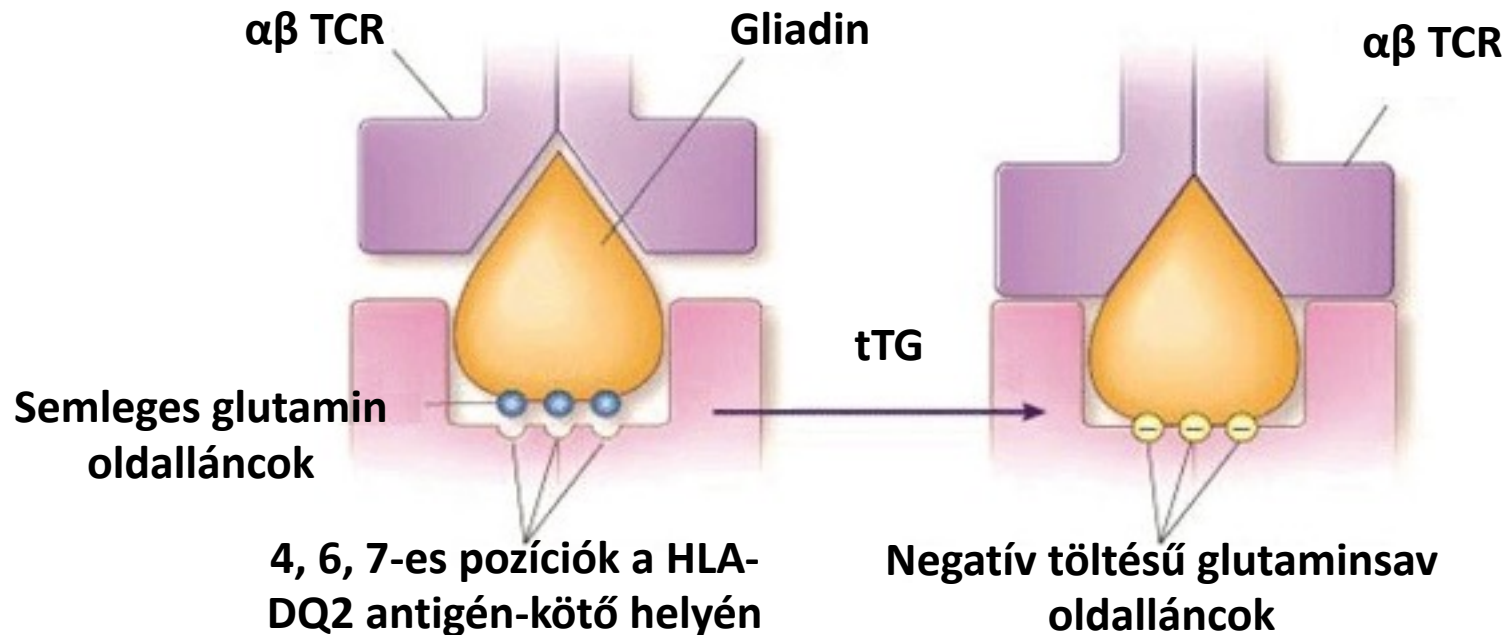
- **Bechterew-kór** (Spondylitis ankylopoetica, AS): **HLA-B27**
- Az AS-es betegek kb. **90%-a** HLA-B27 pozitív.
- A kaukázusi emberrasszban a HLA-B27 gyakorisága 8%, de Skandináviában már 24%.
- A HLA-B27 pozitív emberek kb. 1,8%-ában jelentkezik manifeszt AS.

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



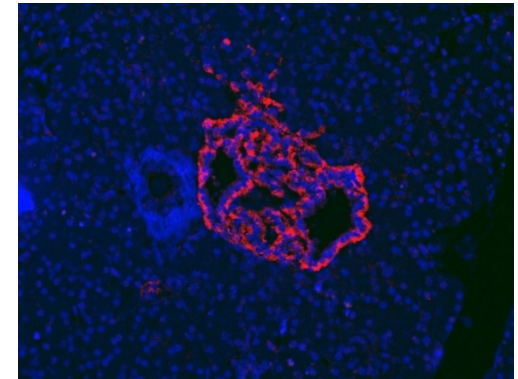
HLA betegség-asszociációk 2.

- **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 emberraszban 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** jelátvittele, 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 E¹, 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 EW¹: **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 A¹: **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 SG¹, 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 PP¹: **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 H¹: **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 A¹, Meyer D²: **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 WH¹, 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 LE¹, Morath C², Suesal C³: **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 WD¹: **Graft-versus-host disease.** *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):340-52.
- Blazar BR¹, 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 E¹, 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 J¹: **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 MA¹, Kenna T¹, Wordsworth BP²: **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 NJ¹: **The ramifications of HLA-B27.** *J R Soc Med*. 2004 Jan;97(1):10-4.
- Karell K¹, 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 D¹, 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 JA¹, 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 ML¹, 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.