

# Обзор методов HLA-типирования

*Наместников Ю.А.*

Санкт-Петербург, 2022г

# Молекулы HLA

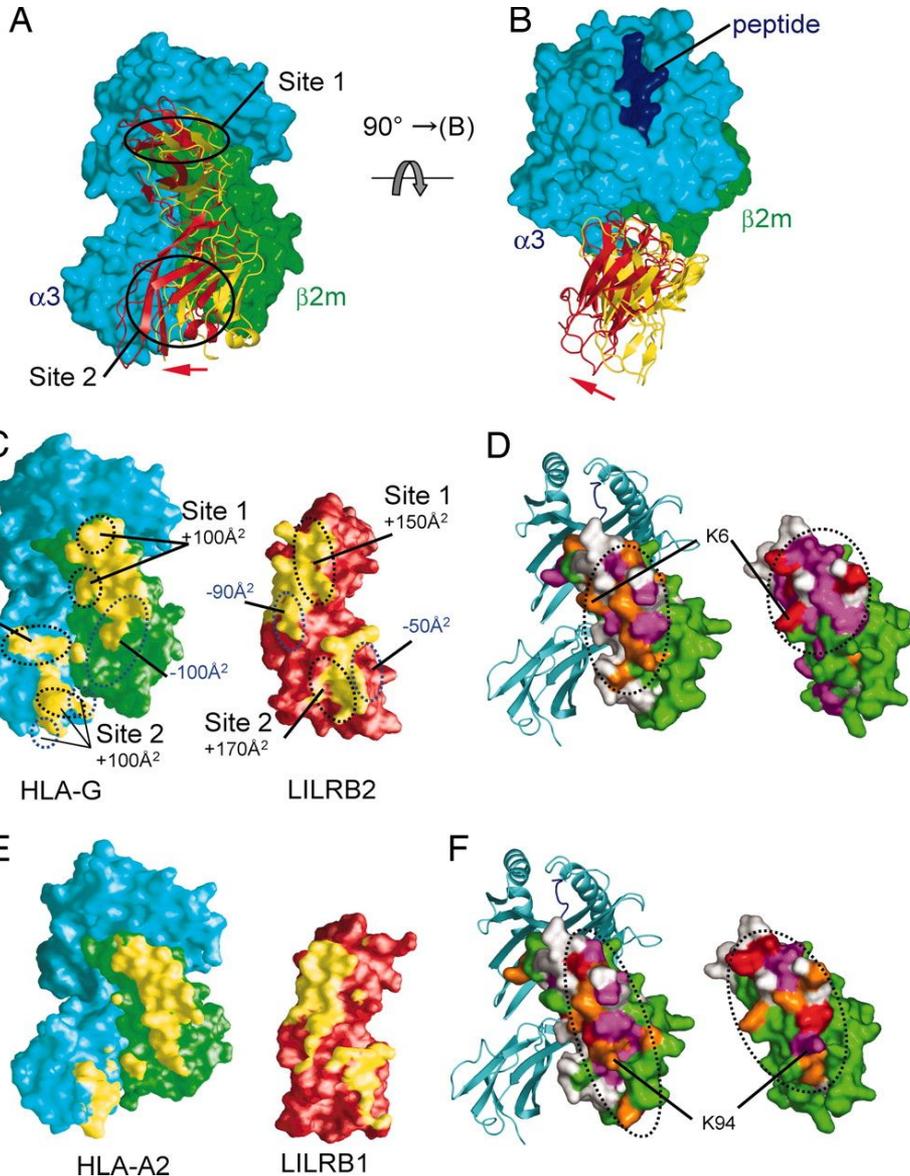
Антигенные свойства молекул HLA определяются третичной структурой белковых цепей, экспрессированных на поверхности клеток



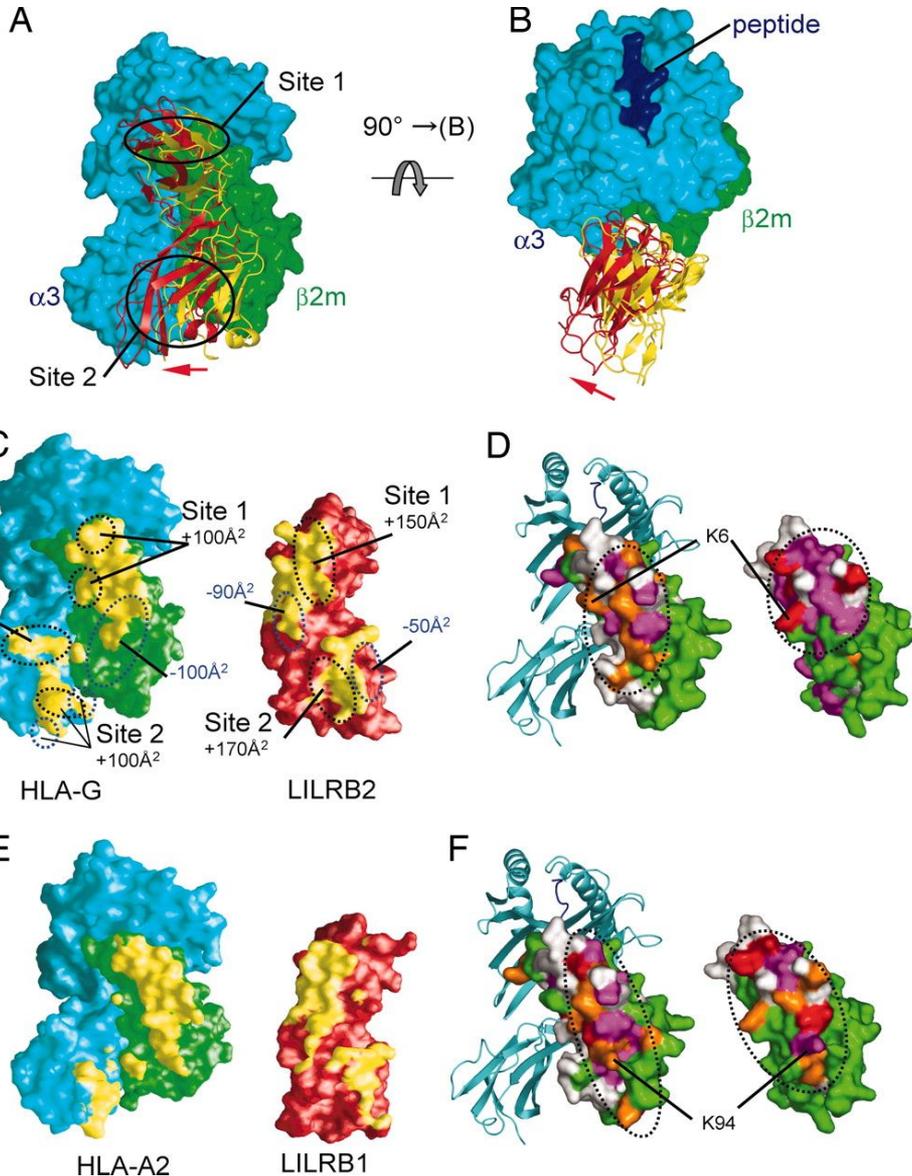
Третичная структура, сформированная преимущественно водородными связями между эпитопами белковой цепи, определяется аминокислотной последовательностью этого белка



Аминокислотная последовательность белка определяется нуклеотидной последовательностью ДНК



# Молекулы HLA



**Иммуногенность**

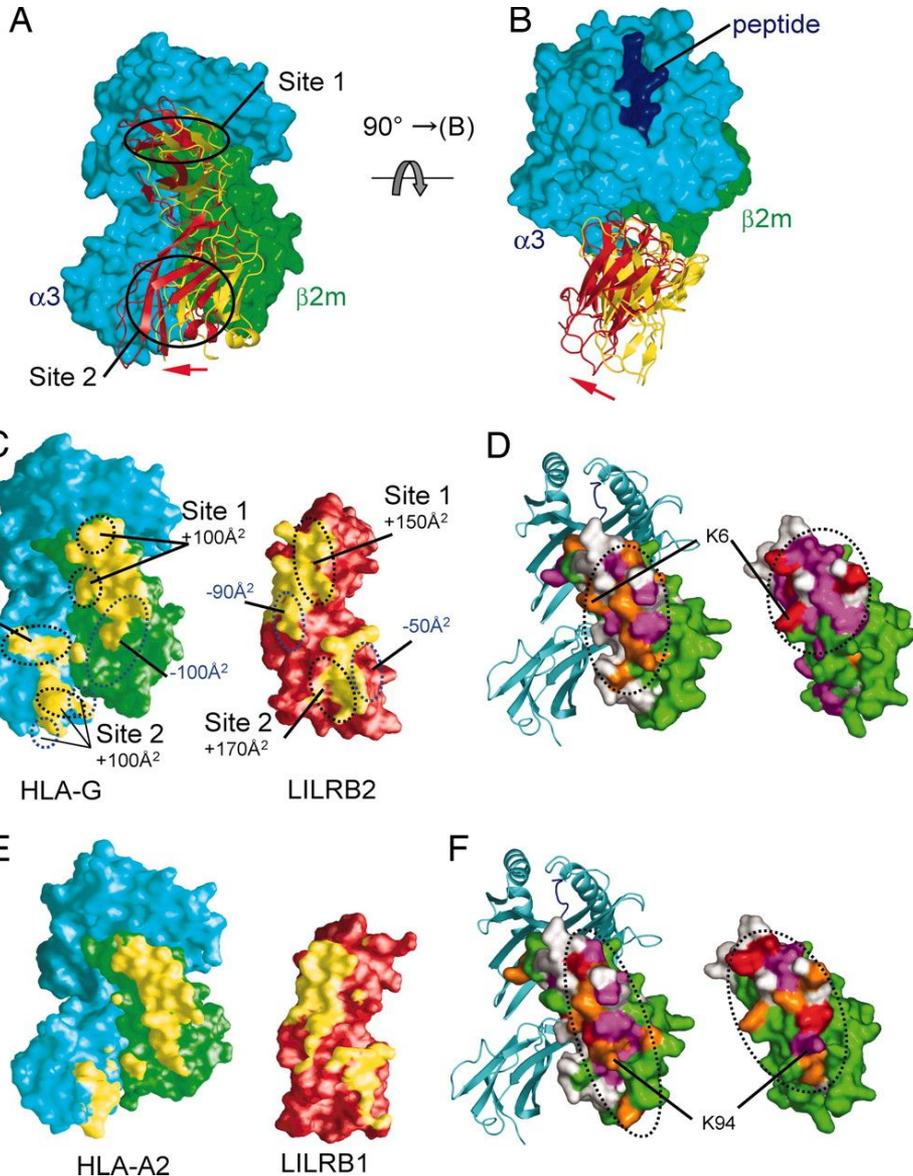


**Аминокислотная  
последовательность  
белка**



**Нуклеотидная  
последовательность  
ДНК**

# Молекулы HLA



**Иммуногенность**

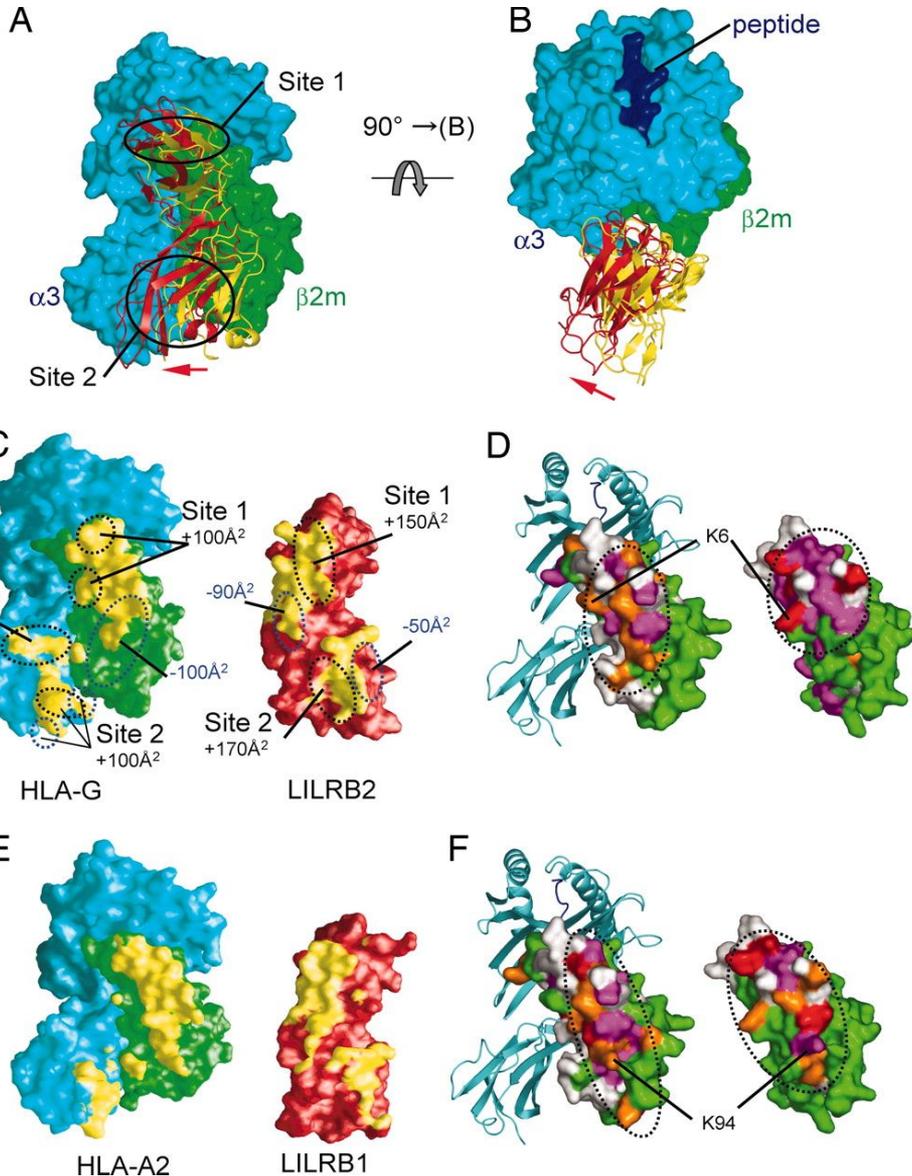


**Аминокислотная  
последовательность  
белка**



**Нуклеотидная  
последовательность  
ДНК**

# Молекулы HLA

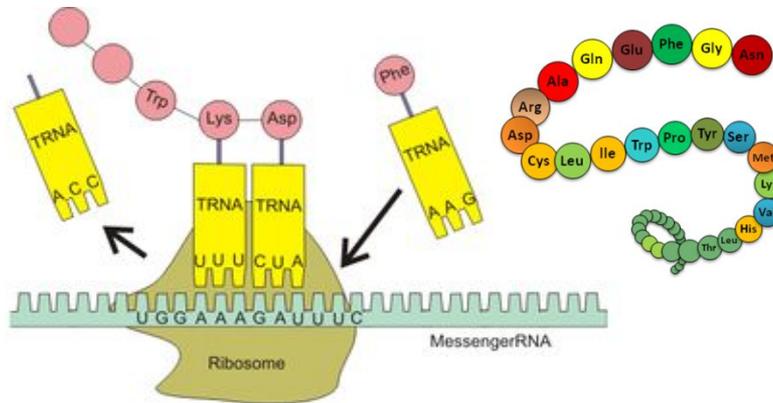


Нуклеотидная  
последовательность  
ДНК

Аминокислотная  
последовательность  
белка

Иммуногенность

# Молекулы HLA



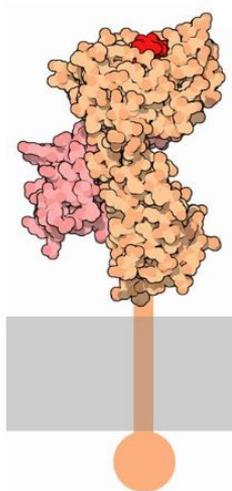
Замена 1-го  
нуклеотида



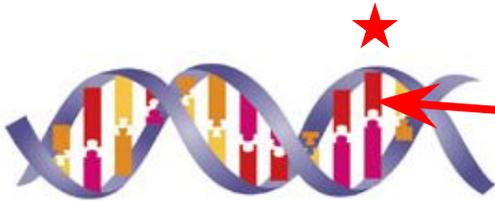
Замена  
аминокислоты



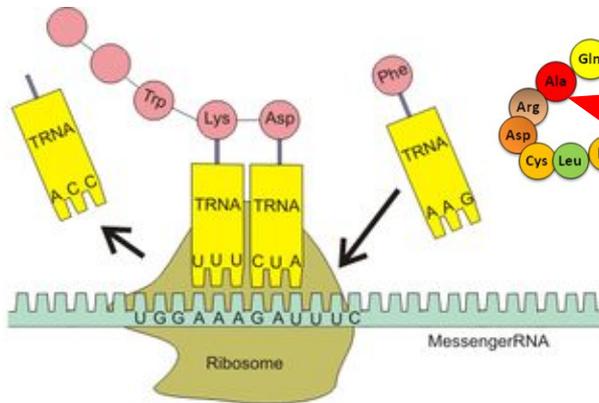
Изменение  
иммуногенности HLA



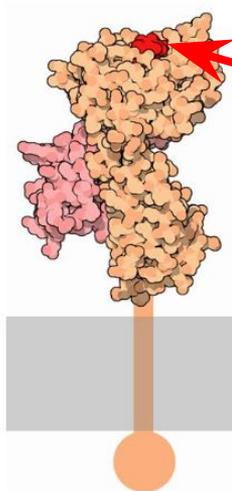
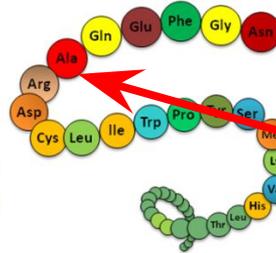
# Молекулы HLA



**Замена 1-го нуклеотида**



**Замена аминокислоты**



**Изменение иммуногенности HLA**

# Молекулы HLA

Задача HLA-типирования –  
охарактеризовать специфичность  
молекулы HLA

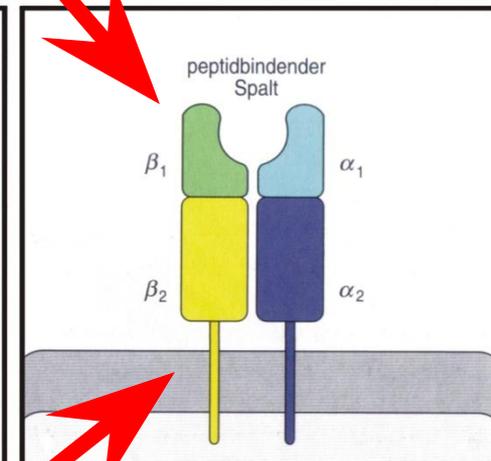
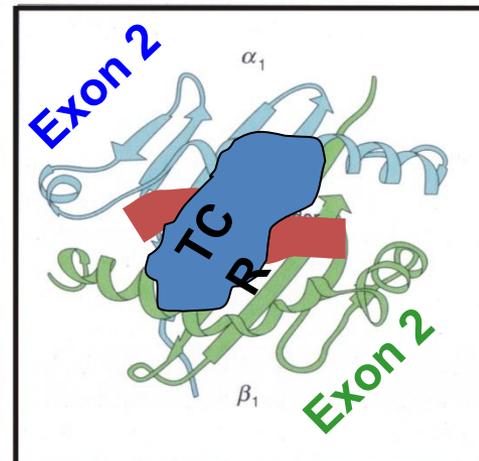
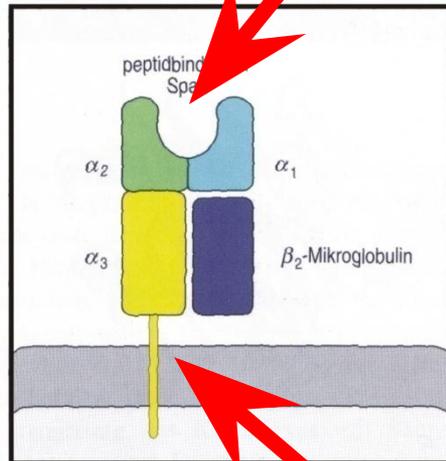
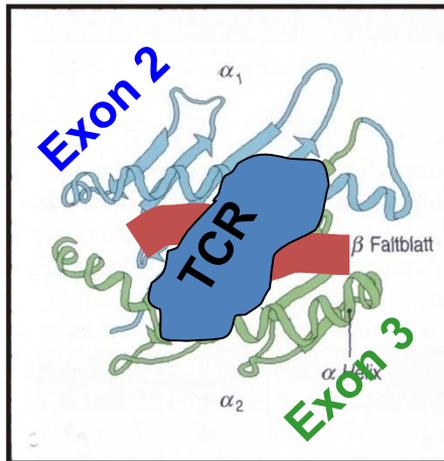
Наиболее точный способ HLA-  
типирования – получение  
представления о  
последовательности нуклеотидов  
ДНК, кодирующих молекулу белка

# Молекулы HLA

Вариабельные участки HLA-молекул

HLA class I

HLA class II



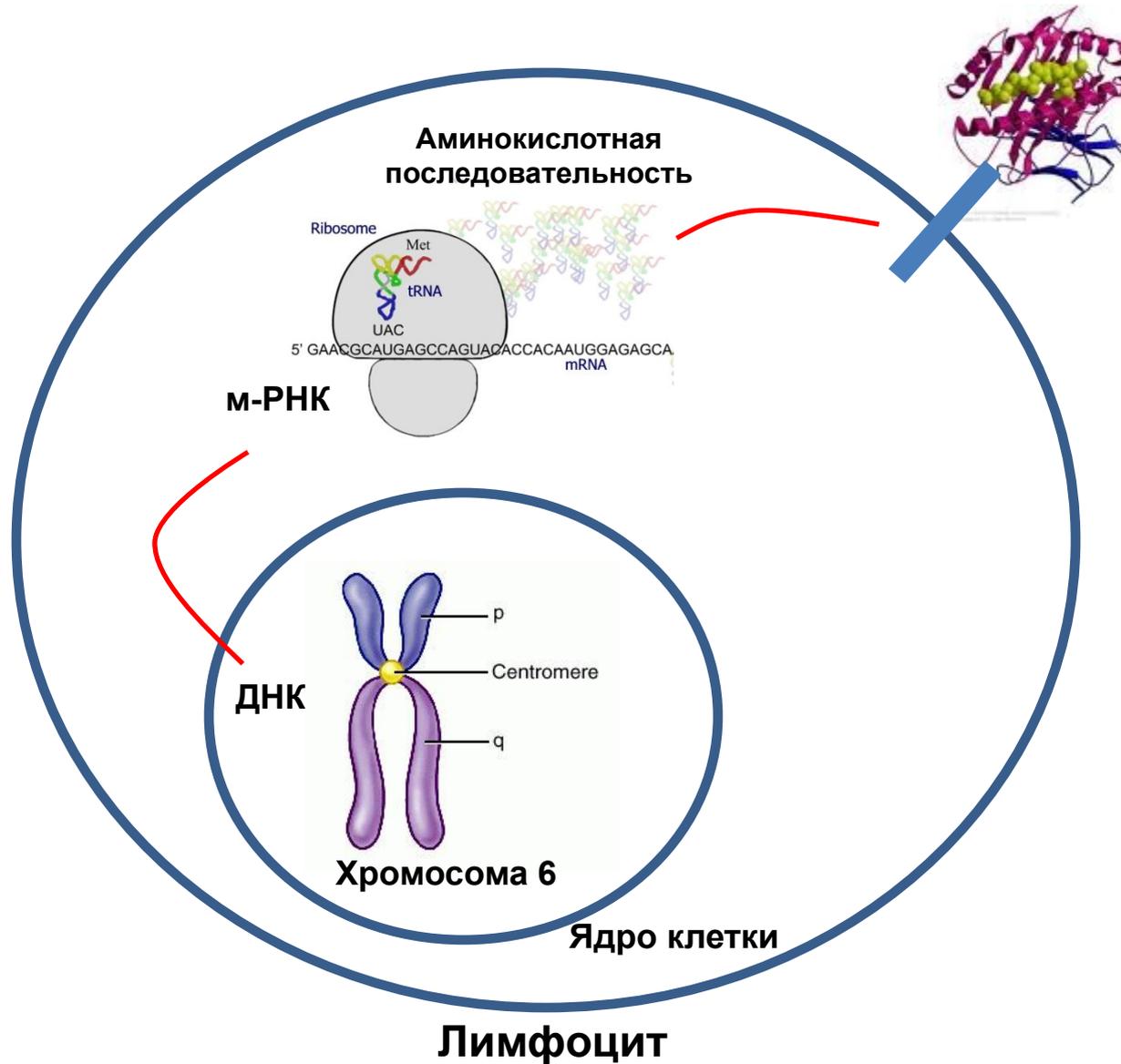
Стабильные участки HLA-молекул

Вариабельные участки HLA-молекул кодируются

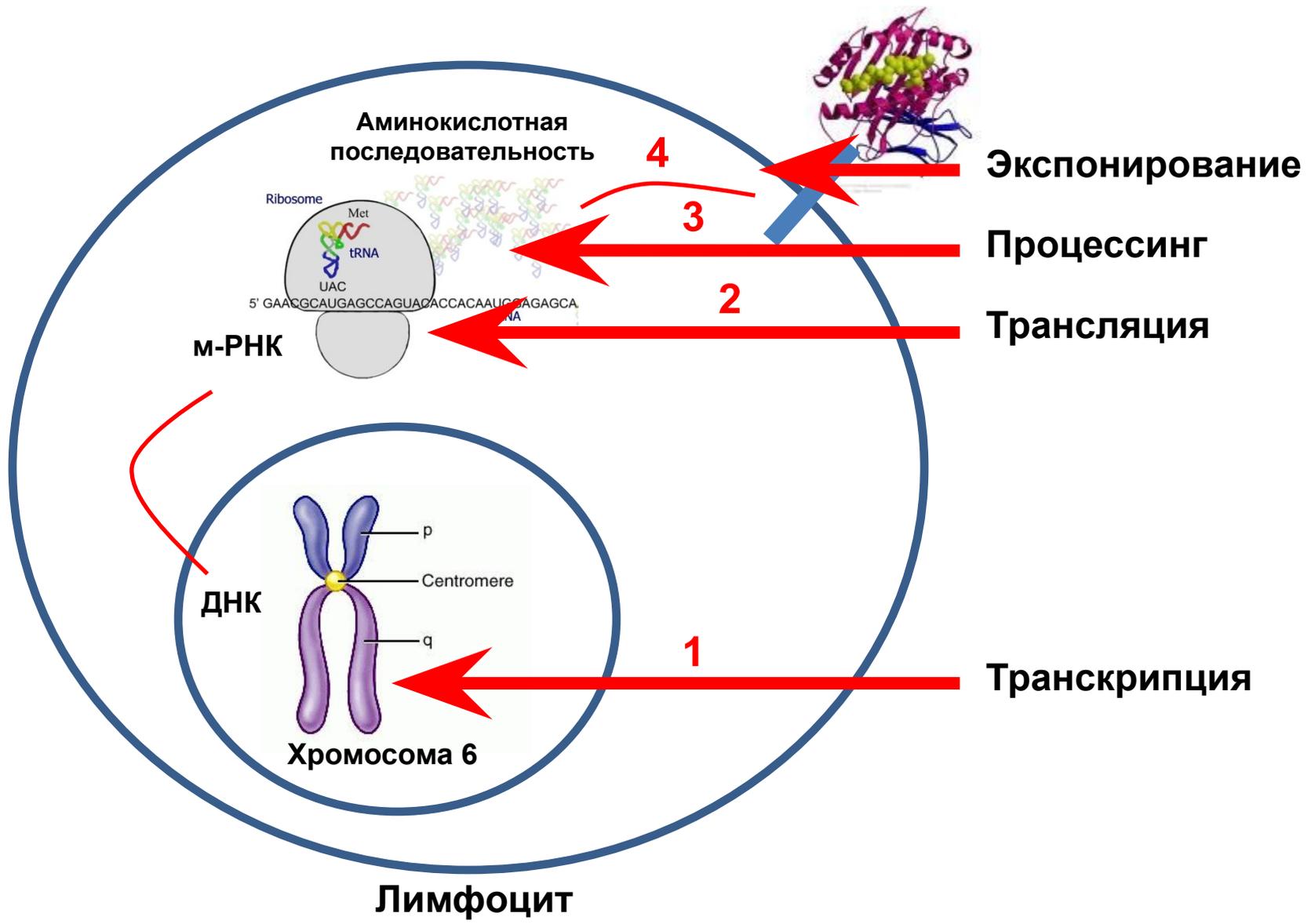
HLA class I – Экзоном 2 и Экзоном 3

HLA class II – Экзоном 2

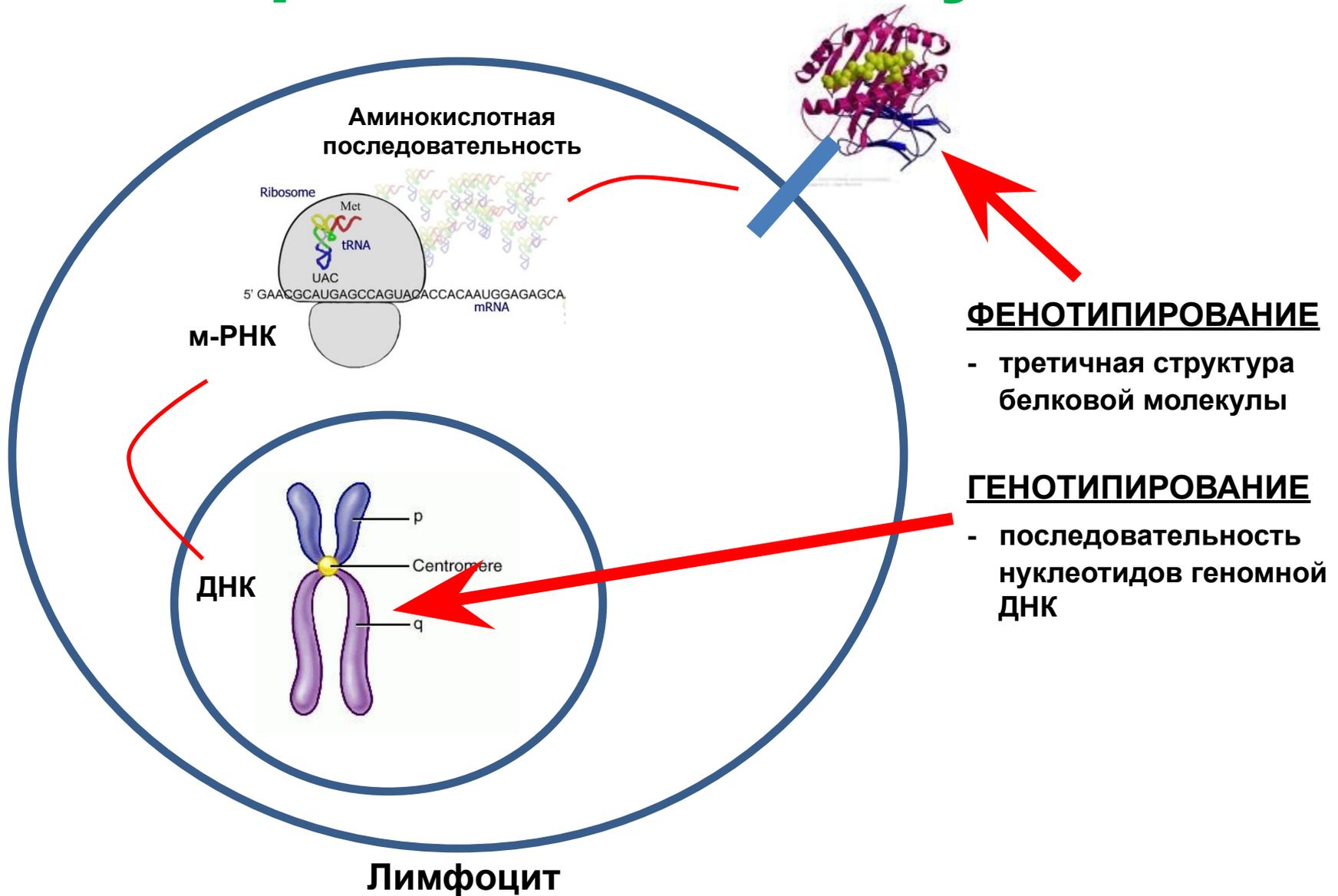
# Молекулы HLA – процесс создания



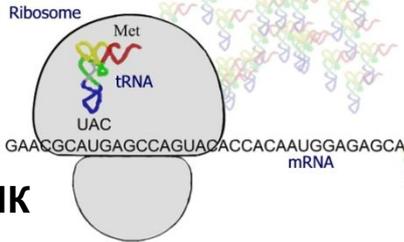
# Молекулы HLA – процесс создания



# Типирование молекул HLA



Аминокислотная последовательность



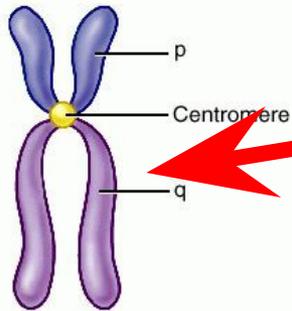
## ФЕНОТИПИРОВАНИЕ

- третичная структура белковой молекулы

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

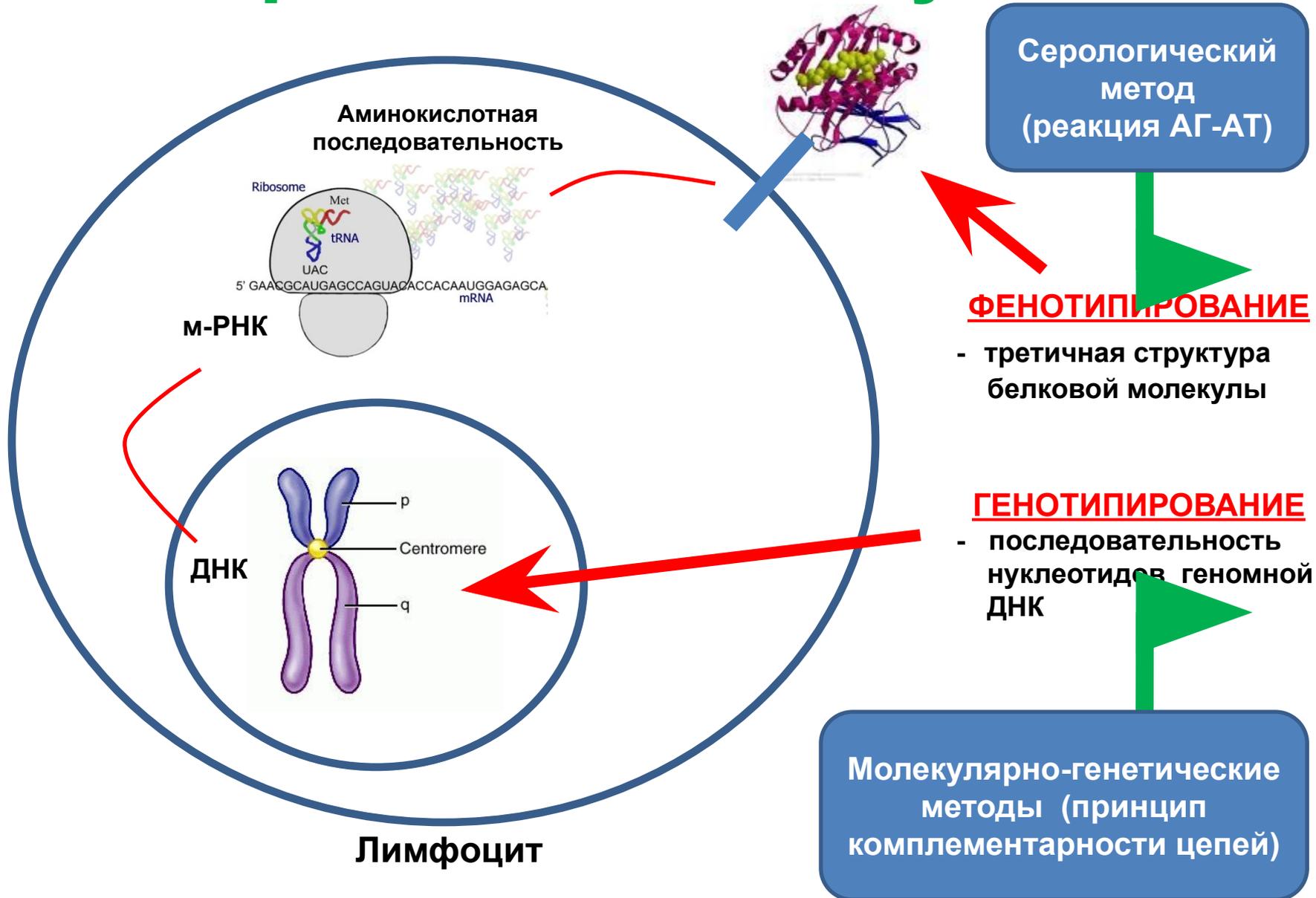
- последовательность нуклеотидов геномной ДНК

ДНК



Лимфоцит

# Типирование молекул HLA

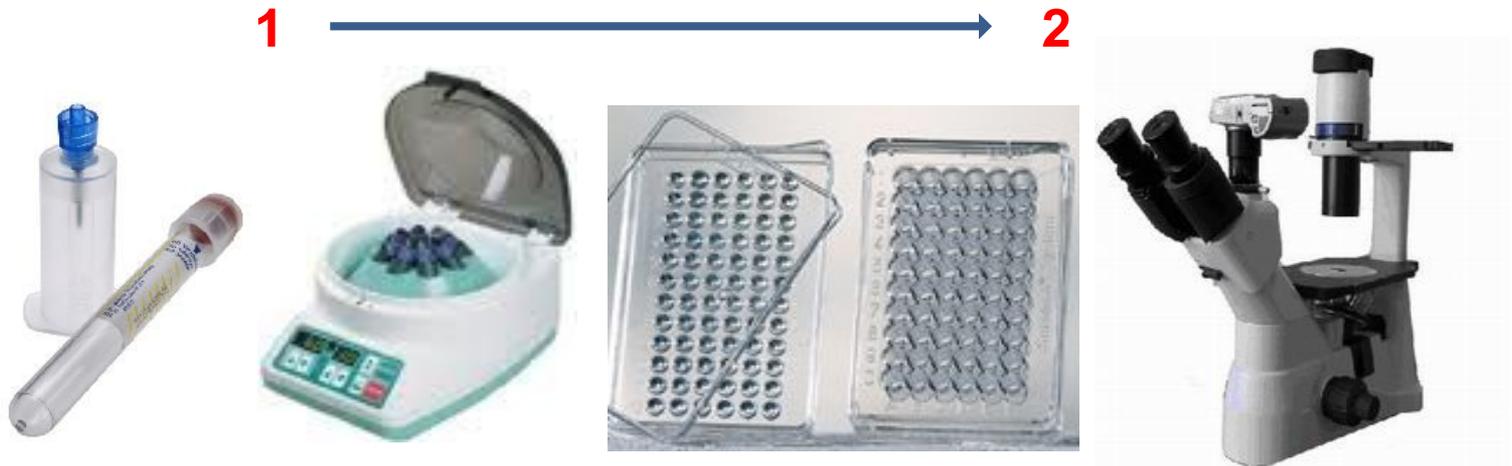


# ФЕНОТИПИРОВАНИЕ

## 1. Выделение популяции Т-лимфоцитов

- центрифугирование
- иммуномагнитная сепарация

## 2. Лимфоцитотоксический тест



# ФЕНОТИПИРОВАНИЕ



Серологическое типирование необходимо провести в течение 1 рабочего дня с момента взятия крови, так как лимфоциты разрушаются.

**Хранение образцов  
крови невозможно.**

# ФЕНОТИПИРОВАНИЕ

Метод позволяет определить реальное наличие молекулы на поверхности клетки, является способом выявления т.н. «нулевых» (не экспрессированных) аллелей.

---

Метод субъективен, нет возможности документации изображения результатов комплемент-зависимого лизиса лимфоцитов, требует работы персонала с микроскопом.

---

Метод способен типировать антигены class I – локусы A, B, C на низком разрешающем уровне, не способен типировать антигены class II – локусы DR, DQ, DP. Результатов такого типирования недостаточно для осуществления трансплантации.

# ФЕНОТИПИРОВАНИЕ

Существует возможность фенотипирования с помощью проточной цитометрии. Результаты по качеству аналогичны серологическому типированию в лимфоцитотоксическом тесте, по стоимости гораздо дороже.



# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

## 1. Выделение ДНК из цельной крови

*(источник – ядродержащие форменные элементы)*

- **ручные способы** (спиртовая преципитация, колоночное выделение, магнитная сепарация)
- **автоматизированные способы** (выделение на процессорах магнитных частиц)

## 2. Молекулярно-генетическое типирование

- **SSP** (**S**equence **S**pecific **P**rimers)
- **SSO** (**S**equence **S**pecific **O**ligonucleotides)
- **SBT** (**S**equencing **B**ased **T**yping)

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

Взятие венозной крови



**1**  
Выделение ДНК



**SSP**



**SBT**



**SSO**



Хранение крови, а лучше –  
выделенной ДНК при  $-80^{\circ}\text{C}$   
несколько лет

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

## 1. Выделение ДНК: однотипно для всех молекулярно-генетических методик

Выделение ДНК  
возможно всего из **150**  
**мкл** венозной крови



Кровь может храниться 2 недели при +2-8°C или годами при -20°C

Возможность автоматизации выделения ДНК – 96 образцов в течение 1 часа (768 образцов за рабочий день)



# SSP

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ SSP (sequence specific primers)

ДНК



+



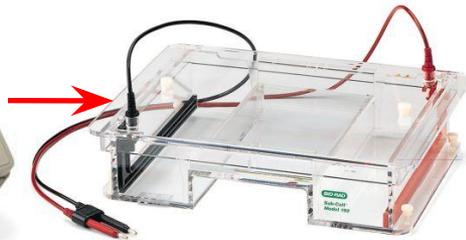
Полимераза,  
нуклеотиды,  $Mg^{2+}$



На дно лунок планшеты закреплены смеси праймеров, комплементарных определенным специфичностям HLA



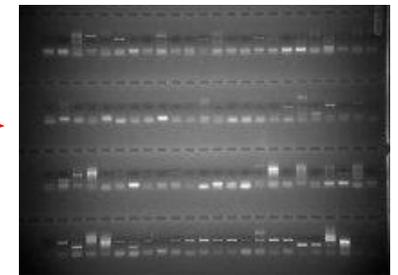
Аmplification



Electrophoresis



Photodocumentation



Interpretation by table of primer mixtures

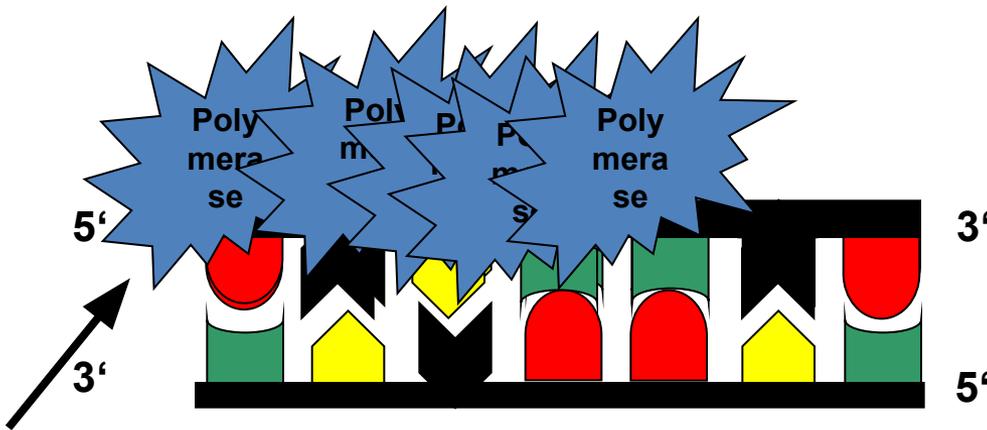
# SSP

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

## SSP (sequence specific primers)



3'Primer (reverse primer)



5'Primer (forward primer)

# SSP

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ SSP (sequence specific primers)

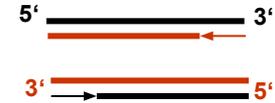
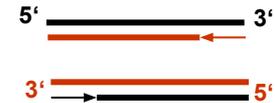
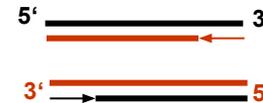
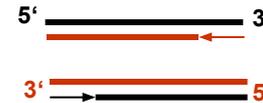
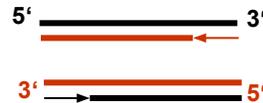
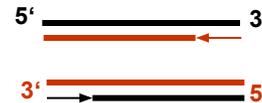
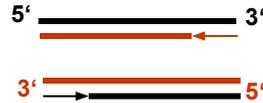
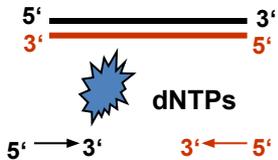
Цикл:

1. Денатурация (96°C)
2. Отжиг (65°C)
3. Элонгация (72°C)

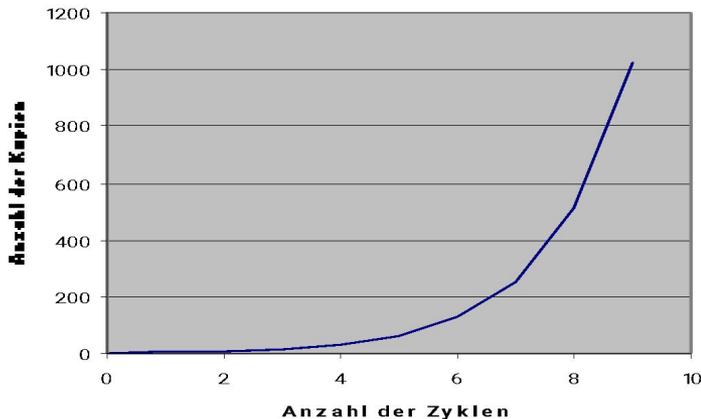
1. Цикл

2. Цикл

3. Цикл



Verlauf einer PCR



- ПЦР прогрессирует экспоненциально (количество копий =  $N \times 2^n$ )
- начав с 2 молекул ДНК, после 25 циклов ПЦР получают 67'108'864 копий

# SSP

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

## SSP (sequence specific primers)

Метод позволяет генотипировать HLA как по class I, так и по class II: локусы A\*, B\*, C\*, DR\*, DQ\*, DP\* как на низком, так и на высоком разрешении в течение 3-х часов.

---

Метод документируем, оборудование универсальное (для любого ПЦР-анализа), система открытая – в РФ поставляются наборы 5 производителей.

---

Производительность ограничена количеством амплификаторов: на 1-ом амплификаторе сотрудник выполняет 4 типирования в течение рабочего дня.

# SSO

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

SSO (sequence specific oligonucleotides)

ДНК



+



Полимераза,  
нуклеотиды,  $Mg^{2+}$

Аmplицируются не конкретные  
специфичности, а большие участки  
ДНК – целые локусы



Гибридизация на  
полистирольных микросферах



Гибридизация на стрипах

# SSO

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

SSO (sequence specific oligonucleotides)

- Гибридизация крупных «локусных» ампликонов со специфическими олигонуклеотидами, нанесенными на микросферы или стрипы.
- По принципу комплементарности участки исследуемой ДНК соединяются с олигонуклеотидами.
- Микросферы оцениваются при помощи двухцветного лазера, стрипы – в специальном сканере, выявляющем положительные реакции. Оценку результатов производит ПО.

# SSO

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

SSO (sequence specific oligonucleotides)

Метод позволяет генотипировать HLA как по class I, так и по class II: локусы A\*, B\*, C\*, DR\*, DQ\*, DP\* на низком и т.н. «среднем» разрешении.

---

Метод документирован, оборудование специфическое, системы закрытые, невозможно высокоразрешающее типирование, ПО необходимо контролировать.

---

Производительность – 16 образцов по 3-м локусам в течение 3-х часов.

# SBT

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

SBT (sequencing based typing)

ДНК



+



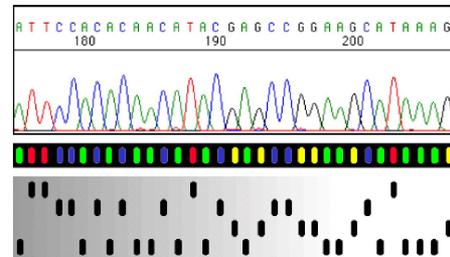
Полимераза, праймер к  
необходимому экзону,  
dNTP, ddNTP, Mg<sup>2+</sup>



Аmplификация



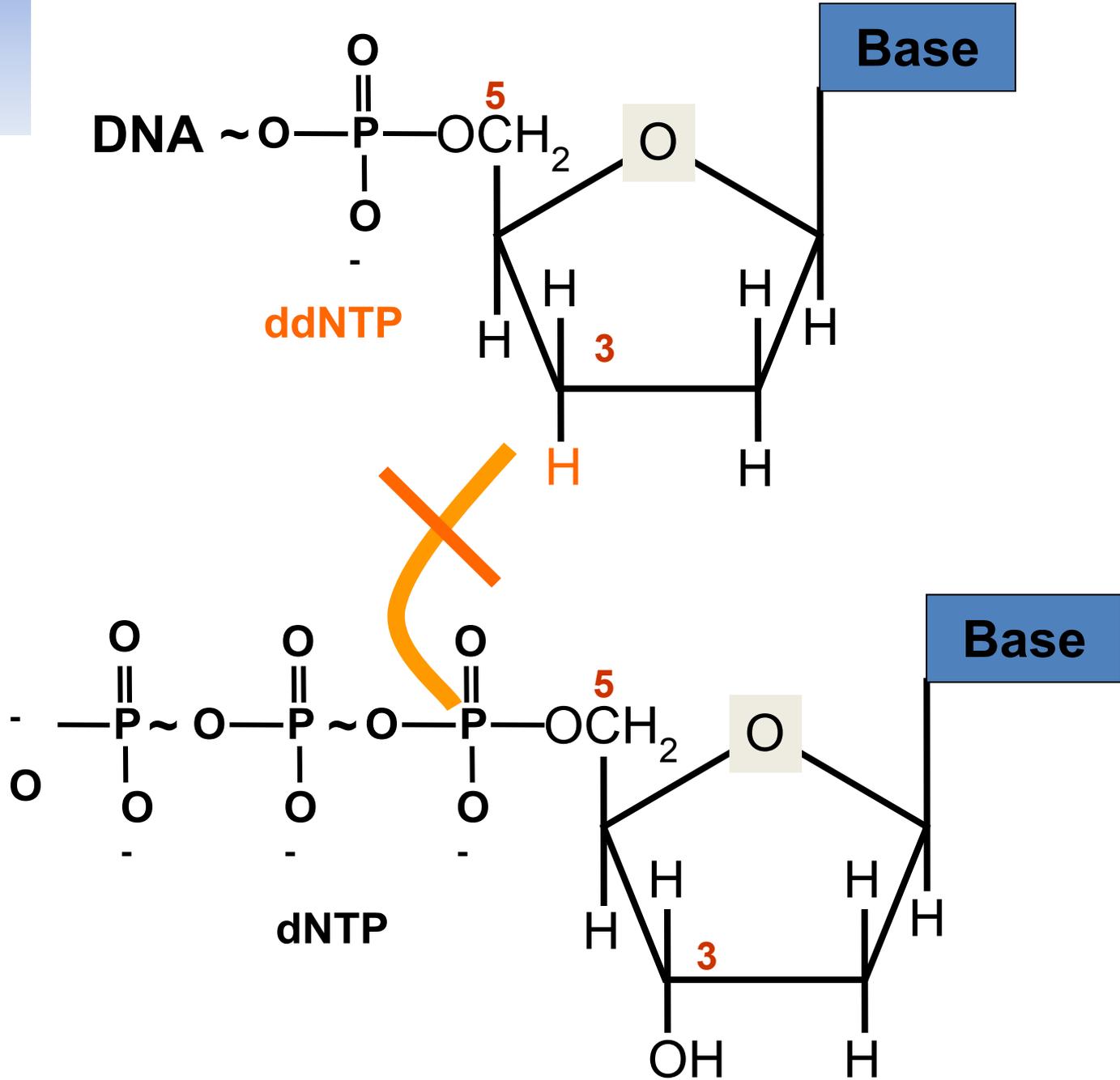
Капиллярный электрофорез



Интерпретация



# SBT



# SBT

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

## SBT (sequencing based typing)

The screenshot displays the JSI medical systems GmbH SeqHLA software interface. The main window shows the results of an HLA-B genotyping experiment using Sequencing Based Typing (SBT). The interface is divided into several panels:

- Administration:** Includes LIS, SeqHLA, Joining, Worklist, Sequence, Archiving, Amp. Modules, Seq. Primer, Statistic, and New RF Dirs.
- Sequence Panel:** Displays patient information (Order No: 71020001, Patient: P-R36944, DNA No.: R36944, Date: 04/12/2007 06:43:21) and procedures (HLA-A high, HLA-B high, HLA-Cw high). The state is "compl. MV [ah 04/16/2007]".
- Result Panel:** Shows the heterozygous result based on haplotypes: 1,2.het. (1+2). The alleles identified are B\*1401 and B\*550101. The HLA informatics group is 2.16, dated 01/12/2007.
- Consensus and Sequences:** Displays the consensus sequence (R C B D K V R Y W T T S G) and the individual sequences for B\*1407N, B\*550101, and the combined sequence. The combined sequence shows a heterozygous state at position 170 (R/T) and position 175 (A/T).
- Comments:** A text area for user comments.
- Genes:** A table showing the state of genes A, B, and Cw.
- Positions / Resultfiles:** A table listing the positions and resultfiles for the experiment.
- Total Result:** A table summarizing the total result, including the number of alleles, their locations, and the number of reads.
- Functions:** Includes buttons for Previous, Next, T.V., M.V., print..., and Extras.

Gene	State	Resol...	Consi...
A	compl. MV	max.	
B	compl. MV	max.	
Cw	compl. MV	max.	

#	L...	Dir	W	State	Bas	Zyg	HT	Amp.M
1	E2	fwd	s	AM/...	73	het.	1+2	S4B15
2	E2	fwd		AM/...	266	het.	1+2	S4B15
2	E2	rev		/SV	270	hemi.	1	S4B13
3	E2	rev		/SV	270	hemi.	2	S4B8
E3	fwd			AM/...	256	het.	1+2	S4B15
E3	rev			/SV	270	hemi.	1	S4B13

No	Alleles A	Alleles B	Inc	Location
10	B*1407N	B*550101	1	E3[1]
11	B*1401	B*550202	2	E2[1]E3[1]
12	B*1401	B*5507	2	E2[1]E3[1]
13	B*1401	B*5512	2	E2[1]E3[1]
14	B*1401	B*5513	2	E3[2]
15	B*1401	B*5516	2	E2[1]E3[1]

# SBT

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

## SBT (sequencing based typing)

Метод позволяет генотипировать HLA как по class I, так и по class II: локусы A\*, B\*, C\*, DR\*, DQ\*, DP\* на низком и максимально высоком разрешении (понуклеотидная последовательность), необходимом для неродственной трансплантации ГСК.

---

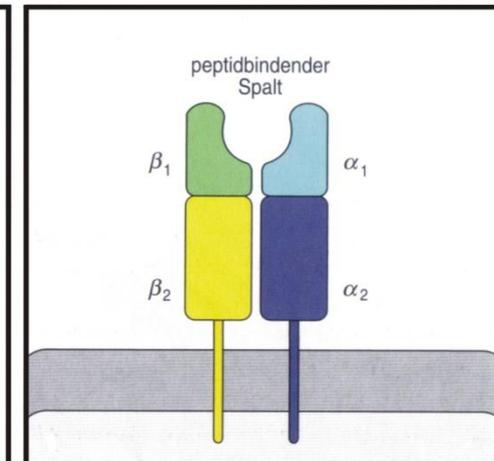
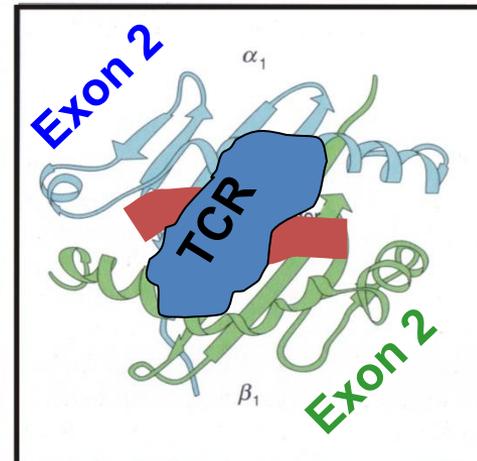
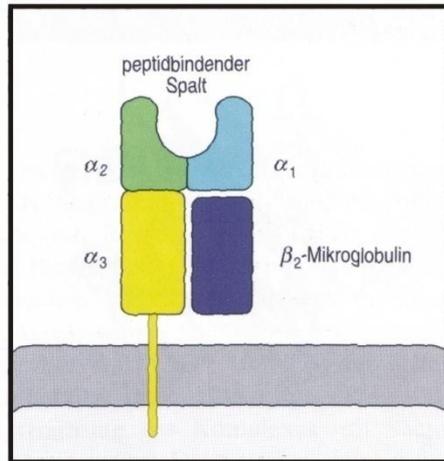
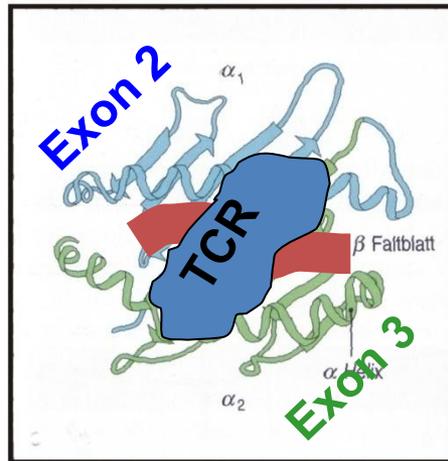
Только с помощью SBT возможно определение новых аллелей (в мире ежегодно открываются порядка 500 новых аллелей – успеть создать новые праймеры к ним для SSP и олигонуклеотиды для SSO невозможно).

---

Производительность зависит от количества капилляров и выбранной стратегии типирования, до 1000 секвенирований в день.

## class I

## class II



- Exon 2 + 3 для HLA class I
- Exon 2 ( $\beta$ -chain) для class II

Аллели, которые имеют одинаковую последовательность нуклеотидов в этих экзонах будут иметь одинаковое влияние на исход трансплантации

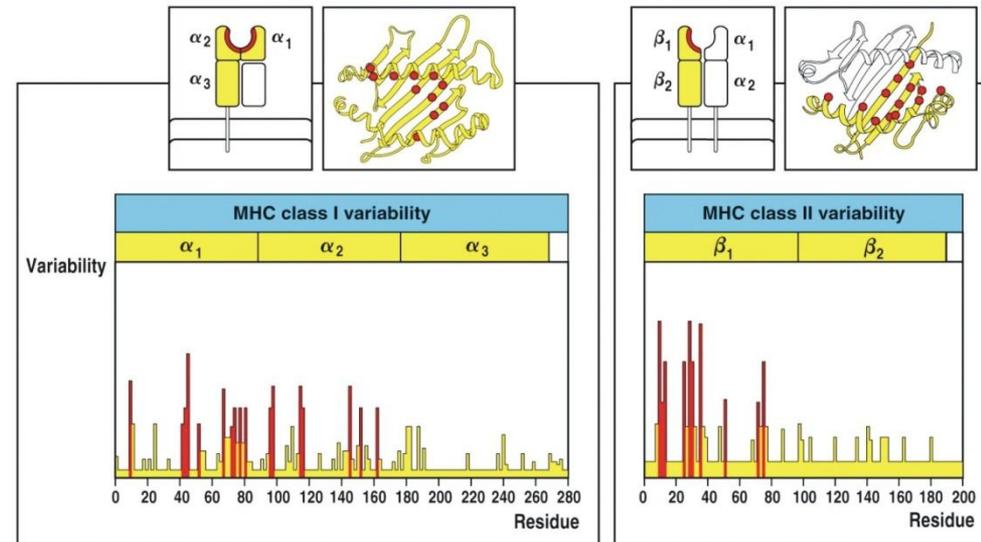


Figure 5-16 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# SSO/SSP

# ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДОВ

Искусство производства наборов SSP – создание многообразия высокоспецифичных праймеров; наборов SSO – специфичных олигонуклеотидов, которые будут комплементарны только определенному участку ДНК

Но, так как праймер или олигонуклеотид – это короткий фрагмент НК, прикрепляющийся к начальной части гена, полимеризация или гибридизация одинаково активно будет происходить даже в том случае, если в кодирующей части имеется мутация! А так как оценка результата основана на выявлении только количества продукта в геле, на микросферах, или на стрипах, а не его качества, получение точной информации о нуклеотидной последовательности методами SSP и SSO невозможно.

# SBT

**Искусство типирования методом SBT заключается в технической точности выполнения исследования для получения «чистого» сиквенса, который отображает всю нуклеотидную последовательность ДНК, даже точечную мутацию!**

**Методом секвенирования – SBT, являющимся в настоящее время стандартом в решении вопроса о возможности неродственной трансплантации ГСК, определяется не количество продукта амплификации, а его качество – понуклеотидная последовательность цепи ДНК.**

# SBT

JSI medical systems GmbH - www.jsi-medisys.de

System SeqHLA Help

Administration

Sequence

LIS

SeqHLA

Joining

Worklist

Sequence

Archiving

Amp. Modules [master file]

Seq. Primer [master file]

Statistic [master file]

New RF Dirs [master file]

Thresholds

Order | Statistic | Family

Order No.: 71020001  
 Patient: P-R36944  
 DNA No.: R36944  
 Date: 04/12/2007 06:43:21  
 Sample Src.:  
 Project:  
 Procedures: HLA-A high  
 HLA-B high  
 HLA-Cw high  
 State: compl. MV [ah 04/16/2007]

Result

heterozygous result(s) - based on haplotypes: 1,2.het. (1+2)  
 B\*1401, \*550101  
 HLA informatics group: 2.16 Date: 01/12/2007

Show

reading frame: none  
 check: statistic  
 statistic: 0  
 edited: 1/8  
 het. pos.: 4/9  
 mism.: 0/0

consensus: R C B D K V R Y W T T S G

B\*1407N: G C C G G A A T A T T G G

B\*550101: G C C G G A G T A T T G G

combined seq: G C C G G A R T A T T G G

# 1: E2 fwd Haplotypes 1+2: G C C G G A R T A T T G G

# 2: E2 rev Haplotype 1: G C C G G A G T A T T G G

# 3: E2 rev Haplotype 2: G C C G G A A T A T T G G

compl. rever: [dropdown]  
 compl. rever: [dropdown]  
 Exon/Intron: [dropdown]

Genes

Gene	State	Resol...	Consid
A	compl. MV	max.	
B	compl. MV	max.	
Cw	compl. MV	max.	

Positions / Resultfiles

#	L...	Dir	W.	State	Bas	Zyg	HT	Amp.M
1	E1	fwd	s	AM/...	73	het.	1+2	S4B15
2	E2	fwd		AM/...	266	het.	1+2	S4B15
3	E2	rev		/SV	270	hemi.	1	S4B13
4	E2	rev		/SV	270	hemi.	2	S4B8
5	E3	fwd		AM/...	256	het.	1+2	S4B15
6	E3	rev		/SV	270	hemi.	1	S4B13

T.V. M.V. warning state

Total Result

No	Alleles A	Alleles B	Inc.	Location
10	B*1407N	B*550101	1	E3[1]
11	B*1401	B*550202	2	E2[1]E3[1]
12	B*1401	B*5507	2	E2[1]E3[1]
13	B*1401	B*5512	2	E2[1]E3[1]
14	B*1401	B*5513	2	E3[2]
15	B*1401	B*5516	2	E2[1]E3[1]

Functions

Previous Next  
 T.V. M.V. print...  
 Extras ->

Ready. ah Seq: 0

Start O:\QM\SOPs\II. Proz... JSI medical syste... DNA Type Lookup To... 2311\_7\_Oligomeßpro... 17:15

# СТОИМОСТЬ

SBT



SSO



SSP



Serology



# Стоимость типирования

