

# Обзор методов HLA-типирования

*Наместников Ю.А.*

Санкт-Петербург, 2022г

# Молекулы HLA

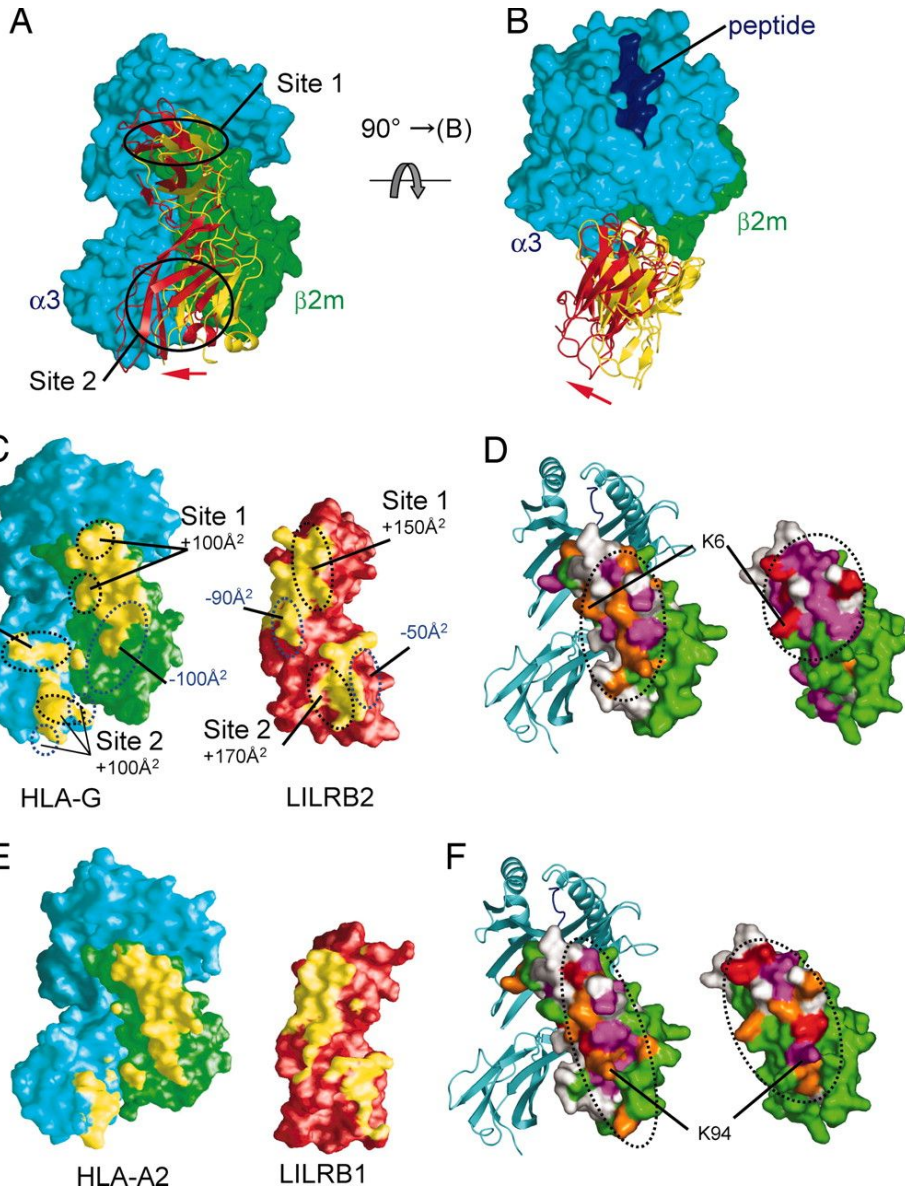
Антигенные свойства молекул HLA определяются третичной структурой белковых цепей, экспрессированных на поверхности клеток



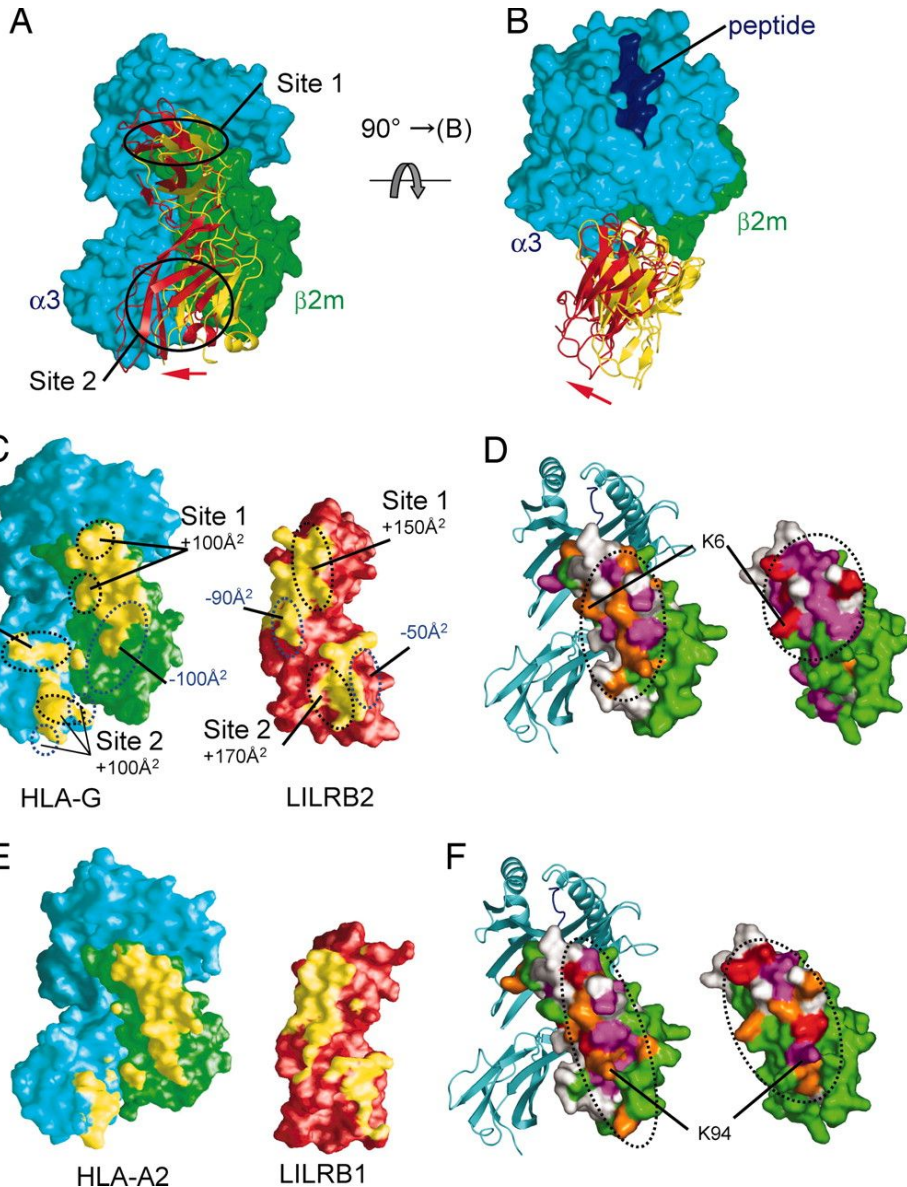
Третичная структура, сформированная преимущественно водородными связями между эпитопами белковой цепи, определяется аминокислотной последовательностью этого белка



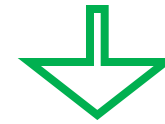
Аминокислотная последовательность белка определяется нуклеотидной последовательностью ДНК



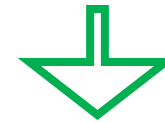
# Молекулы HLA



**Иммуногенность**

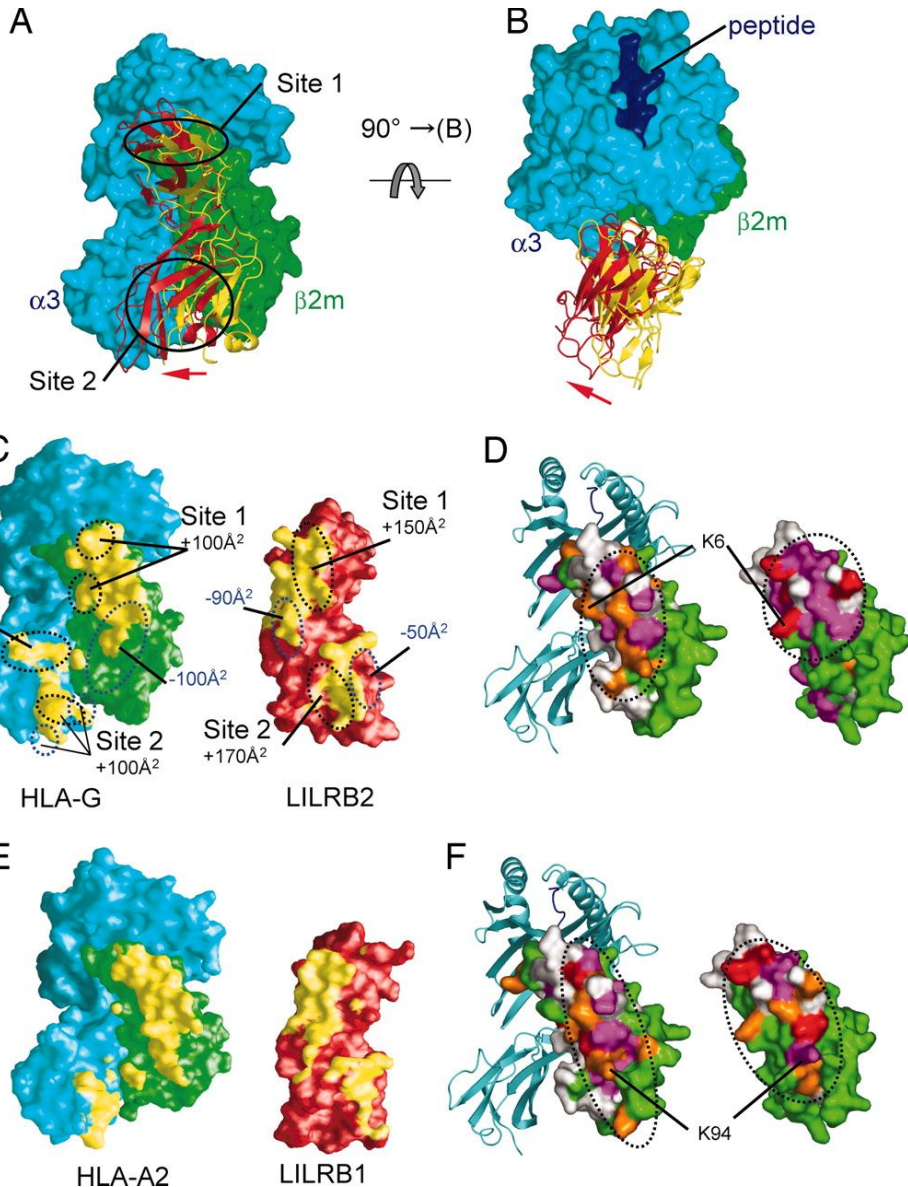


**Аминокислотная  
последовательность  
белка**

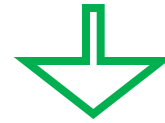


**Нуклеотидная  
последовательность  
ДНК**

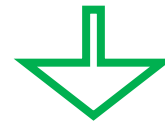
# Молекулы HLA



**Иммуногенность**

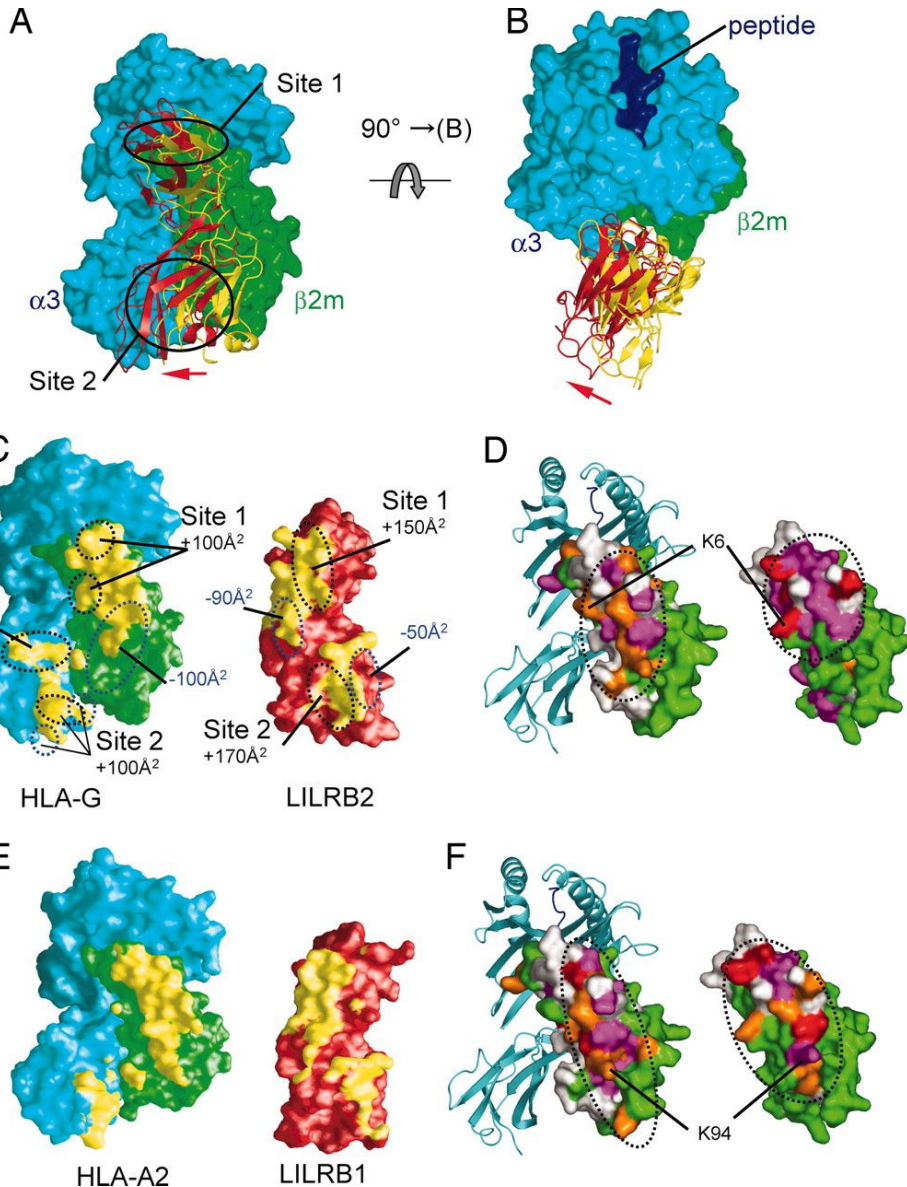


**Аминокислотная  
последовательность  
белка**



**Нуклеотидная  
последовательность  
ДНК**

# Молекулы HLA

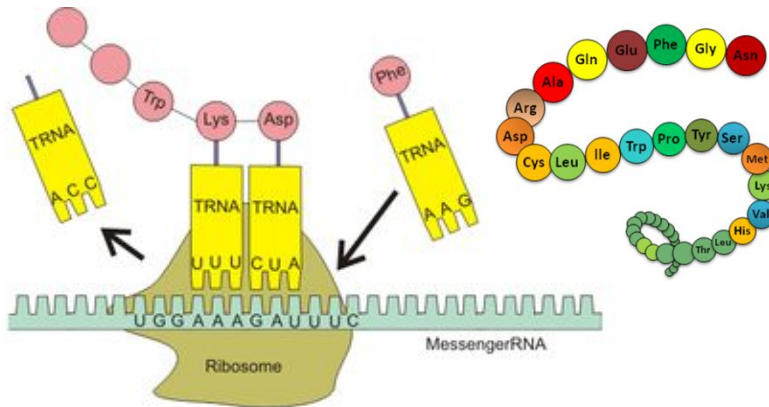


**Нуклеотидная  
последовательность  
ДНК**

**Аминокислотная  
последовательность  
белка**

**Иммуногенность**

# Молекулы HLA



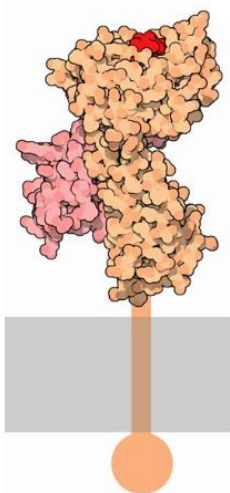
Замена 1-го  
нуклеотида



Замена  
аминокислоты



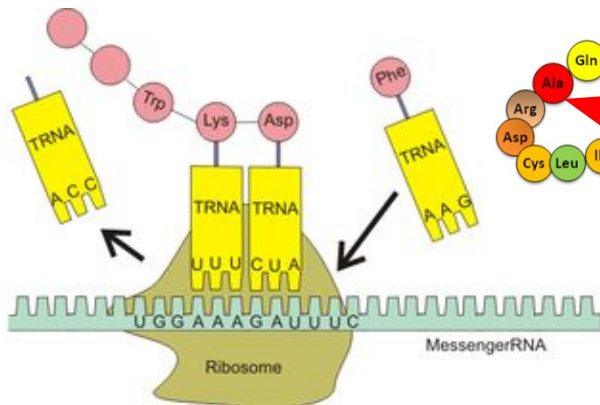
Изменение  
иммуногенности HLA



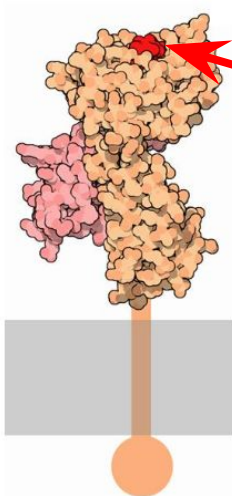
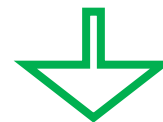
# Молекулы HLA



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

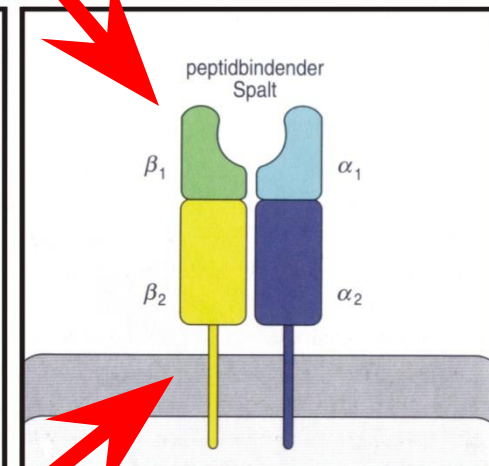
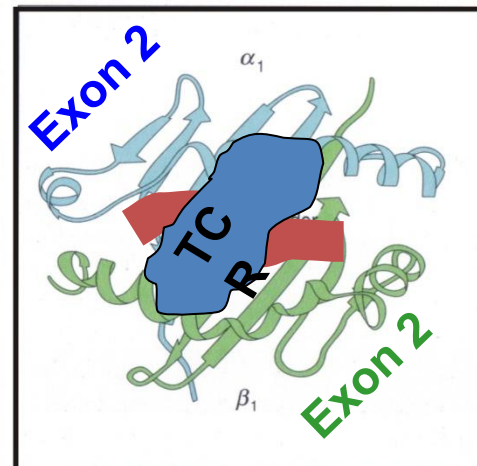
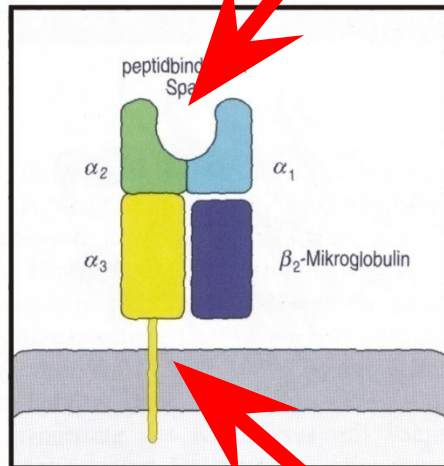
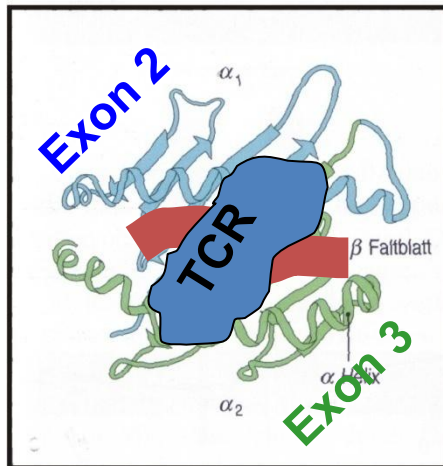


# Молекулы HLA

Вариабельные участки HLA-молекул

HLA class I

HLA class II



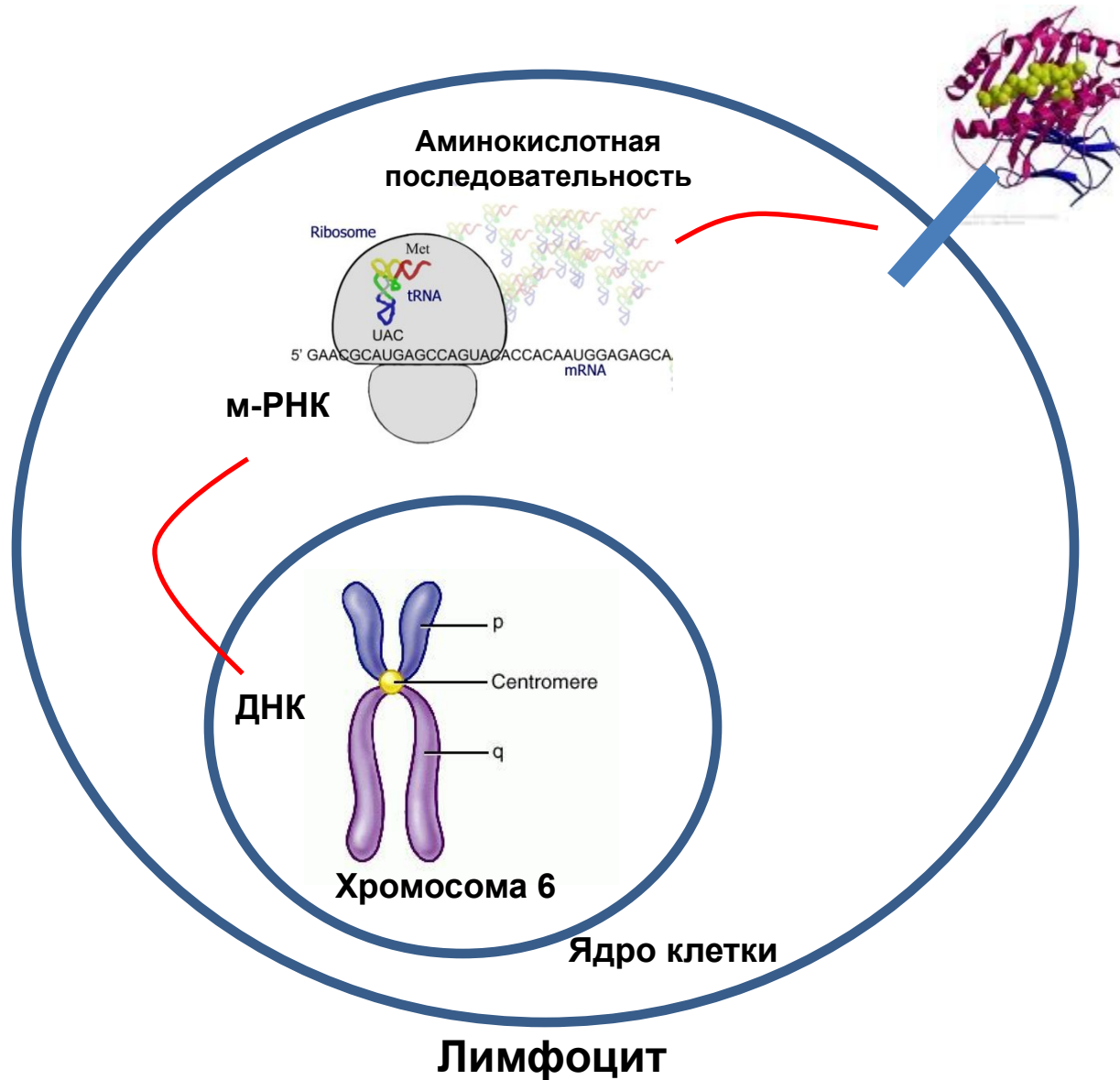
Стабильные участки HLA-молекул

Вариабельные участки HLA-молекул кодируются

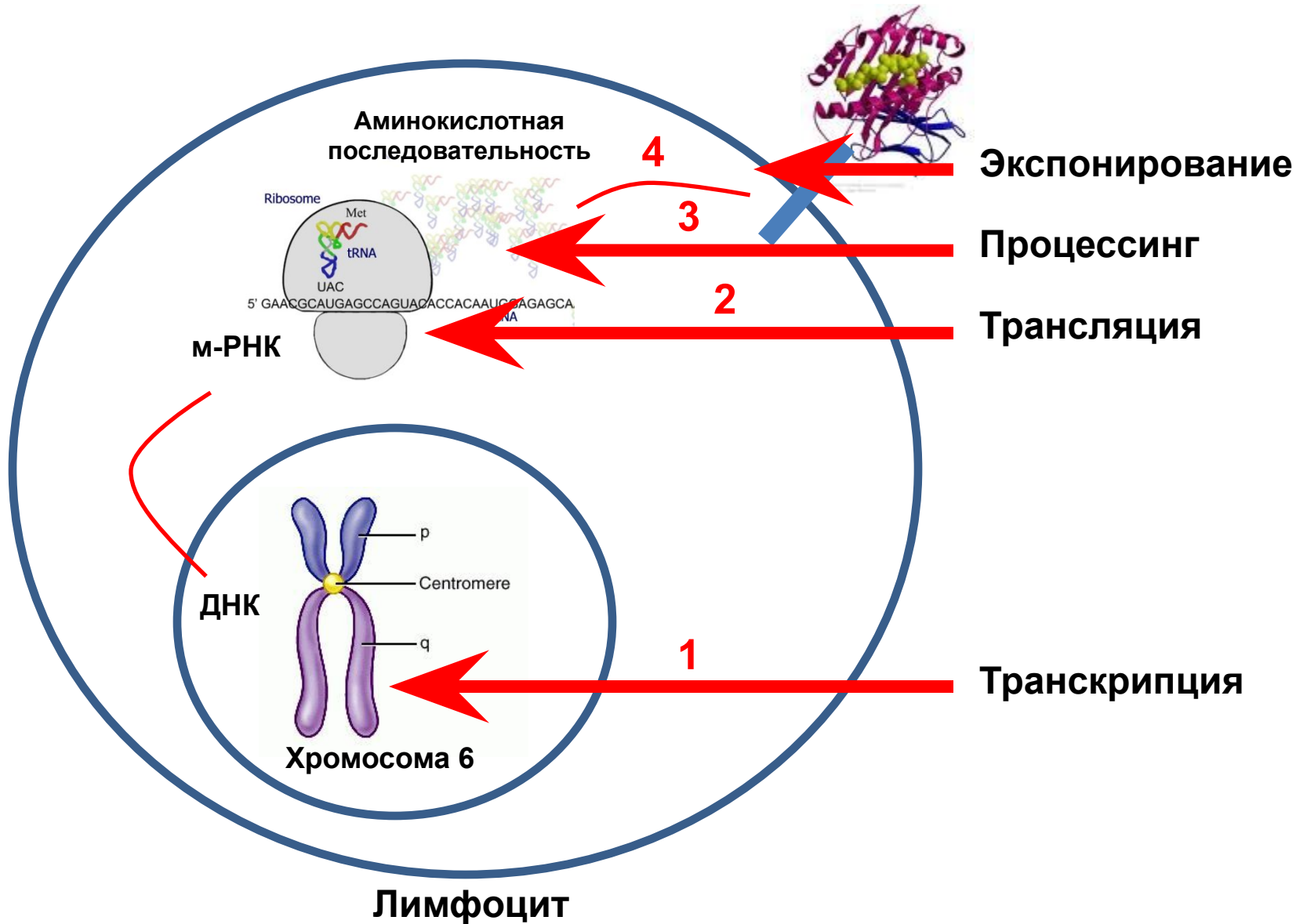
HLA class I – Экзоном 2 и Экзоном 3

HLA class II – Экзоном 2

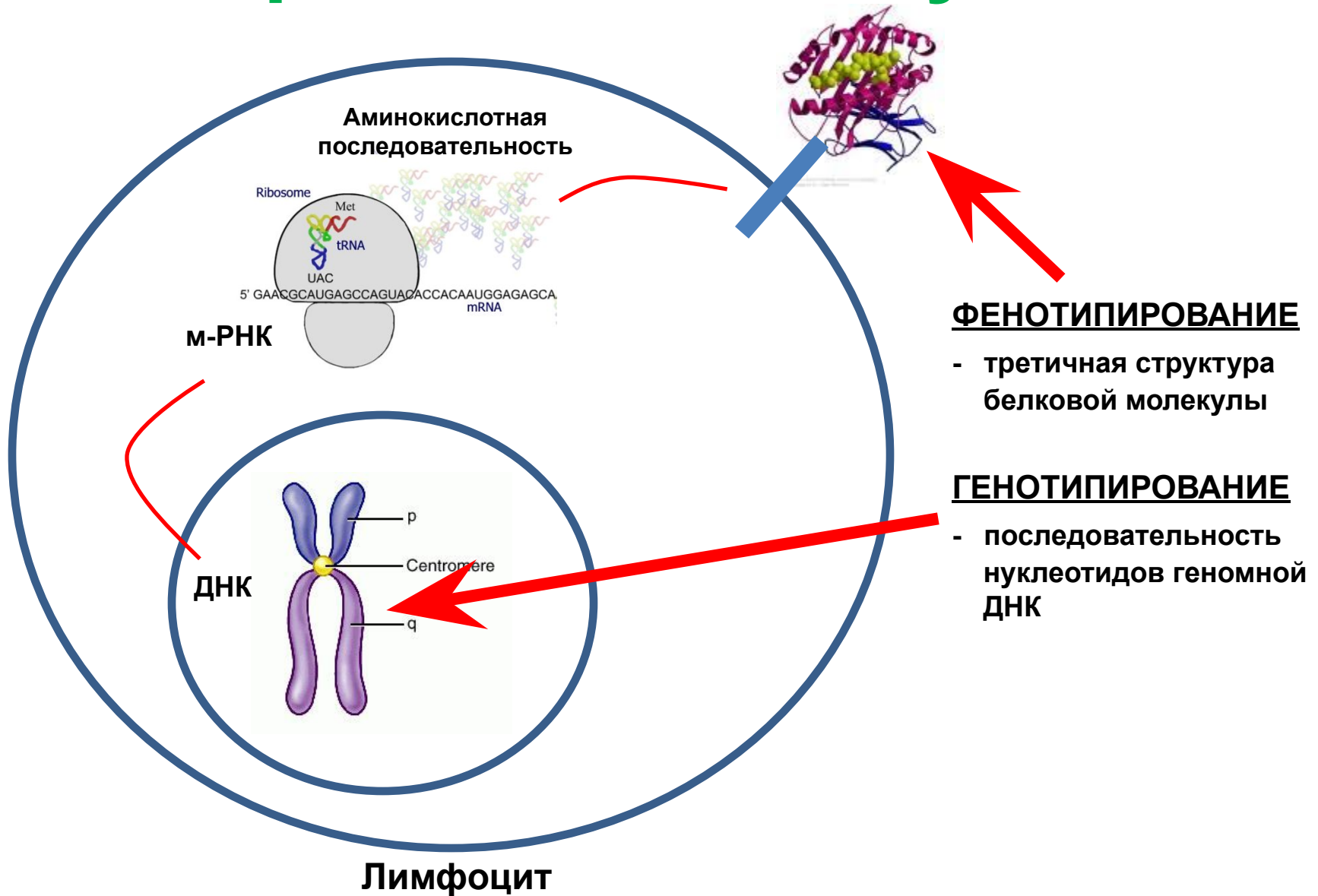
# Молекулы HLA – процесс создания



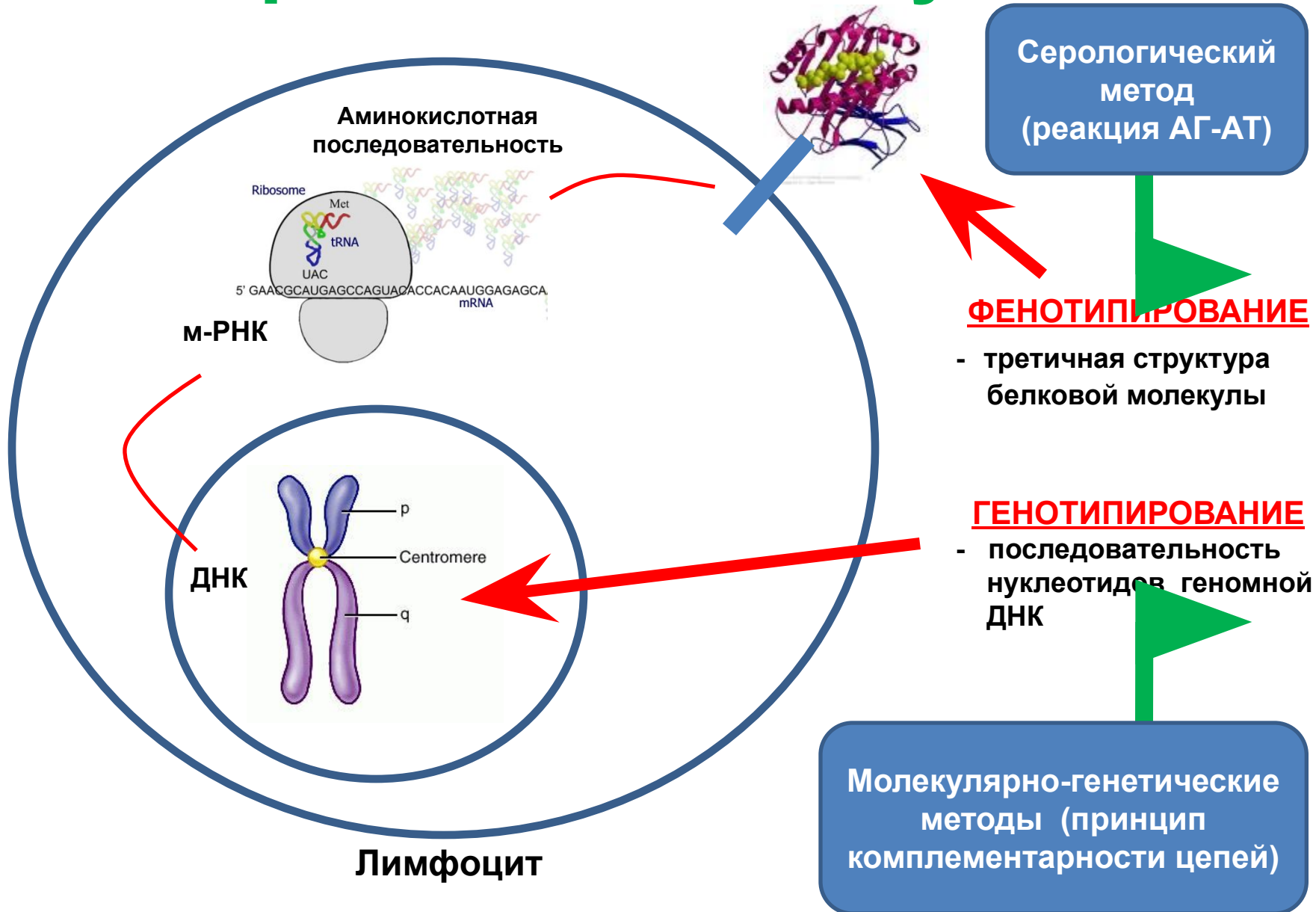
# Молекулы HLA – процесс создания



# Типирование молекул HLA



# Типирование молекул HLA

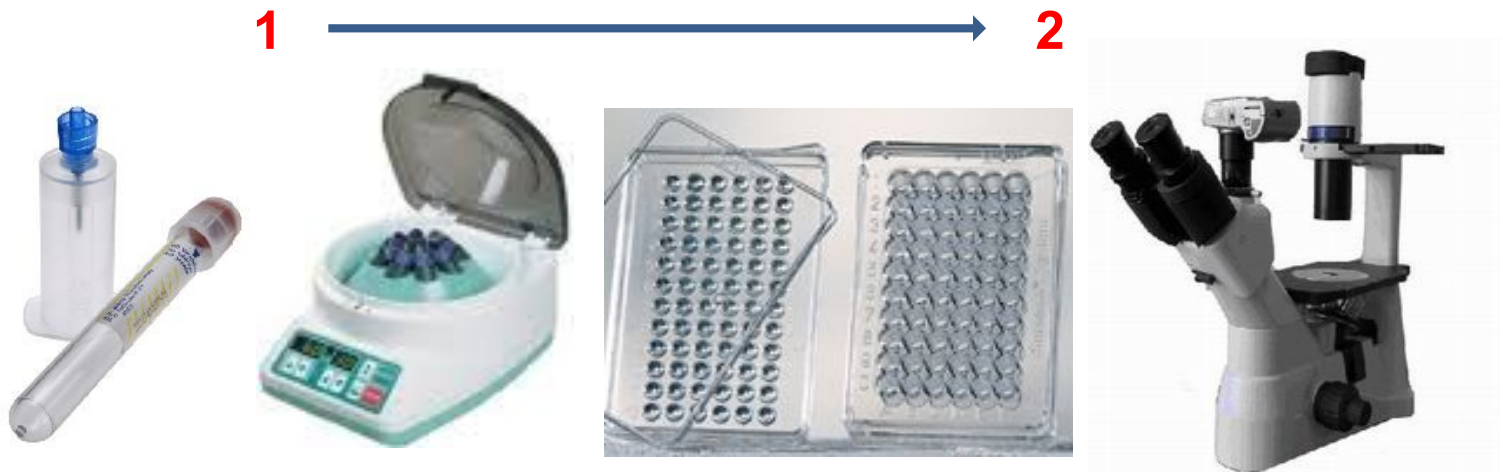


# ФЕНОТИПИРОВАНИЕ

## 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°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



+



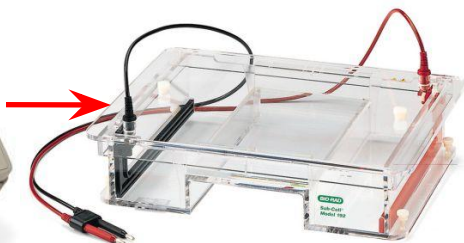
Полимераза,  
нуклеотиды,  $Mg^{2+}$



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



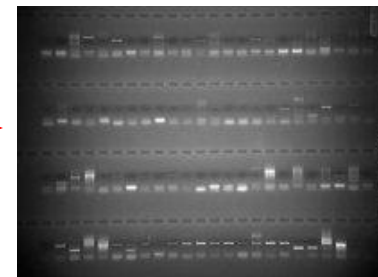
Аmplификация



Электрофорез



Фотодокументация



Интерпретация по  
таблице смесей  
праймеров

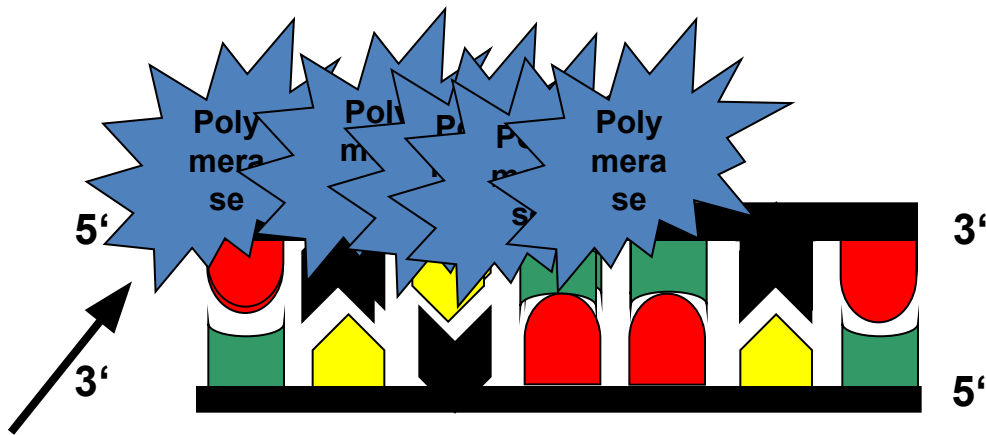
# SSP

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

## SSP (sequence specific primers)



3'Primer (reverse primer)



5'Primer (forward primer)

# SSP

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ SSP (sequence specific primers)

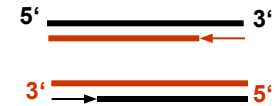
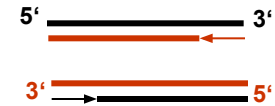
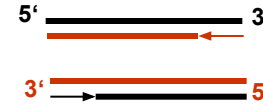
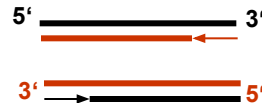
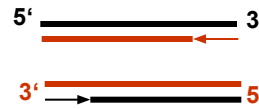
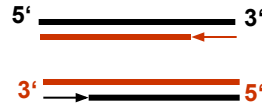
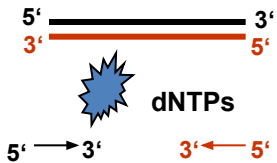
Цикл:

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

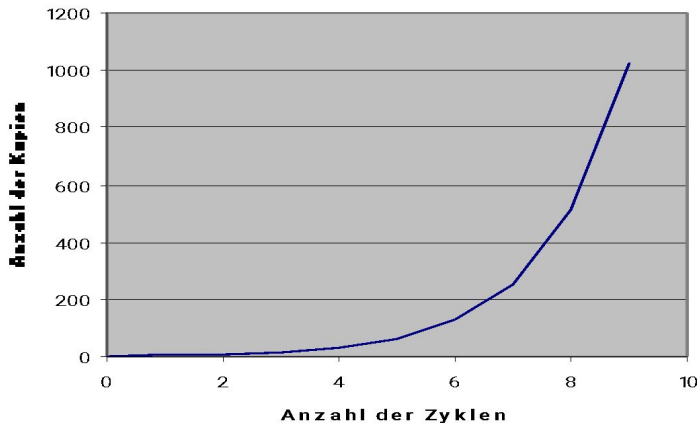
1. Цикл

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



+



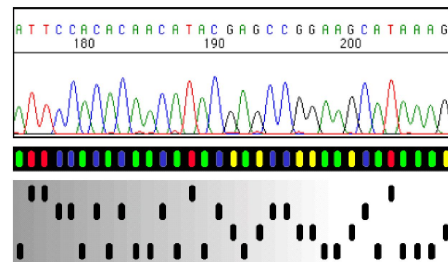
Полимераза, праймер к  
необходимому экзону,  
dNTP, ddNTP, Mg<sup>2+</sup>



Аmplification



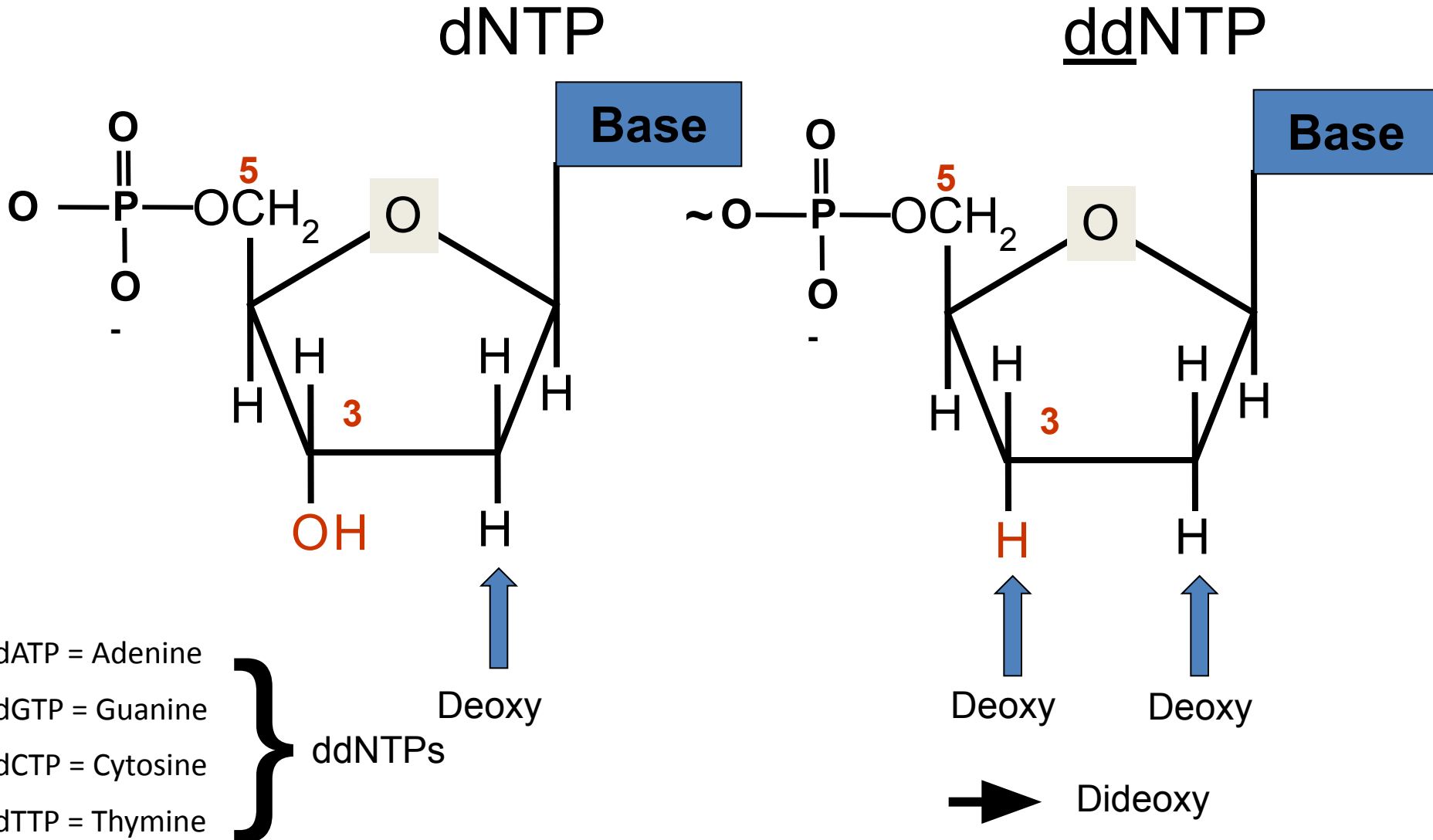
Капиллярный электрофорез



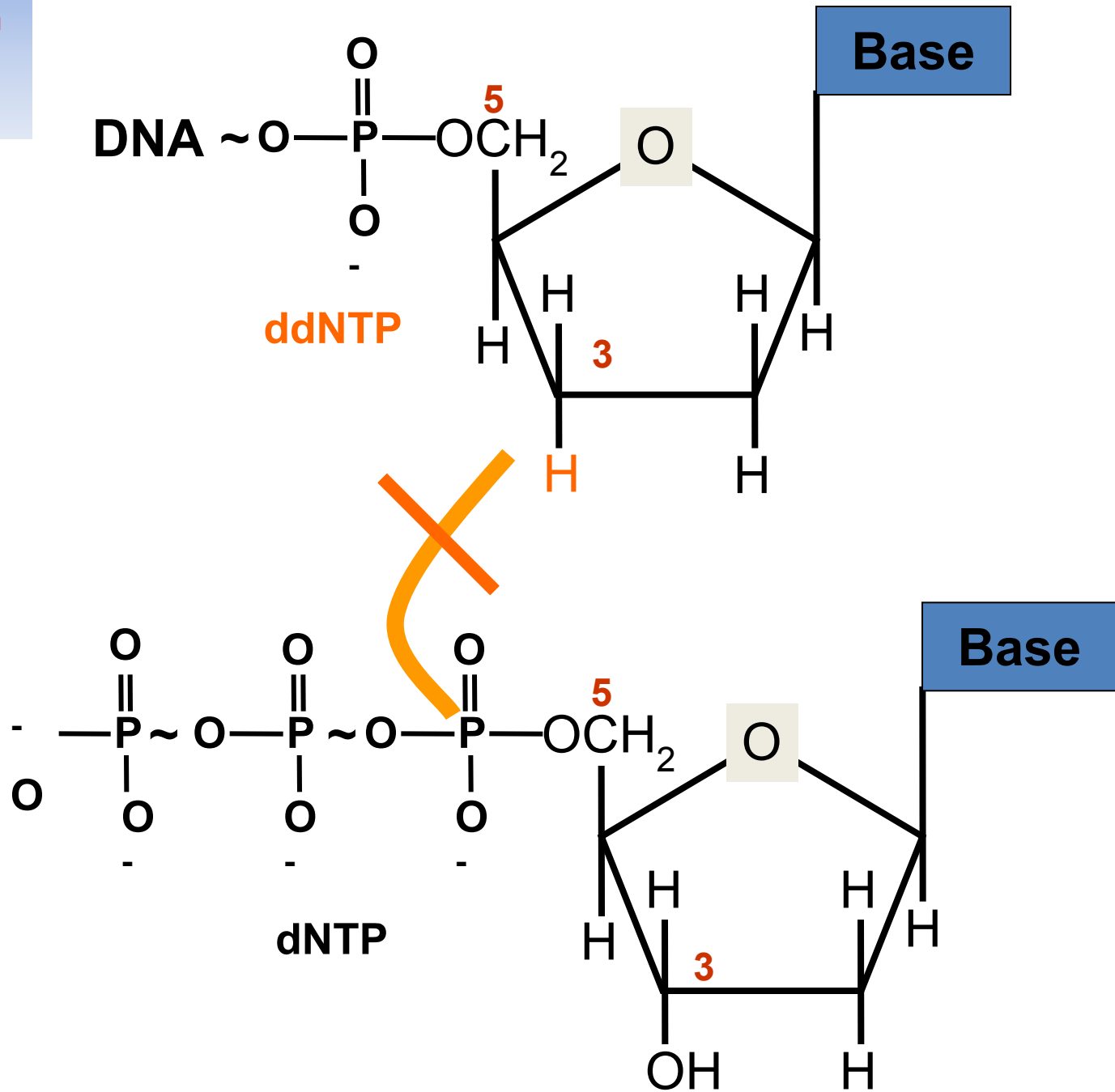
Интерпретация

# SBT

## Реакция секвенирования



# 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 sections:

- Administration:** Includes LIS, SeqHLA, Joining, Worklist, Sequence, Archiving, Amp. Modules, Seq. Primer, Statistic, and New RF Dirs.
- Sequence:** Contains patient information (Order No: 71020001, Patient: P-R36944, DNA No.: R36944, Date: 04/12/2007 06:43:21, Sample Src.:), procedures (HLA-A high, HLA-B high, HLA-Cw high), and state (compl. MV [ah 04/16/2007]).
- Result:** Shows the heterozygous result based on haplotypes: 1,2.het. (1+2) B\*1401, \*550101. HLA informatics group: 2.16 Date: 01/12/2007.
- Consensus:** Displays the consensus sequence: R C B D K V R Y W T T S G.
- Genes:** A table showing the state of genes A, B, and Cw.
- Positions / Resultfiles:** A table listing positions, directions, widths, states, bases, zygosity, HT, and amplicon sizes.
- Total Result:** A table summarizing the alleles and their locations.
- Functions:** Includes buttons for Previous, Next, T.V., M.V., print..., and Extras.

The central part of the interface shows a sequence alignment and chromatogram. The consensus sequence is displayed at the top, followed by the individual haplotypes (B\*1407N and B\*550101) and their combined sequence. Below the sequences are chromatograms for three different reads (#1: E2 fwd Haplotypes 1+2, #2: E2 rev Haplotype 1, #3: E2 rev Haplotype 2). The chromatograms show peaks for each nucleotide (A, C, G, T) and a vertical line indicates the position of the heterozygous site (R at position 170).

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
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

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).

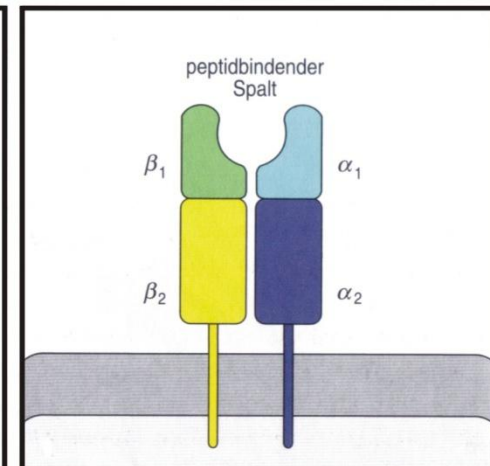
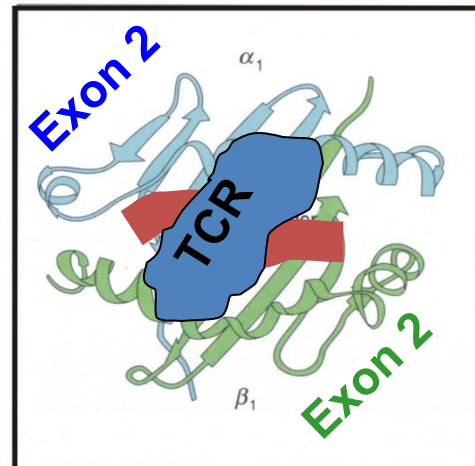
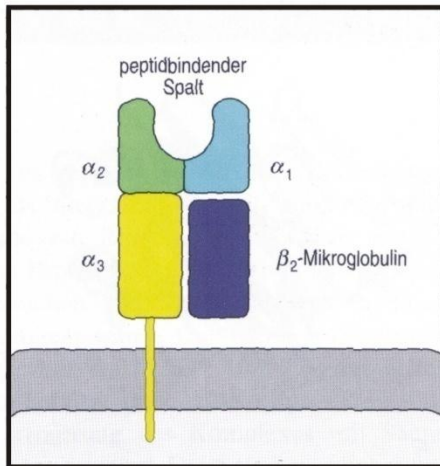
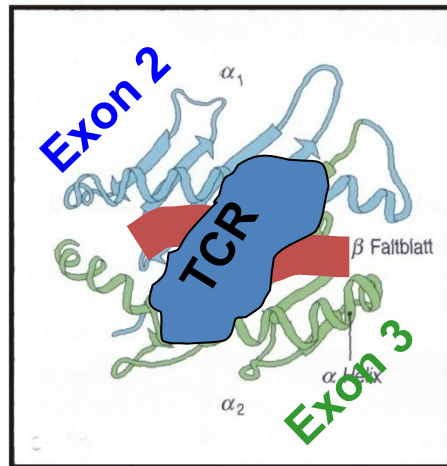
---

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

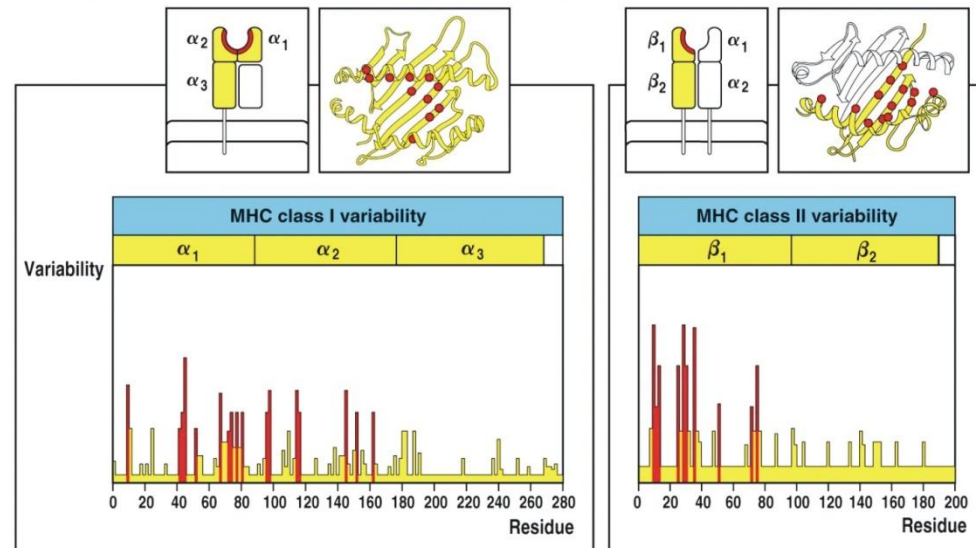


Figure 5-16 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# 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

LIS

SeqHLA

Joining

Worklist

Sequence

Archiving

Amp. Modules [master file]

Seq. Primer [master file]

Statistic [master file]

New RF Dirs [master file]

Thresholds

## Sequence

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]

Comments

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	rev		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

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: [v]

compl. rever: [v]

Exon/Intron

170 175

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

