

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Российский
национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации

НЛА типирование

Подготовил: студент 471 группы
МБФ Василий Цветков

Преподаватель: доцент, д.м.н.
Соколова Е.В.

Москва 2015

История открытия

- В 20-е годы XX века американские ученые Литтл (G.D. Little) и Снелл (G. Snell) с соавторами установили существование более 30 генетических локусов, различие в которых приводит к отторжению трансплантатов
- Они обозначили их как локусы гистосовместимости (H-локусы)
- Одновременно с Литтлом и Снеллом английский иммунолог Горер (P. Gorer) решил аналогичную проблему при изучении групп крови у мышей
- В 1948 году в совместной работе Снелла и Горера описан локус гистосовместимости, связанный с наиболее сильным отторжением. Он был назван H-2

...

- В 60-е годы французский иммуногематолог Доссе (J. Dausset) описал несколько лейкоцитарных антигенов у человека, сходных с продуктами локусов H-2. Открытый генетический комплекс получил название HLA
- Позднее аналогичные комплексы были обнаружены у всех исследуемых млекопитающих и птиц и были названы MHC

Определение

Главный комплекс гистосовместимости
- комплекс тесно сцепленных генетических локусов (и их белковых продуктов), ответственных за развитие иммунного ответа и синтез трансплантационных антигенов

Основные физиологические функции ГКГС

- Обеспечение взаимодействия клеток организма
- Обеспечение процессинга (переработки) и презентации пептидов – индукторов и мишеней иммунного ответа
- Распознавание собственных, измененных собственных и чужеродных клеток => запуск и реализация иммунного ответа против носителей генетической чужеродности
- Поддержание иммунологической толерантности (в том числе во время беременности)
- Участие в позитивной и негативной селекции Т-лимфоцитов
- Создание генетического разнообразия и обеспечение выживаемости вида

Основные свойства ГКГС

- Полигенность (открыто более 200 генов, входящих в состав главного комплекса гистосовместимости)
- Полиморфность (для значительной части генов системы гистосовместимости существуют множественные аллельные варианты)
- Кодоминантность (в гетерозиготном состоянии проявляются оба аллельных варианта)

ГКГС состоит из 3 классов

Класс	Кодирует	Экспрессирует
I	Пептид-связывающие белки, которые выбирают короткие последовательности аминокислот для презентации антигена, а также белки, способствующие процессингу	Одну цепь, названную α , связывающуюся с CD8 рецептором, находящемся на поверхности преимущественно цитотоксических Т-лимфоцитов
II	Пептид-связывающие белки и белки, которые способствуют загрузке пептидов в пептид-связывающие белки второго класса	Две цепи, называемые α и β , связывающиеся с CD4 рецептором, расположенным на поверхности Т-хелперов.
III	Другие иммунные белки, не участвующие в процессе обработки антигена и его презентации, такие как компоненты системы комплемента (например, C2, C4, фактор В), цитокины иммунной сигнализации	Разные белки

Антигены I класса

Классические антигены ГКГС представляют собой эпитопы к Т-клеточному рецептору CD8+ Т-лимфоцитов

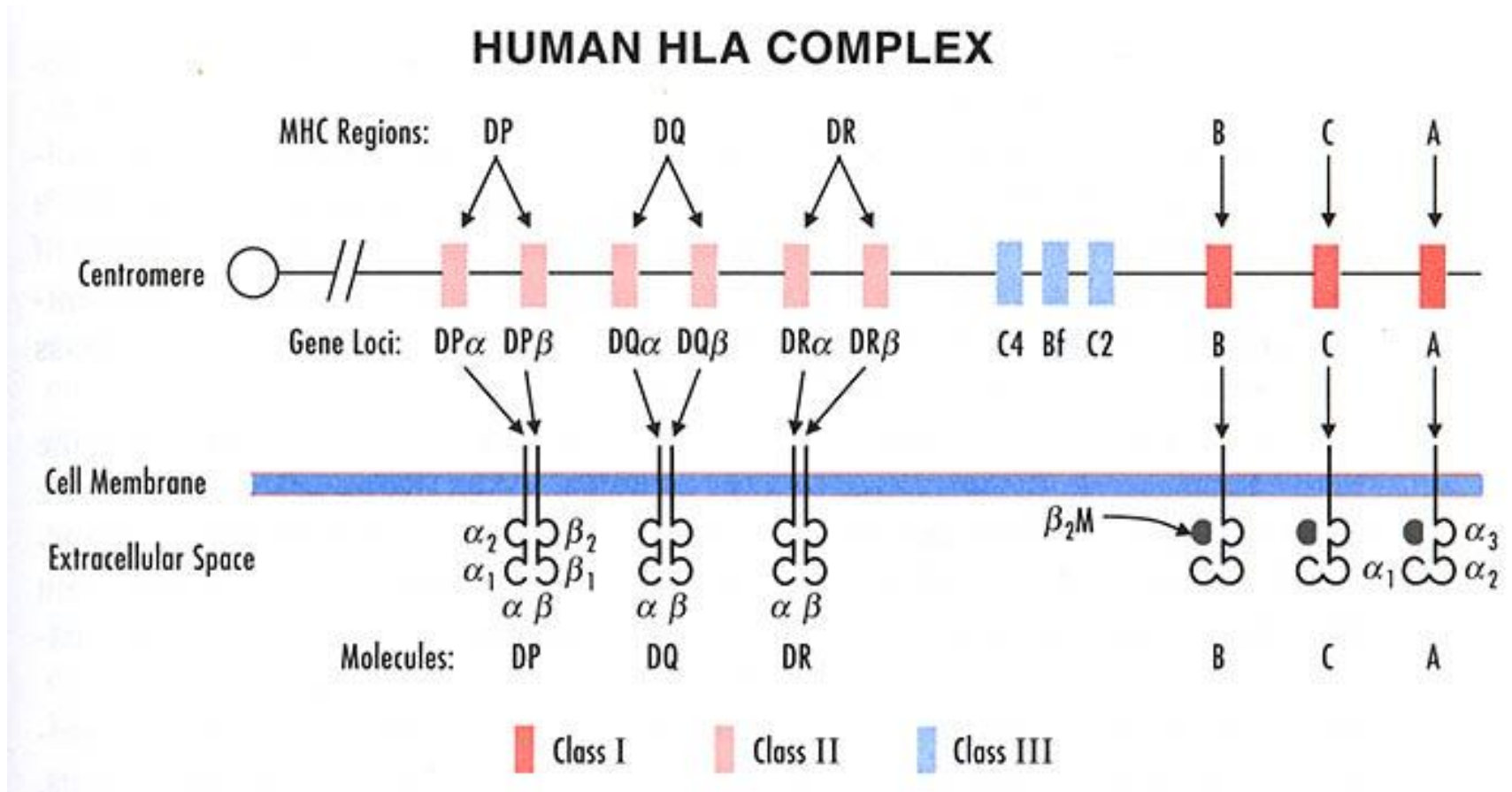
Неклассические антигены ГКГС проявляют ограниченный полиморфизм, паттерны экспрессии и презентруемые антигены. Эту группу можно разделить на гены, закодированные в локусе 1 класса ГКГС (такие как HLA-E, -F, -G), и остальные (например, стресс-индуцированные лиганды)

Антигены II класса

Классические антигены ГКГС
презентируют антигены CD4+ лимфоцитам

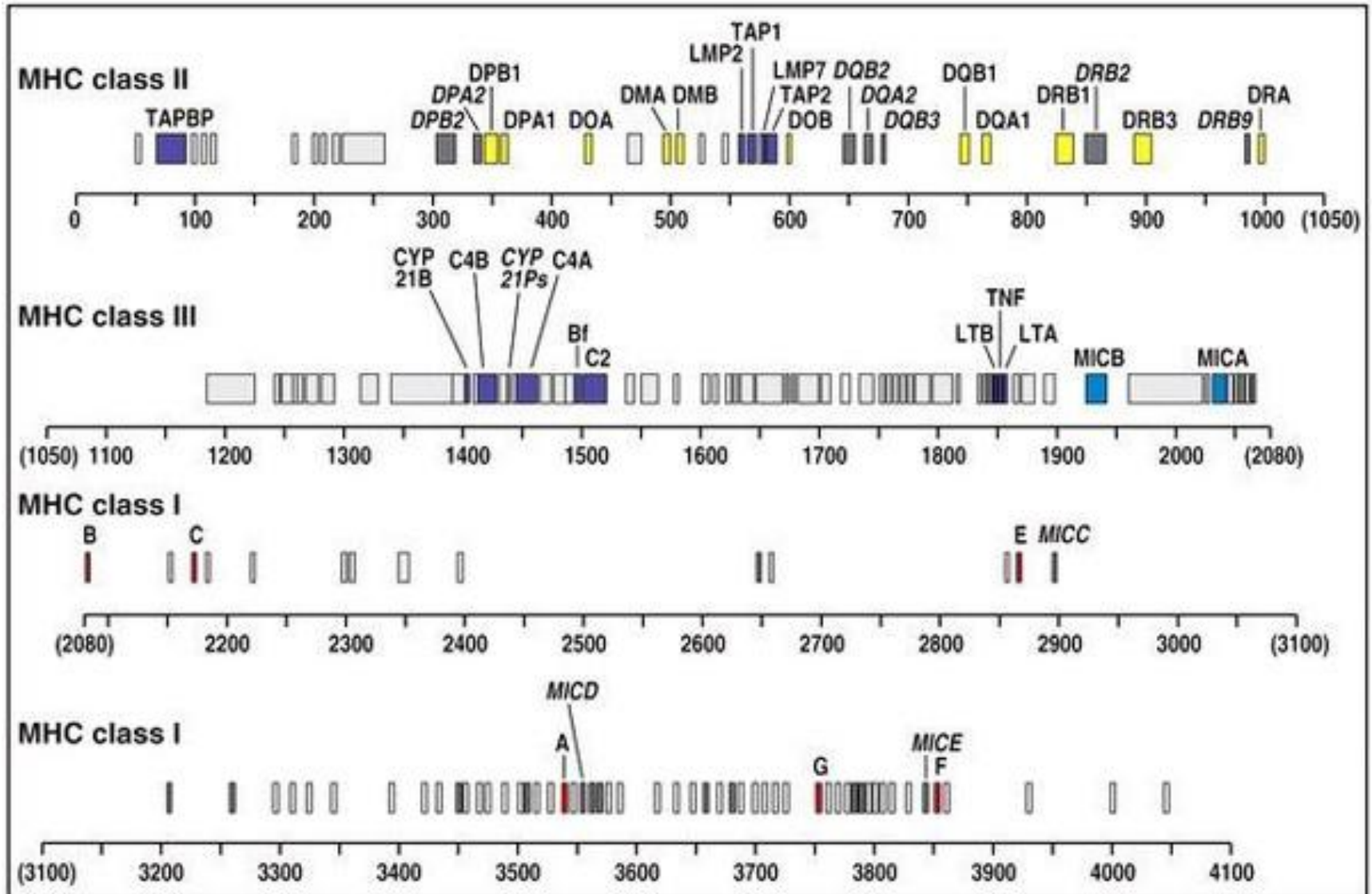
Неклассические антигены ГКГС
локализованы не на поверхности
мембраны, а в лизосомах, способствуя
загрузке антигенных пептидов в пептид-
связывающие белки второго класса

Классические антигены ГКГС



Неклассические антигены

ГЛГО



Наследование антигенов ГКГС

Аллельные формы генов ГКГС наследуются кодоминантно, как сцепленные группы, называемые гаплотипами

Антигены ГКГС I класса

- Располагаются на клеточной мембране (трансмембранный гликопротеин)
- Представляют из себя гетеродимер (белок состоит из 2 разных субъединиц)
- α -цепь заякорена в мембране и включает в себя 3 домена (α_1 , α_2 , α_3)
- β -цепь (β_2 -микроглобулин) с мембраной не связана, прикреплена к α -цепи нековалентно
- β_2 -микроглобулин не полиморфен и кодируется генами, расположенными в 15 хромосоме
- Домен α_3 и β -цепь по структуре относятся к суперсемейству иммуноглобулинов
- Домен α_3 способен связываться с молекулой CD8
- Домены α_1 и α_2 образуют особую структуру – щель/бороздку Бьоркмана, в которую встраивается антигенный пептид длиной 9-13 аминокислот, заякоренный в двух местах

Строение антигенов ГКГС I класса

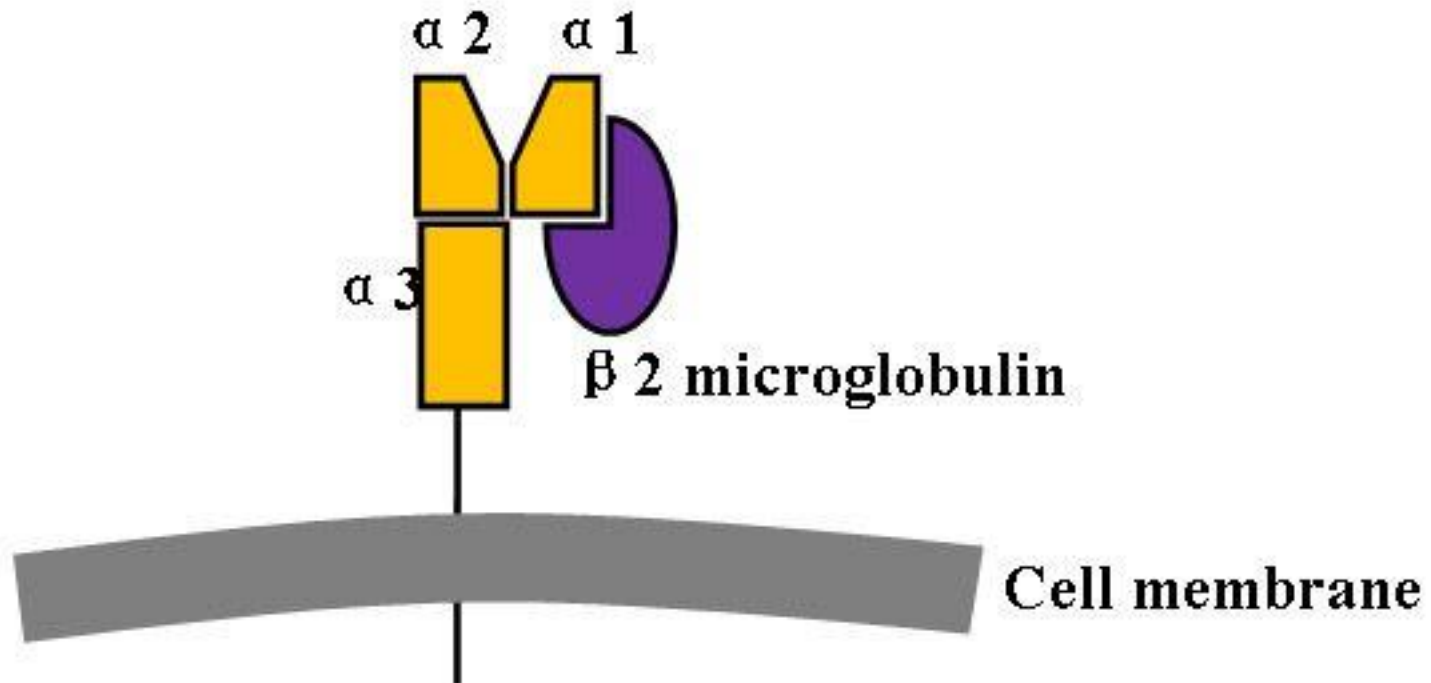


Иллюстрация из книги Дэвида Вагнера «Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy» 2011

Какие клетки экспрессируют гены ГКГС I класса?

- Продукты генов МНС I класса экспрессируются (располагаются) на мембранах ВСЕХ соматических клеток
- Исключение составляют эритроциты (лишены ядра) и клетки ворсинчатого трофобласта (обеспечение толерантности к плоду; на трофобласте экспрессированы неклассические молекулы МНС I)

Антигены ГКГС II класса

- Располагаются на клеточной мембране (трансмембранный гликопротеин)
- Представляют из себя гетеродимер (белок состоит из 2 разных субъединиц)
- α -цепь и β -цепь заякорены в мембране и включает в себя по 2 домена (α_1 , α_2 и β_1 , β_2 , соответственно)
- Домен α_2 и β_2 по структуре относятся к суперсемейству иммуноглобулинов
- Домены α_1 и β_1 образуют особую структуру – щель/бороздку Бьоркмана, в которую встраивается антигенный пептид длиной 12-25 аминокислот. Он заякорен в 5 местах и плотно прилегает к ГКГС II класса

Строение антигенов ГКГС II класса

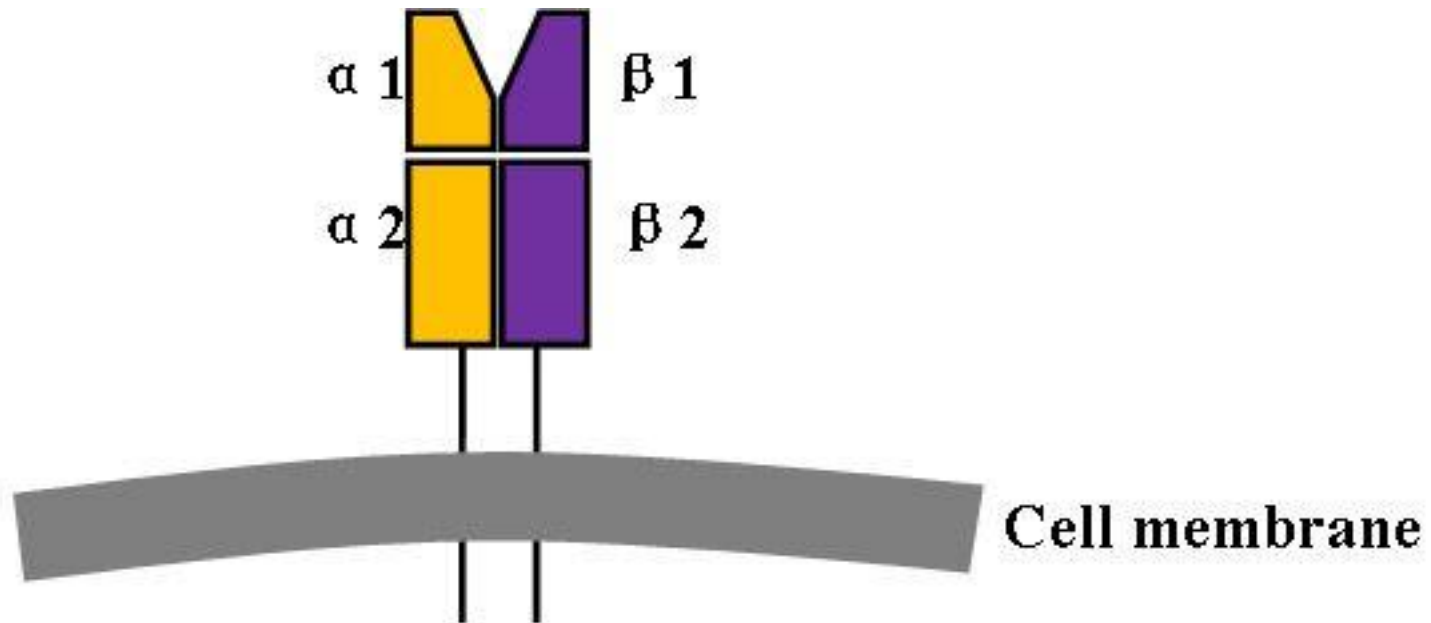


Иллюстрация из книги Дэвида Вагнера «Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy» 2011

Какие клетки экспрессируют ГКГС II класса?

- Продукты генов МНС II класса постоянно экспрессируются на мембранах антигенпредставляющих клеток (дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты)
- Молекулы МНС II могут присутствовать на мембранах нейтрофилов, тучных клеток, базофилов, эозинофилов, при стимуляции появляются на эпителии и эндотелии

Щель Бьоркмана предназначена для встраивания в нее антигенного пептида

У МНС I класса

- Образована доменами α_1 и α_2
- Вмещает пептид размером 9-13 а/к
- Встраиваемый пептид имеет эндогенное происхождение

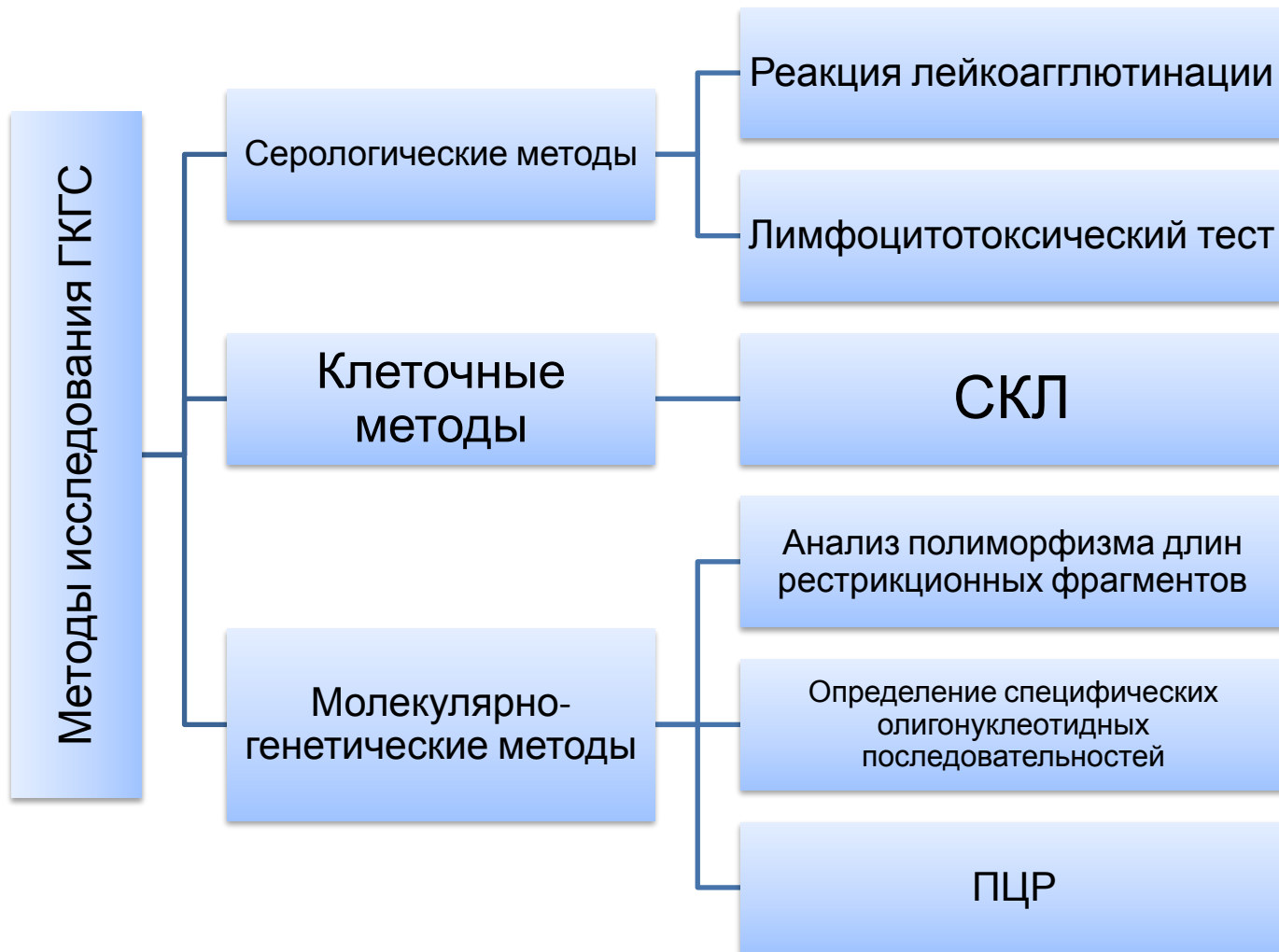
У МНС II класса

- Образована доменами α_1 и β_1
- Вмещает пептид размером 12-25 а/к
- Встраиваемый пептид имеет экзогенное происхождение

Роль ГКГС в иммунных процессах

- Взаимодействуя с CD4 рецепторами на поверхности Т-хелперов, антигены II класса ГКГС модулируют приобретенный иммунитет
- Взаимодействуя с CD8 рецепторами на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов, антигены I класса ГКГС вызывают элиминацию инфицированных и злокачественных клеток. Таким образом антигены I класса ГКГС способствуют работе клеточного иммунитета
- Опосредованно антигены III класса ГКГС участвуют в работе гуморального иммунитета

Методы исследования ГКГС



При типировании определяют:

- **Гаплотип** (набор генов HLA на одной из гомологичных хромосом) – определяют с помощью типирования родителей
- **Генотип** (набор генов на двух хромосомах)
- **Фенотип** (антигенное представление молекул HLA на поверхности клеток)

Реакция лейкоагглютинации

Это метод определения тканевой совместимости донора и реципиента, основанный на феномене агглютинации лейкоцитов донора под действием антилейкоцитарных антител (т.е. метод направлен на **определение в сыворотке реципиента АТ против HLA-молекул донора**)

Постановка:

1. Ряд разведений исследуемой сыворотки реципиента
2. Добавление взвеси лейкоцитов донора
3. Встряхивание и инкубация
4. Центрифугирование
5. Удаление супернатанта и лизис э/ц уксусной кислотой
6. Мазок для микроскопирования

Учет реакции лейкоагглютинации

– Выраженность агглютинации:

- **интенсивная**, т.е. крупные агломераты, значительная площадь свободной жидкости +++++
- **выраженная** - наряду с агломератами лейкоцитов в жидкости можно видеть небольшое количество свободных меток +++
- **средняя** - среди взвешенных клеток выявляются островки агглютинатов ++
- **слабая мелкоглыбчатая** - преобладают свободные клетки, но встречаются небольшие комочки склеившихся клеток +

– Разведение сыворотки, в которой еще отмечается агглютинация

Минусы:

- Низкая воспроизводимость рез-ов
- Неспецифическая агглютинация
- Спонтанная агглютинация при высокой концентрации нежизнеспособных Лц

Лимфоцитотоксический тест

Метод заключается в следующем:

- К сывороткам против разных антигенов HLA добавляют по 2000 исследуемых лимфоцитов.
- После инкубации добавляют комплемент
- Лимфоциты, несущие антиген, против которого направлена сыворотка, под действием комплемента разрушаются.
- Затем к лимфоцитам добавляют краситель, который окрашивает только живые клетки (также можно исп-ть ^{51}Cr)
- Результат оценивают по относительному числу погибших лимфоцитов

Резко положительный результат свидетельствует о том, что лимфоциты несут исследуемый антиген.

Число погибших клеток, %	Балл	Результат
0—10	1	Отрицательный
11—20	2	Сомнительный
21—50	4	Слабо положительный
51—80	6	Положительный
81—100	8	Резко положительный

СКЛ

- Применяют в основном для определения HLA II класса
- В качестве «-» контроля используются культуры, состоящие только из отвечающих клеток
- В качестве «+» контроля - культура отвечающих клеток, стимулированных смесью лимфоцитов от разных доноров
- Если радиоак-ть в СКЛ > радиоак-ти в «-» контроле не более чем на 20% или составляет не более 20% от радиоак-ти в «+» контроле, считают, что донор и реципиент совместимы по антигенам HLA

Молекулярно-генетические методы

В настоящее время молекулярно-генетические методы используются только для типирования генов HLA класса II.

- I. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов
- II. Определение специфических олигонуклеотидных последовательностей
- III. ПЦР

I. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Метод основан на способности бактериальных эндонуклеаз расщеплять ДНК в сайтах рестрикции (участки, в которых сосредоточены специфические для определенной эндонуклеазы последовательности нуклеотидов)

Длину рестрикционных фрагментов оценивают методом гибридизации ДНК на твердой подложке

Постановка:

1. **Фрагменты ДНК**, полученные после ее обработки эндонуклеазами, **разделяют с помощью электрофореза в геле**
2. **Перенос** на нитроцеллюлозную мембрану и **инкубация с мечеными фрагментами ДНК**, комплементарными уникальным нуклеотидным последовательностям какого-либо аллеля гена HLA
3. **Выявление фрагментов**, с которыми связались меченые фрагменты ДНК, и **определение их длины** (по длине пробега фрагментов ДНК в геле)

Учет:

- По длине фрагментов судят о присутствии тех или иных аллелей HLA у исследуемого
- Если у донора и реципиента **выявляются фрагменты одинаковой длины**, считается, что они **несут одинаковый аллель HLA**

Недостатки метода:

- большие затраты времени (обычно 2-3 нед);
- невозможность различить аллели, сайты рестрикции в которых расположены в одних и тех же участках;
- большое количество клеток для исследования (для получения достаточного количества ДНК необходимо по крайней мере 10-15 млн клеток);
- отсутствие эндонуклеаз, специфичных для определенных аллелей.

II. Определение специфических олигонуклеотидных последовательностей

- Аллели генов HLA иногда отличаются друг от друга лишь по одной паре нуклеотидов
- Синтезированы одноцепочечные олигонуклеотидные **зонды**, состоящие из 19-24 нуклеотидов, полностью **комплементарные уникальным последовательностям каждого известного аллеля гена HLA**
- Созданы также **зонды, комплементарные общим для нескольких аллелей последовательностям**
- Т.о., для определения неизвестного аллеля можно последовательно использовать серию зондов разной специфичности
- Для гибридизации с олигонуклеотидными зондами можно использовать как рестрикционные фрагменты ДНК, полученные с помощью эндонуклеаз, так и фрагменты ДНК, полученные с помощью полимеразной цепной реакции

III. ПЦР

- метод избирательной амплификации, предназначенный для получения большого количества копий фрагментов ДНК с определенной нуклеотидной последовательностью

Достоинства метода:

- высокая чувствительность
- высокая специфичность
- прост в исполнении
- нет необходимости в сложной очистке матрицы
- подходит практически любой материал

Реакция проводится в программируемом термостате – амплификаторе

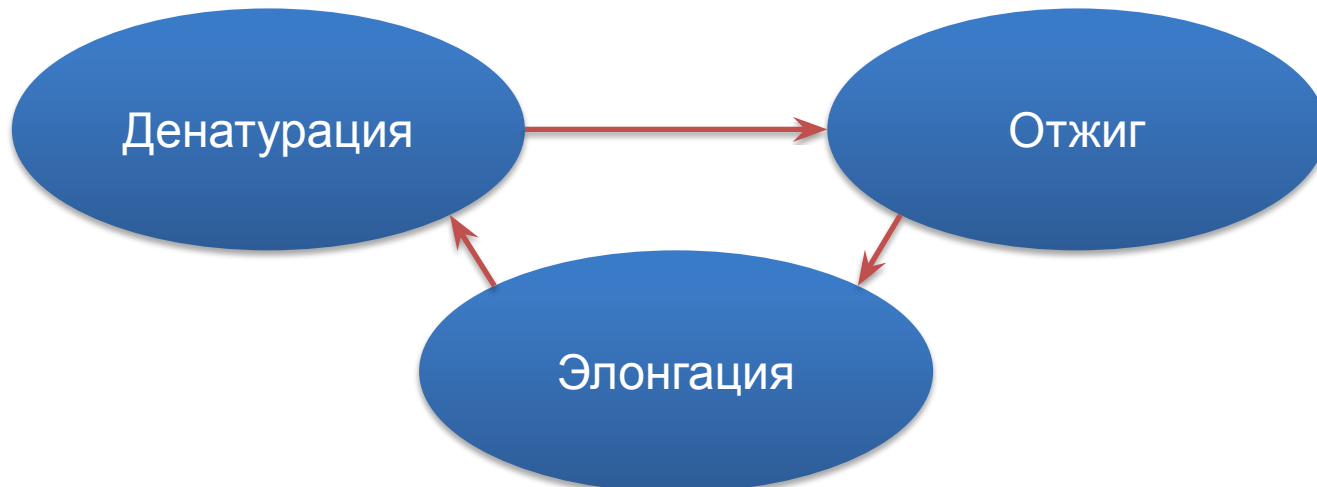
Компоненты реакции

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

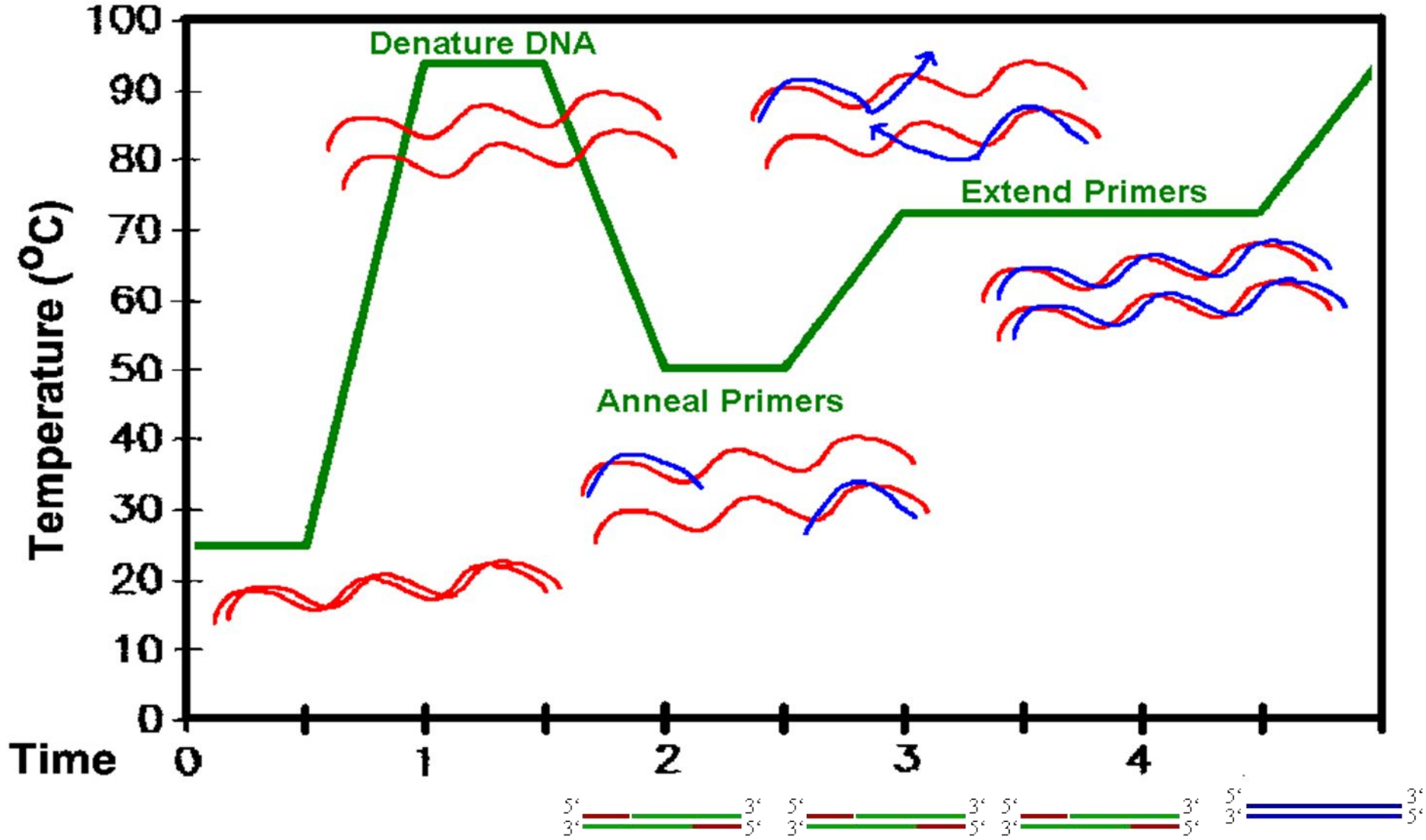
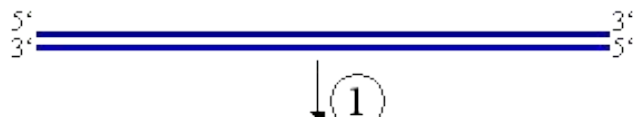
- **ДНК-матрица**, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- **Два праймера**, комплементарные концам требуемого фрагмента.
- **Термостабильная ДНК-полимераза** — полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermusaquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcusfuriosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcuswoesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- **dNTP** (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- **Буферный раствор**, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Стадии (обычно 20-40 циклов)

- **Денатурация ДНК** - получение двух однонитевых фрагментов (90-95 °С, 5-90сек) (перед первым циклом – прогрев чтобы цепи полностью разошлись)
- ▣ **Отжиг** - гибридизация праймеров с матрицей при плавном понижении Т (40-60 °С, 5-60сек)
- ▣ **Элонгация** - синтез комплементарной последовательности нуклеотидов (72-74 °С, время зависит от длины продукта)
- ▣ Инкубация после завершения всех циклов



(1) Денатурация при 94-96 °C



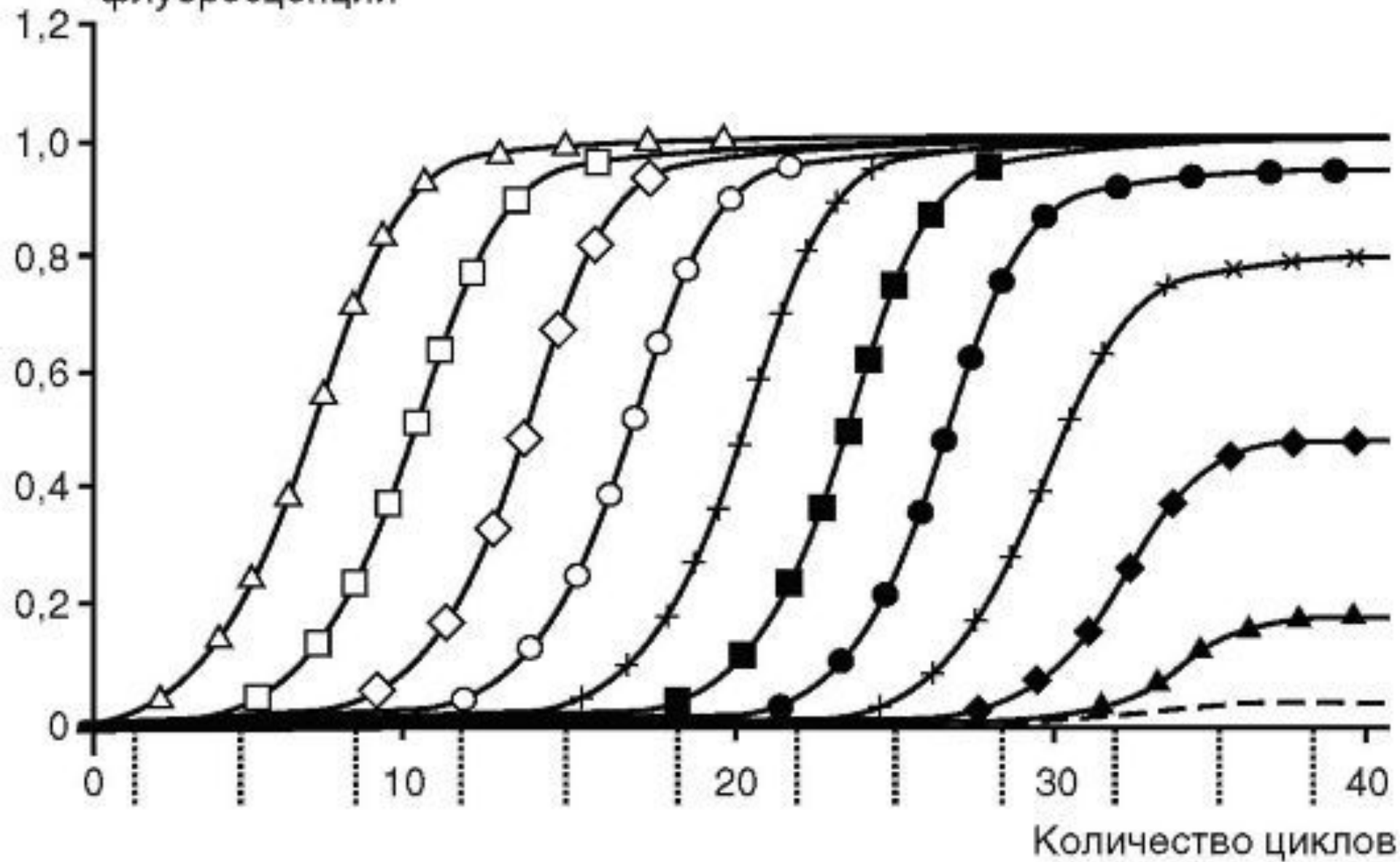
Виды ПЦР

- Количественная ПЦР или ПЦР в реальном времени (Q-PCR, RT-PCR)
- «Вложенная» ПЦР (Nested PCR)
- «Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR)
- ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)
- Мультипраймерная полимеразная цепная реакция ПЦР (multiplex PCR, multiprimer PCR)
- Заякоренная ПЦР
- ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR)
- Ассиметричная ПЦР (Asymmetric PCR)
- Touchdown (Stepdown) ПЦР
- Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле, Colony - PCR Colony)
- RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR) ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК
- ПЦР с использованием горячего старта (Hot-start PCR)

Real time-PCR

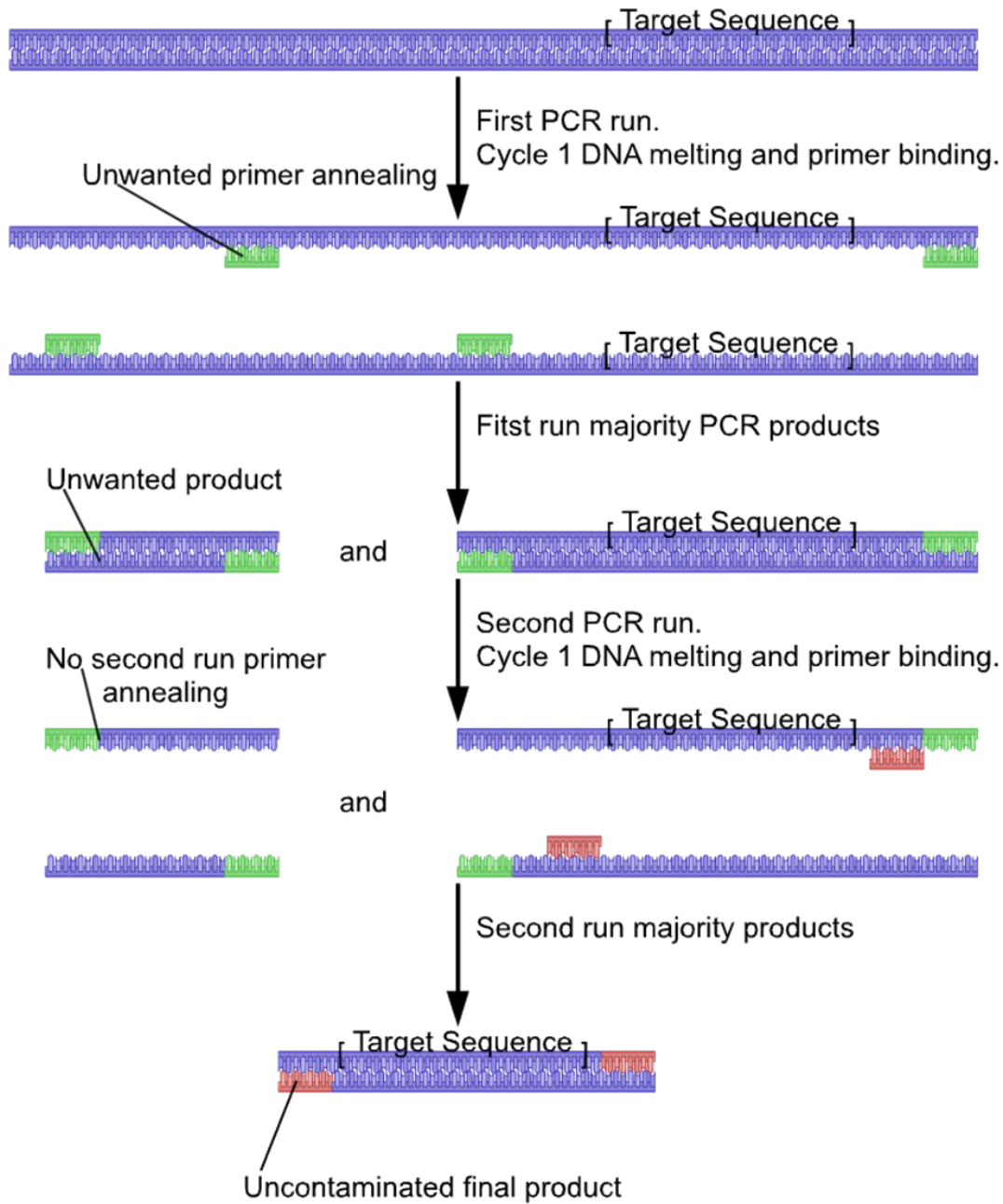
- Регистрируется **количественное накопление продукта в реальном времени**, т.е. после каждого цикла
- Т.о. можно оценить кинетику реакции
- Для этого исп-я специфические комп-ты:
 - - флуоресцентный интеркалирующий краситель (SYBR-green)
 - - гибридационные зонды (метод «TaqMan») - добавляют олигонуклеотидный зонд, меченный по 5'-концу флюорофором и содержащий глушитель флуоресценции, в ходе реакции термостабильная Taq-полимераза вытесняет зонд из дуплекса, а затем отщепляет его 5'-концевой нуклеотид, меченный флюорофором (светится, если отделен от глушителя)

Уровень
флуоресценции



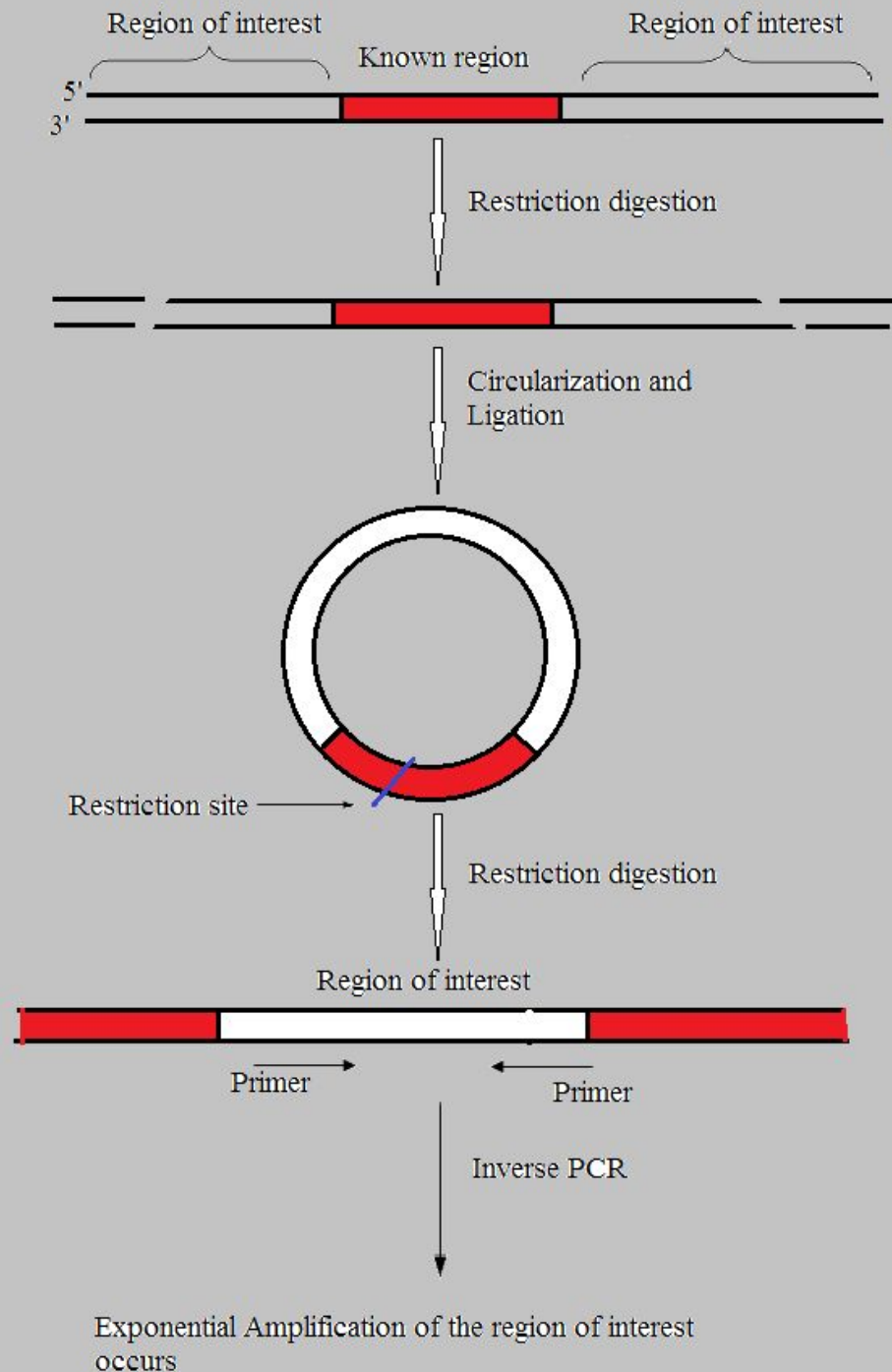
«Вложенная» ПЦР (Nested PCR)

- Исп-т 2 пары праймеров для уменьшения кол-ва побочных продуктов
- Вторая пара амплифицирует уч-к ДНК внутри первой пары



«Инвер

- Дает во
- ДНК, фл
- ИЗВЕСТН
- Прайме
- наружу



verse

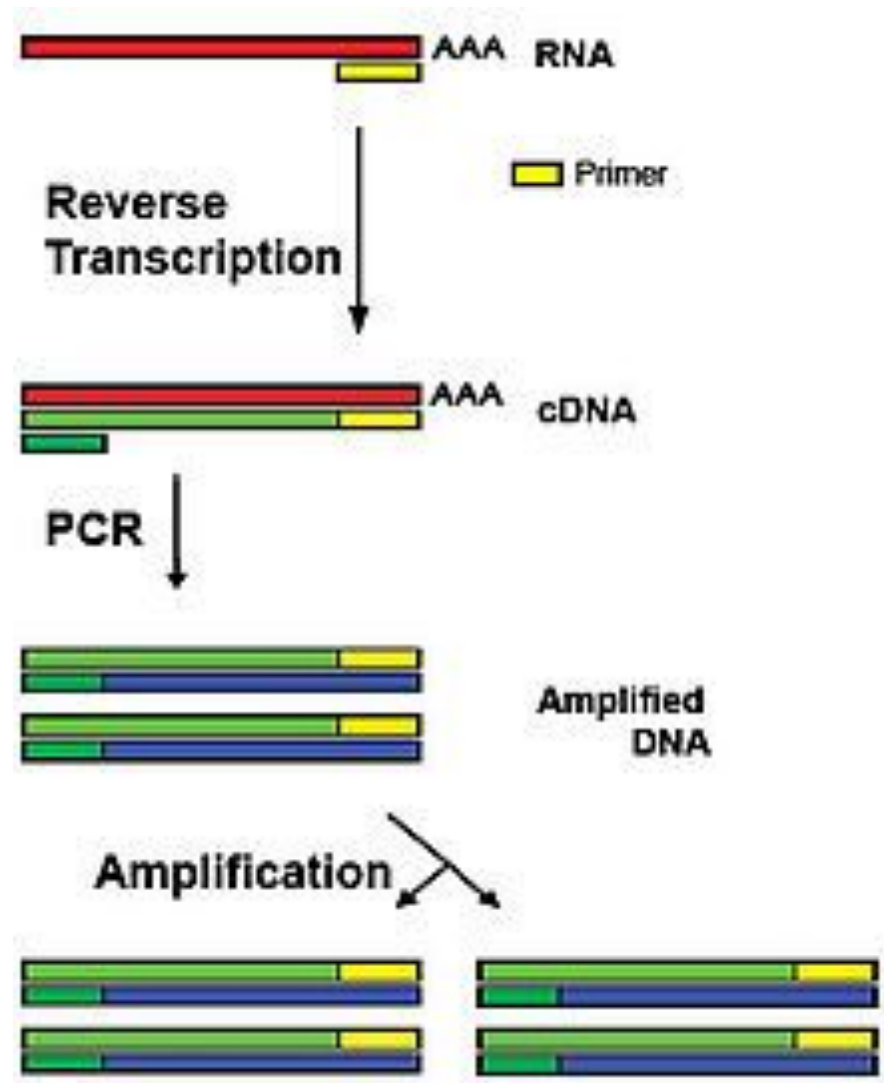
Ч-КИ

дами

Exponential Amplification of the region of interest occurs

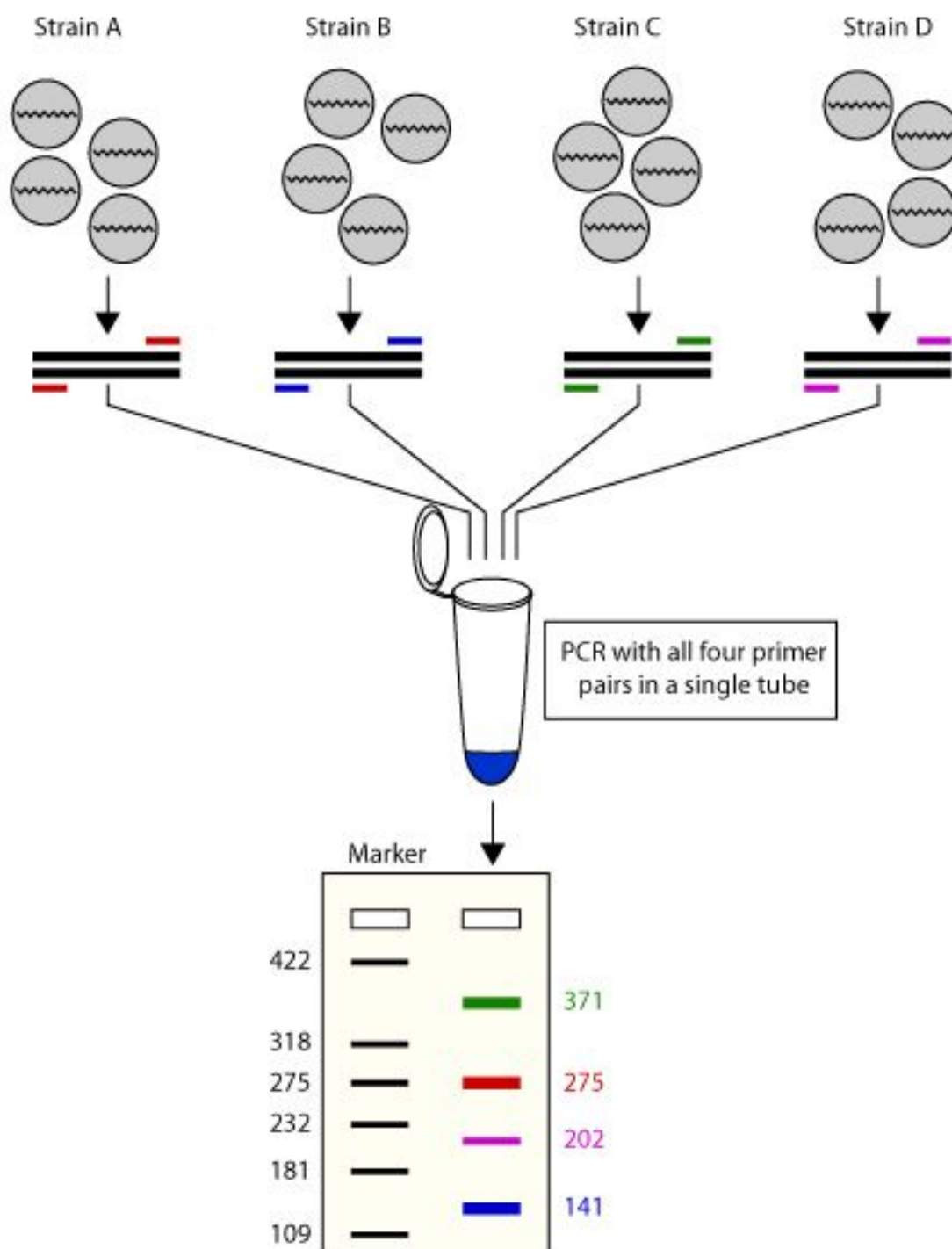
ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

- Метод заключается в последовательном сочетании **обратной транскрипции** (синтез одноцепочечной ДНК на матрице РНК) и **полимеразной цепной реакции**
- Этим методом часто определяют экспрессию генов



Мультиплекс

- Одна пара праймеров приводит к образованию ДНК-продукта
- Такая реакция используется для идентификации штаммов, например, при исследовании инфекционных заболеваний



ция ПЦР

НОЙ
), ЧТО
ЛЬКИХ

время,
СС-
ГОВ,

ЛЯ
КИХ
ИХ

Заякоренная ПЦР



ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR)

- Модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований)
- Используют смесь двух полимераз, одна из которых — **Taq-полимераза с высокой процессивностью** (то есть, способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая — **ДНК полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью**, обычно это Pfu полимераза
- Вторая полимеразы необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесённые первой

Асимметричная ПЦР

праймер 1



праймер 2



пцр

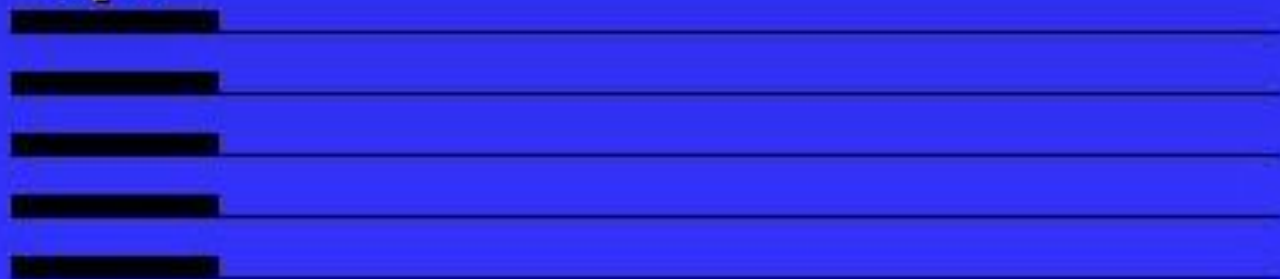
пр1



дцДНК

+

пр1



оцДНК

Touchdown (Stepdown) ПЦР

- С помощью этого подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров
- Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной
- Это делается для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига, праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью.

- **Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле, англ. Colony - PCR Colony)** — акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.
- **ПЦР с использованием горячего старта (Hot-start PCR)** — вариант полимеразной цепной реакции для предотвращения неспецифической амплификации фрагментов ДНК (в одном из вариантов метода для этой цели первоначально ДНК-полимеразу и реакционную смесь разделяют легкоплавким физическим барьером (напр., воском); при нагревании пробирки переход ДНК-полимеразы в реакционную смесь происходит при

Протоколы генотипирования

SSP

1. Выделение ДНК
2. Пробоподготовка ПЦР
3. Амплификация (1,5 часа)
4. Электрофорез в агарозном геле
5. Анализ результатов

SSO

1. Выделение ДНК
2. Пробоподготовка ПЦР
3. Амплификация (1,5 часа)
4. Электрофорез в агарозном геле (контроль амплификации)
5. Гибридизация
6. Окрашивание
7. Считывание и анализ результатов

SBT

1. Выделение ДНК
2. Пробоподготовка ПЦР
3. Амплификация (5 часов)
4. Электрофорез в агарозном геле
5. Анализ результатов
6. Ферментативная очистка ампликонов
7. Пробоподготовка ПЦР с мечеными ddNTP
8. Амплификация (2 часа)
9. Отмывка полученных фрагментов на магнитных частицах
10. Секвенирование (капиллярный секвенатор)
11. Анализ результатов

Детекция

- Гель-электрофорез
- Дот-блот-гибридизация
- Блот-гибридизация по Саузерну
- Секвенирование
- Олигонуклеотидные зонды

Чаще всего используется самый простой метод – гель-электрофорез в агарозном или ПАА гелях окрашенных бромистым этидием. Специфичность полосы подтверждается ее положением по отношению к маркерным фрагментам ДНК.

