

Лекция 6


ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетика главного комплекса гистосовместимости


МНС (HLA-система) – обширный геномный регион (семейство генов), расположенный на коротком плече 6-й хромосомы человека. Эти гены имеют большое количество вариантов (аллелей), то есть обладают очень высоким полиморфизмом.

Генетика главного комплекса гистосовместимости

- Спектр аллелей каждого гена комплекса HLA уникален для каждого организма и определяет его биологическую индивидуальность. Существует более триллиона комбинаций, и практически невозможно найти людей, имеющих одинаковые сочетания HLA-антигенов (за исключением однояйцевых близнецов).



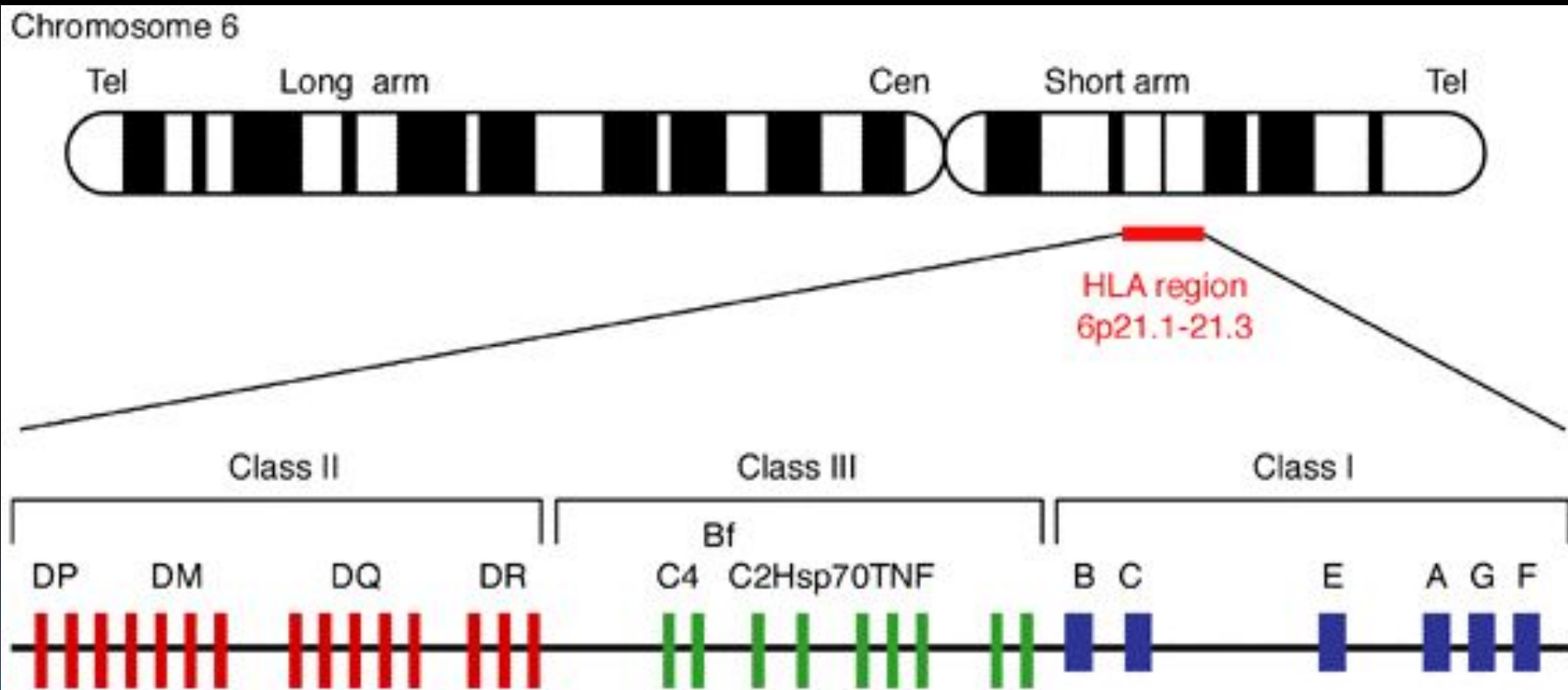
Гены HLA группируются в подсемейства (локусы): A, B и C кодируют антигены I класса, D - антигены II класса. Названия генов и антигенов HLA состоят из одной или нескольких букв и цифр, например A3, B45, DR15, DQ4.



Буква обозначает ген (область и локус), а цифры - аллель этого гена (при этом цифровые обозначения присваиваются по мере открытия новых аллелей).

- По современным представлениям система HLA обеспечивает регуляцию иммунного ответа, контролируя такие важнейшие физиологические функции, как взаимодействие иммунокомпетентных клеток организма, распознавание клеток, запуск и реализация иммунного ответа. Сходный генетический регион найден у всех позвоночных и получил название «главный комплекс гистосовместимости» - Major Histocompatibility Complex (MHC).

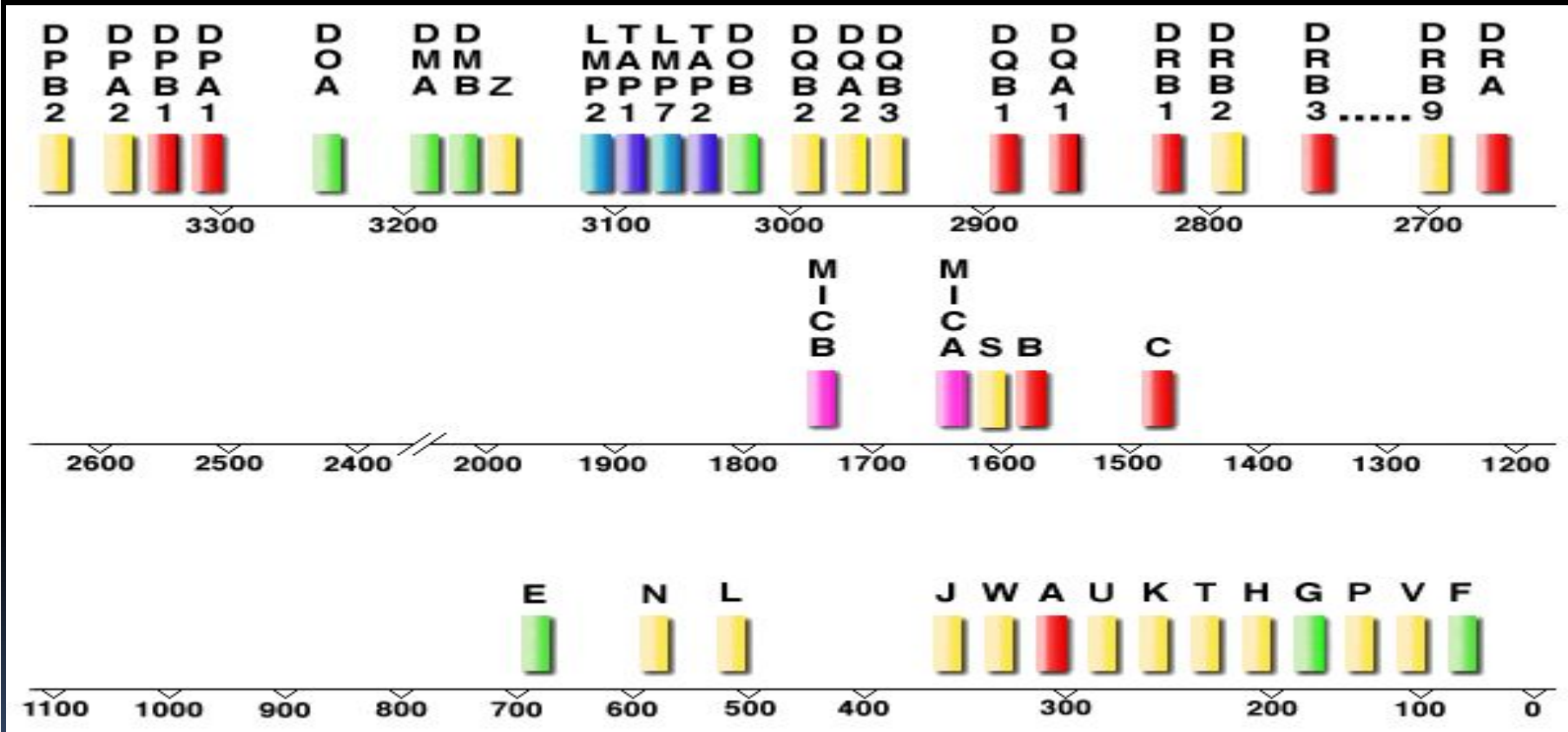
Строение главного комплекса гистосовместимости человека



Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2003 Cambridge University Press

Упрощенная молекулярная карта главного комплекса гистосовместимости человека



- В соответствии с биохимическим строением и функцией HLA-антигены подразделяются на антигены класса I, антигены класса II и антигены класса III.
- ► HLA-антигены класса I кодируются генами локусов A, B и C и являются так называемыми трансплантационными антигенами. Они присутствуют на поверхности всех ядродержащих клеток. HLA-антигены класса I необходимы для распознавания трансформированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами.

▶ HLA-антигены класса II кодируются генами локусов DR, DP, DQ. Они располагаются в основном на мембранах В-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов, лейкоцитов, моноцитов, макрофагов и дендритных клеток. Гены этого класса контролируют силу иммунного ответа.

▶ HLA-антигены класса III являются компонентами системы комплемента и цитокинами; кодируются генами локусов C2, C4a, C4b и др. Они контролируют синтез молекул комплемента - неспецифического фактора иммунной защиты организма.

Аллельные варианты генов HLA-системы могут быть определены методом аллель-специфичной ПЦР. В зависимости от цели исследования, проводится либо полное HLA-типирование, либо типирование отдельных семейств генов. В случае выяснения предрасположенности пациента к одному из заболеваний, связанных с определёнными сочетаниями аллелей, возможно типирование только этих вариантов генов. Например, при исследовании аллелей ряда генов HLA обнаружена взаимосвязь в виде повышенного риска возникновения таких заболеваний как сахарный диабет I типа, ревматоидные заболевания, аутоиммунный тиреоидит, восприимчивость к инфекционным заболеваниям и других.

Основные принципы и механизмы ассоциации антигенов системы HLA с заболеваниями

- **1. Генетический контроль иммунного ответа.**
- **Ассоциации HLA-антигенов с различными патологическими состояниями являются следствием аномального функционирования Ir-генов.**
- **Будучи сцепленными с HLA-локусами, они обуславливают возникновение различных дефектов иммунитета, полагают, что сублокус HLA-D находится в I-области, в которой и расположены гены иммунного ответа, ответственные за его силу.**

Данные об ассоциации между МНС комплексом и болезнями является подтверждением наличия связи генов иммунного ответа с HLA-системой.

Установлено увеличение частоты *гаплотипа A1, B8, DR3* у больных с аутоиммунными заболеваниями. С указанными аллелями ассоциирована группа генов, определяющих высокую реактивность к различным агентам. У лиц с этими антигенами значительно снижена функциональная активность Т-супрессоров и высокий иммунный ответ на стимуляцию поликлональными антигенами.

С *HLA-A3, B7, DR2* ассоциированы многие заболевания, для которых характерен *сниженный иммунитет*.


- 2. **Детерминантная теория** заключается в том, что ассоциированные с заболеванием *HLA-молекулы* обладают способностью связывать чужеродные пептиды или аутоантигены в специальные конфигурации, которые запускают Т-клеточноопосредованные заболевания.

3. **Теория молекулярной мимикрии** состоит в том, что в результате идентичности антигенных детерминант возбудителя (вируса или бактерии) с определенными *HLA-молекулами* или их фрагментами не наступает распознавание «чужого» и развитие адекватного иммунного ответа, в результате чего возбудитель «безнаказанно» поражает организм человека.

Именно с помощью данной теории объясняют развитие *HLA-B27-ассоциированных заболеваний* (болезни органов движения).

Поражения костно-мышечной системы вызываются микробными агентами: иерсиниями, клебсиеллами, шигеллами, сальмонеллами, хламидиями, кампилобактериями. Эти бактерии являются перекрестно реагирующими с *HLA-B27*, что приводит к развитию заболеваний.

- **4. Рецепторная теория** – чужеродный агент взаимодействует непосредственно с определенными антигенами гистосовместимости, обладая повышенной тропностью к ним. Примером может являться развитие вирусного гепатита В, ассоциированного с наличием антигенов *HLA-B18* и *B35*.
- **5. Гипотеза модификации HLA-молекул** заключается в следующем: антигены *HLA*, модифицированные инфекционным или другим агентом, распознаются в организме как «чужие» и против них развивается иммунный ответ (аутоиммунные заболевания – СД, ревматические болезни, заболевания щитовидной железы).



6. Теория тимической селекции – недостаток презентации пептидов *HLA-аллелями* во время тимической дифференциации, что приводит к развитию аутоагрессии патологических Т-клеток. Существуют и другие теории, объясняющие взаимосвязь между системой HLA и заболеваниями, которые требуют дальнейшего всестороннего дальнейшего изучения.

- **Функциональное значение** главного комплекса гистосовместимости заключается в реализации важных биологических феноменов: трансплантации органов и тканей; генетическом контроле иммунного ответа; межклеточном взаимодействии; осуществлении контроля активности комплемента; регуляции уровня и синтеза стероидных гормонов, процессов эмбриогенеза, уровня цАМФ; обеспечении резистентности или восприимчивости организма к ряду заболеваний.
- **Практическое значение.** В клинической лабораторной диагностике типирование аллелей 1 класса HLA имеет важное значение в определении оптимальной гистосовместимости для поиска доноров при аллогенной трансплантации почек и костного мозга.
- Клиническое значение имеет также идентификация В27 у пациентов анкилозирующим спондилитом (болезнь Бехтерева) и ряда других заболеваний из группы коллагенозов, ревматических заболеваний.

Методика определения антигенов системы HLA I класса

По Тerasаки в модификации Ж. Доссе в стандартном двухступенчатом микролимфоцитотоксическом тесте.

- **Принцип метода:** двухэтапное влияние на лимфоциты периферической крови сначала иммунной сывороткой, которая удерживает антитела известной специфичности, а потом комплемента. Если лимфоциты имеют определенный антиген системы HLA, то состоится реакция клеточного лизиса, которая определяется проникновением в клетку красителя.

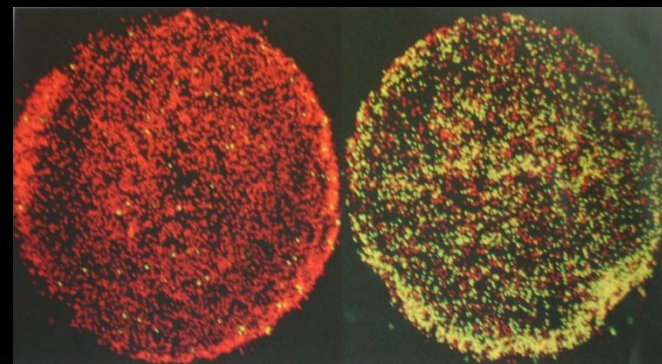
Реактивы:

- 1. гистотипирующая панель HLA- A, B;
- 2. кроличий комплемент (1мл лиофилизированного кроличьего комплемента развести в 1мл дистиллированной воды);
- 3. градиент плотности «градимекс-верографин» ($1,077\text{г/см}^3$)
- 4. раствор Хенкса
- 5. вазелиновое масло;
- 6. формалин 17%
- 7. раствор эозина К 5%.
- 8. раствор гепарина (1лм гепарина (5 тис. единиц) растворить в 14мл физиологического раствора)
- 9. раствор NaCl 10%.



Оборудование:

- 1. микропланшеты;
- 2. микрошприцы;
- 3. весы лабораторные ВЛТ-200;
- 4. центрифуга рефрижераторная РС-6;
- 5. центрифуга ОПН-3;
- 6. камера Горяева;
- 7. микроскоп.



Ход определения

1. Перед использованием разморозить микропланшеты, которые содержат в каждой лунке по 1мкл анти-HLA-сыворотки в течение 10-15 минут.
2. В каждую лунку HLA-A, B планшеты добавить 1мкл суспензии лимфоцитов.
3. Инкубировать при комнатной температуре (20°) в течении 30 минут.
4. Добавить 5 мкл кроличьего комплемента.
5. Инкубировать при комнатной температуре (20°) в течение 60 минут.
6. Добавить 3 мкл 5% раствора эозина, через 5 мин. 5 мкл формальдегида (37%) для фиксации.
7. Учет реакции проводить не раньше, чем через 30 минут.




- ***В настоящее время для типирования HLA используются следующие методы ПЦР:***

1. ПЦР с мечеными, специфичными по своей последовательности олигонуклеотидами (ПЦР-СПО);


2. ПЦР со специфическими по своей последовательности праймерами (ПЦР-СПП), которые занимают главное место в лабораторной диагностике гистотипирования для алогенной трансплантации почек и костного мозга.

ПЦР с мечеными, специфичными по своей последовательности олигонуклеотидами (ПЦР-СПО)

- Вначале в ПЦР-СПО амплифицируют районы матричной ДНК отдельных генов HLA региона. Продукты амплификации фиксируют на нейлоновой мембране и гибридизируют со специфичными по своей последовательности, химически или радиоактивно мечеными, олигонуклеотидами. Определение конкретного аллеля основано на том, что при достаточном выборе олигонуклеотидов, положительная гибридизация имеет место в том случае, когда определенный олигонуклеотид комплементарен соответствующей последовательности на амплифицированных продуктах матричной ДНК.




При наличии достаточного количества специфических праймеров и олигонуклеотидов метод СПО позволяет идентифицировать все известные аллели локуса. Для всех импринтированных генных локусов II класса существуют хорошо отработанные протоколы СПО, даже с высокой распределительной способностью.




ПЦР со специфичными по своей последовательности праймерами (ПЦР-СПП)

- Принцип ПЦР-СПП (аллельспецифичная амплификация) состоит в том, что амплификация специфичного продукта в ПЦР осуществляется только в том случае, когда 3' - конец праймера комплементарен к целевой последовательности матричной ДНК. Одно единственное различие между последовательностями нуклеотидов матричной ДНК и соответствующего праймера мешает амплификации в ПЦР, что обуславливает высокую специфичность метода СПП в идентификации аллелей. Для контроля амплификации к каждой пробе добавляется еще одна пара праймеров. Она обеспечивает создание продукта ПЦР при любых условиях амплификации, независимо от типа HLA.



В отличие от метода СПО (от 1 до 3 суток), идентификация отдельных аллелей осуществляется на основе амплификации (гибридизация не нужна). Разделение отдельных аллелей или их групп осуществляется на основе амплификации при электрофорезе в агарозном геле, где продукты ПЦР разделяют по их длине и визуализируют в ультрафиолетовом излучении (1-2 часа).



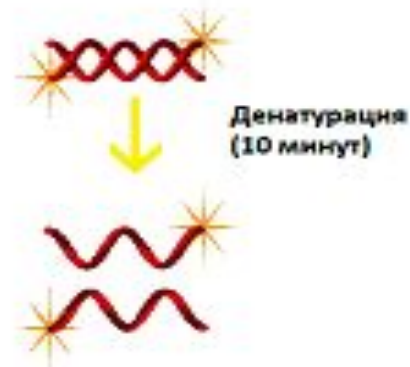
Основные этапы мультиплексного HLA-генотипирования

Процедура генотипирования LABType SSO

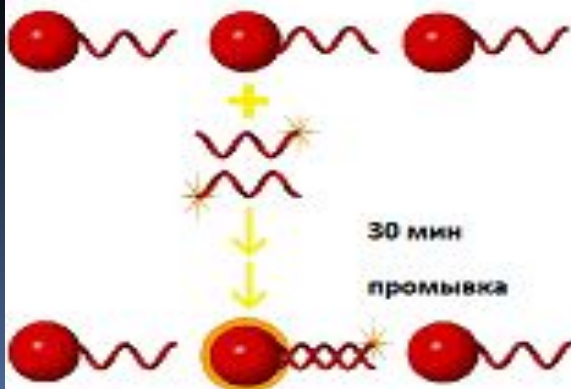
1. Амплификация



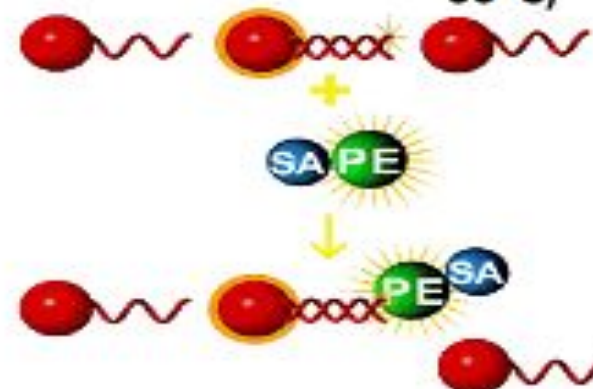
2. Денатурация/нейтрализация



3. Гибридизация (15 мин при 60°C)





4. Мечение (5 мин при 60°C)





5. Считывание результатов



- 
- **Высокий полиморфизм делает систему HLA великолепным маркером в популяционно-генетических исследованиях и изучении генетической предрасположенности к заболеваниям.**
- 

Популяционные исследования, проведенные во многих странах мира, выявили характерные различия в распределении HLA-антигенов в разных популяциях. Особенности распределения HLA-антигенов используются в генетических исследованиях для изучения структуры, происхождения и эволюции различных популяций. Например, грузинская популяция относится к южным европеоидам, имеет сходные черты HLA-генетического профиля с греческой, болгарской, испанской популяциями, указывающими на общность их происхождения. Эти особенности учитываются при изучении связи HLA с заболеваниями.



В популяциях, различающихся по HLA-генетическому профилю, могут выявляться разные HLA-маркеры одной и той же болезни.

Частота HLA-антигенов у здоровых лиц г. Харькова (n=1330)

HLA-антиген	Частота		HLA-антиген	Частота	
	антигена, %	гена		антигена, %	гена
A1	21,7	0,115	B12	16,5	0,086
A2	51,1	0,391	B15	9,0	0,046
A3	23,2	0,124	B16	13,2	0,068
A9	21,1	0,112	B27	13,2	0,068
A10	23,9	0,128	B35	16,2	0,084
A24	0,5	0,002	B38	2,6	0,013
A25	4,5	0,023	B40	7,9	0,040
A26	0,8	0,004	Cw1	3,9	0,019
A28	9,6	0,049	Cw2	13,5	0,070
B5	14,8	0,077	Cw3	11,1	0,057
B7	19,8	0,104	Cw4	20,7	0,109
B8	10,8	0,852	Cw5	2,9	0,015

Генетическое расстояние HLA-антигенов между харьковской и другими популяциями

Популяции	Генетическое расстояние
Киевская	0,0152***
Московская	0,0139***
Санкт-Петербургская	0,0196***
Европейская	0,0287***

НЕКОТОРЫЕ HLA-АССОЦИИРОВАННЫЕ

<i>Заболевание</i>	<i>Больные, %</i>	<i>Здоровые, %</i>	<i>Относительный риск</i>
Нарколепсия			
<i>DR2 (K)</i>	<i>100</i>	<i>22</i>	<i>129,8</i>
<i>DR2 (M)</i>	<i>100</i>	<i>34</i>	<i>358,1</i>
Анкилозирующий спондилит			
<i>B27 (K)</i>	<i>89</i>	<i>9</i>	<i>69,1</i>
<i>B27 (M)</i>	<i>85</i>	<i>15</i>	<i>207,9</i>
<i>B27 (H)</i>	<i>58</i>	<i>4</i>	<i>54,4</i>
Ревматоидный артрит			
<i>B27 (K)</i>	<i>16</i>	<i>9</i>	<i>2,0</i>
<i>DR4 (K)</i>	<i>68</i>	<i>25</i>	<i>3,8</i>
Ювенильный ревматоидный артрит			
<i>B27 (K)</i>	<i>25</i>	<i>9</i>	<i>3,9</i>
<i>DR5 (K)</i>	<i>34</i>	<i>15</i>	<i>3,3</i>

НЕКОТОРЫЕ НЛА-АССОЦИИРОВАННЫЕ

Заболевание	Больные, %	Здоровые, %	Относительный риск
Болезнь Рейтера B27 (K)	80	9	37,1
СД 1 типа B8 (K)	40	21	2,5
B15 (K)-(H)	22	14	2,1-2,2
DR3 (K)	46	22	3,3
DR4 (K)-(H)	51	25	3,6-6,7
Системна красная волчанка	40	20	2,7
B8 (K)	42	21	2,6
DR3 (K)			
Рассеянный склероз			
B7 (K)	37	24	1,8
DR2 (K)	51	27	2,7
ЗПР			
A28	23,4	11,7	2,3
B40	22,3	8,9	3,0
B51	11,4	0,6	21,3
DR1	42,2	11,1	3,3