



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET

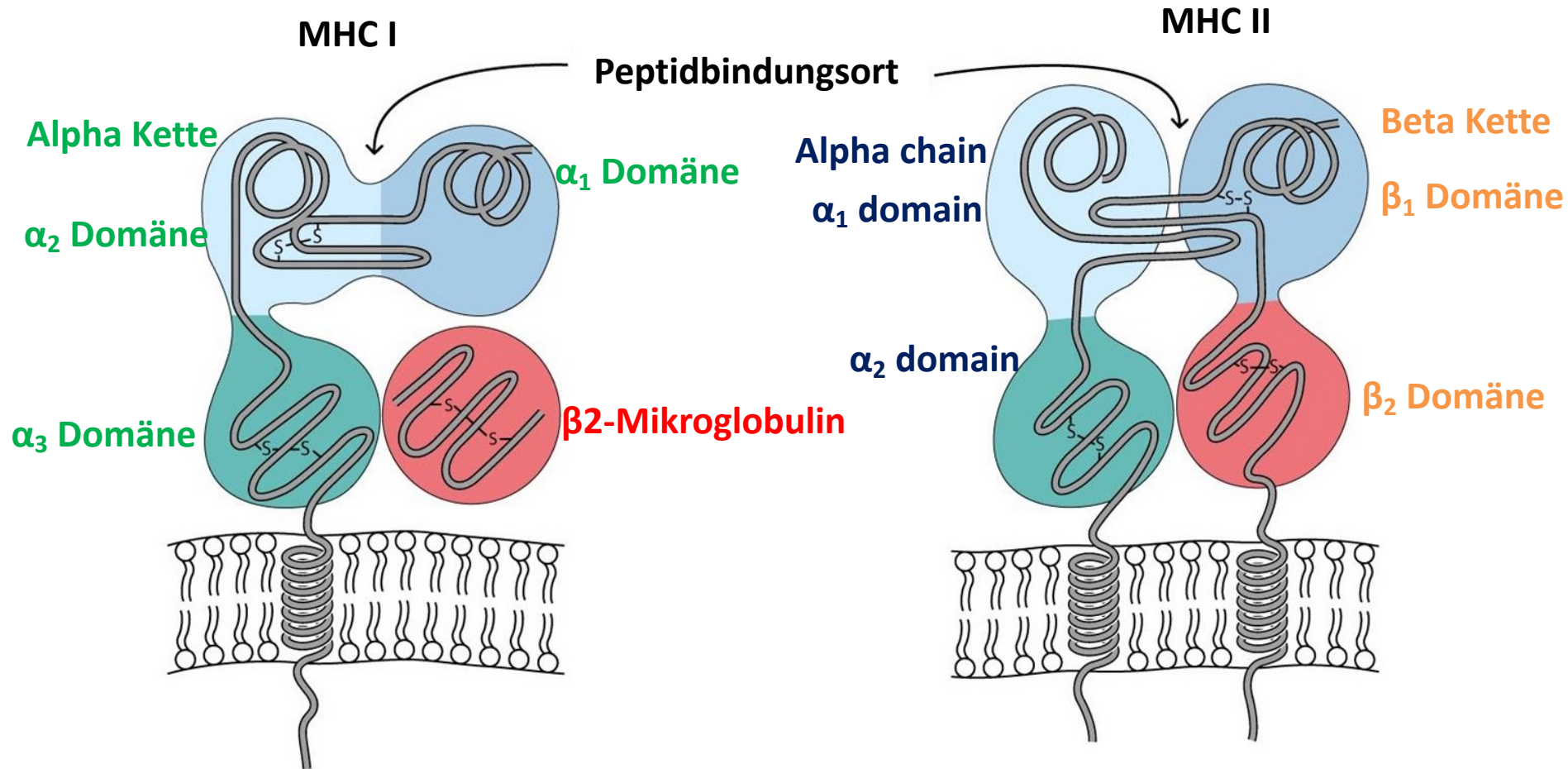


14. Praktikum: HLA Typisierung, Immunologischen Aspekte der Organtransplantation

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2023.

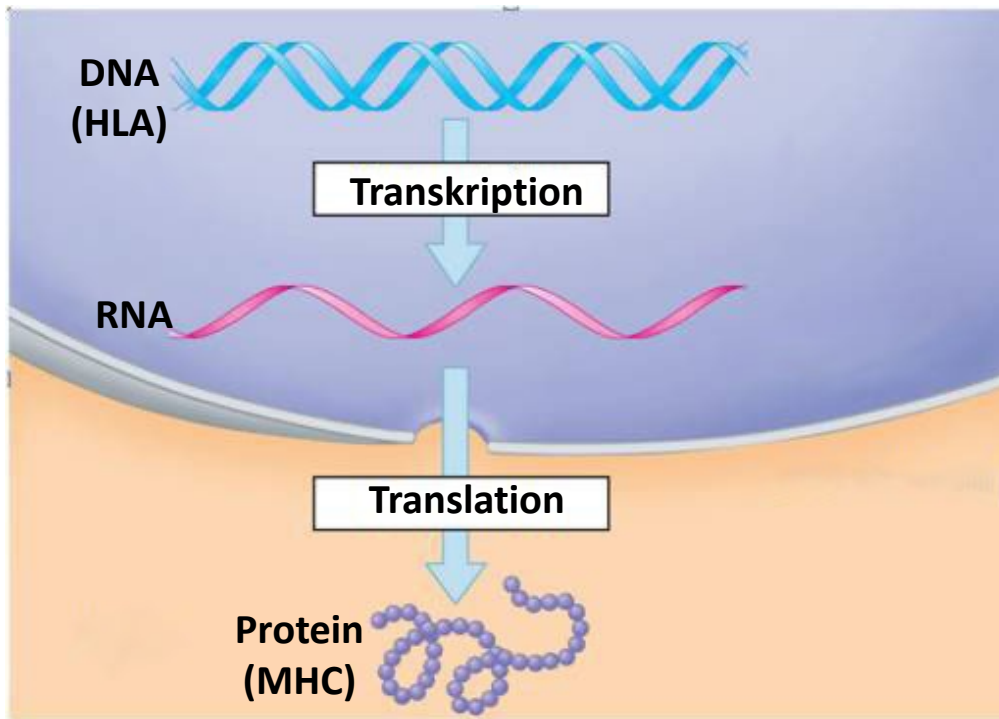
Grundlagen der HLA Typisierung I.



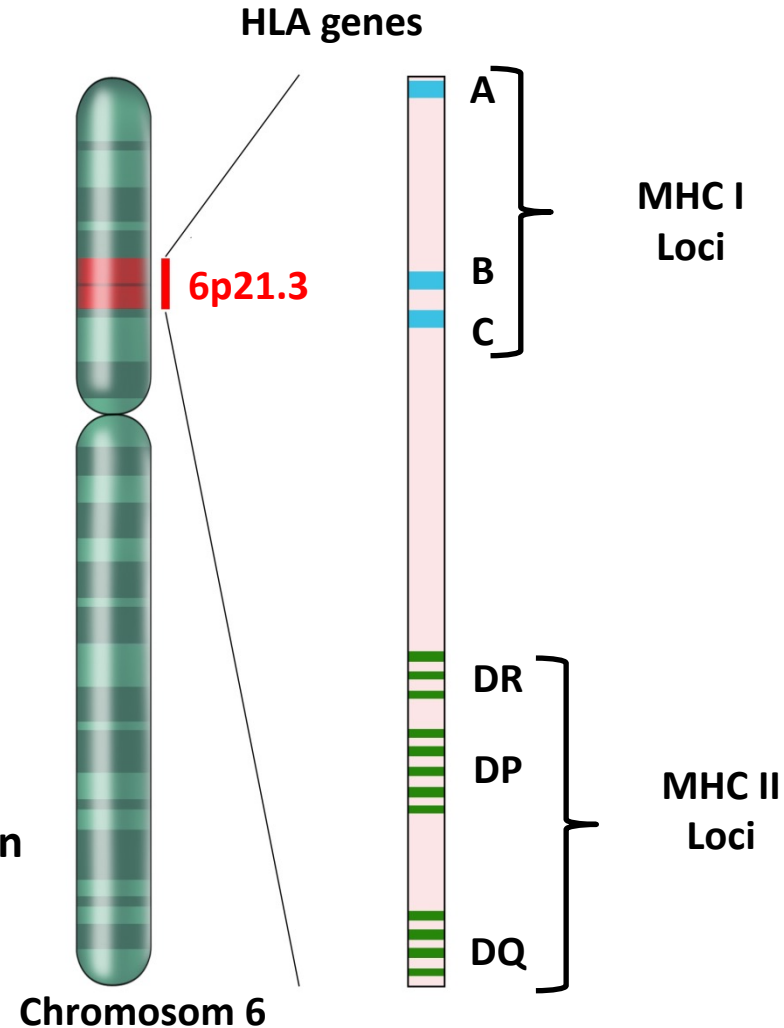
**Auf allen kernhaltigen Zellen und
Thrombozyten!**

**Auf Antigenpräsentierenden Zellen!
(z.B. Makrophagen, Dendritische Zellen,
B Zellen)**

Grundlagen der HLA Typisierung II.



HLA (Humanes Leukozyten Antigen) → Kodierendes **Gen**
MHC (Major Histokompatibilitäts Komplex) → **Protein**



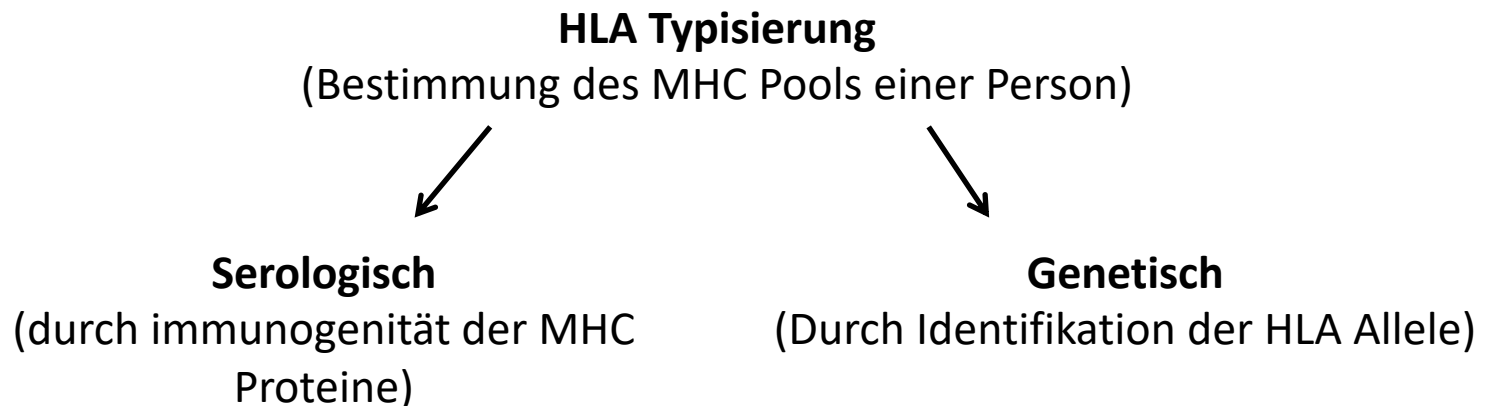
Im Menschen werden HLA-A, B, C, DQ, DR, und DP sowohl von väterlichen und mütterlichen Kromosomen gleichzeitig exprimiert → **Viele MHC Typen auf den Zellen.**

Erblichkeit der HLAs

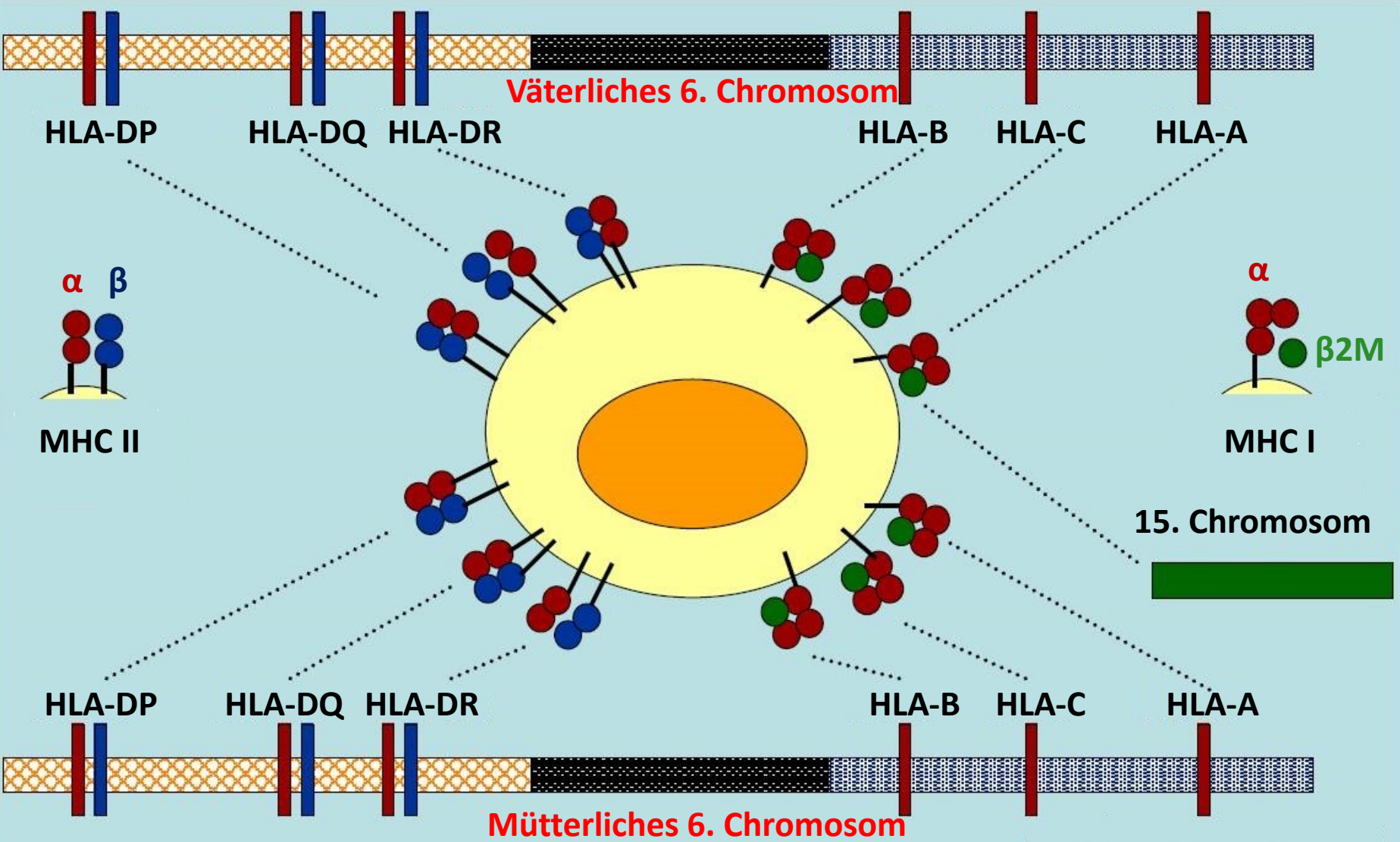
- **Polygen:** Mehrere Gene kodieren MHC I und MHC II Moleküle. (z.B. HLA-A, B und C Typ I MHCs und DP, DQ und DR Typ II MHCs)
- **Polymorph:** Es gibt viele verschiedene Allele für jedes Gen in der Bevölkerung, deswegen ist es sehr variabel.
- **Kodominant:** Beide (mütterliche und väterliche) Allele werden gleichzeitig exprimiert.



Jeder Mensch hat einen Charakteristischen **MHC Pool** mit verschiedenen Peptidbindenden Fähigkeiten.

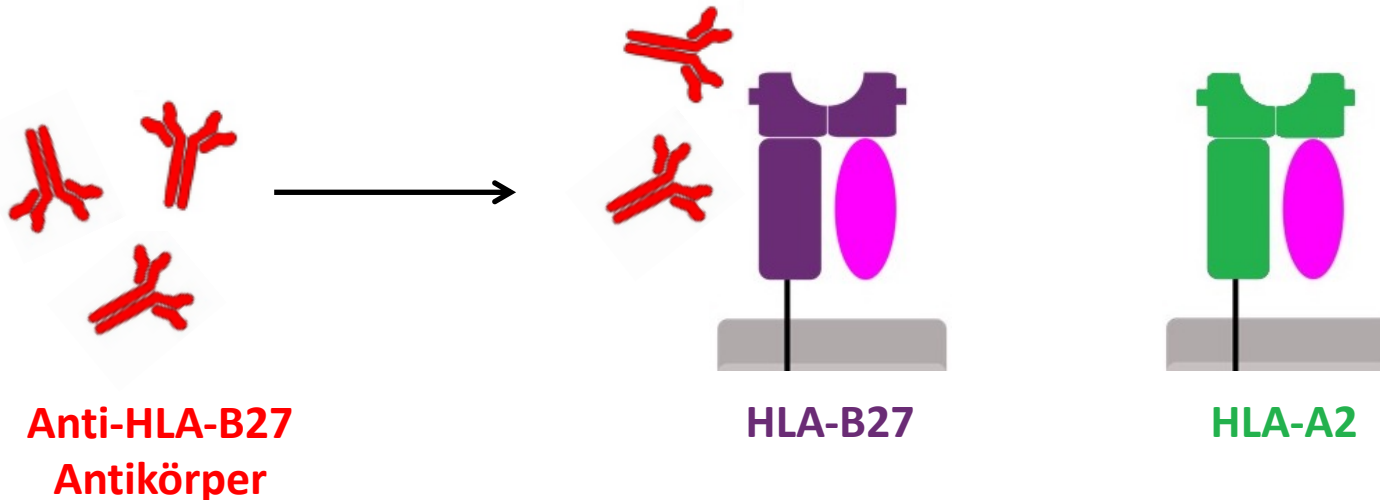


Kodominante Expression



HLA Serotyp vs Genotyp

- HLA **Serotyp**: MHC Moleküle werden anhand ihrerer Antigenität unterschieden. Z.B.:



- HLA **Genotyp**: MHC Moleküle werden durch die Identifizierung **kodierenden HLA Allele** unterschieden. Ein anderer Genotyp bedeutet nicht zwangsläufig einen anderen Serotyp, **es gibt mehr Allele als HLA Serotypen**. (6959 HLA Allele waren 2010 bekannt, aber es werden jedes Jahr mehr. → Polymorphismus)

HLA Nomenklatur

2. Locus (A1 = kodiert alpha Kette, B1= kodiert beta Kette)

HLA-DQA1:05:01

3. Zu welcher serologischen Gruppe gehört die Kette?
(05 = Allele resultieren in einer α^5 Kette)

1. Welcher MHC Typ wird kodiert?

z.B.: A, B, C, DQ, DR, DP

4. Das spezifische Allel der Gruppe

- MHC I hat nur **1 Kette**, z.B.: HLA-B*27:01 → B Typ MHC I der serologischen Gruppe 27
- MHC II ist ein **Heterodimer** mit 2 Ketten. Beispiel:

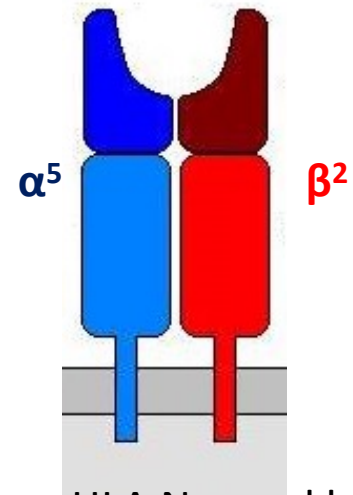
Im Fall der DQ Typ MHCs wird die Antigenität durch die Beta Kette bestimmt, DQ2 ist ein DQ Typ MHC II mit einer β^2 Kette, deswegen:

Benötigt HLA-DQB1*02 Allelgruppe

Mehrere Subtypen existieren abhängig von der alpha Kette, z.B.:

HLA-DQA1*05:01 + HLA-DQB1*02:01 = HLA-DQ2.5

HLA-DQA1*02:01 + HLA-DQB1*02:02 = HLA-DQ2.2



Wichtig! Die Folie dient nur der Illustration, wir stellen keine Fragen zur HLA Nomenklatur.

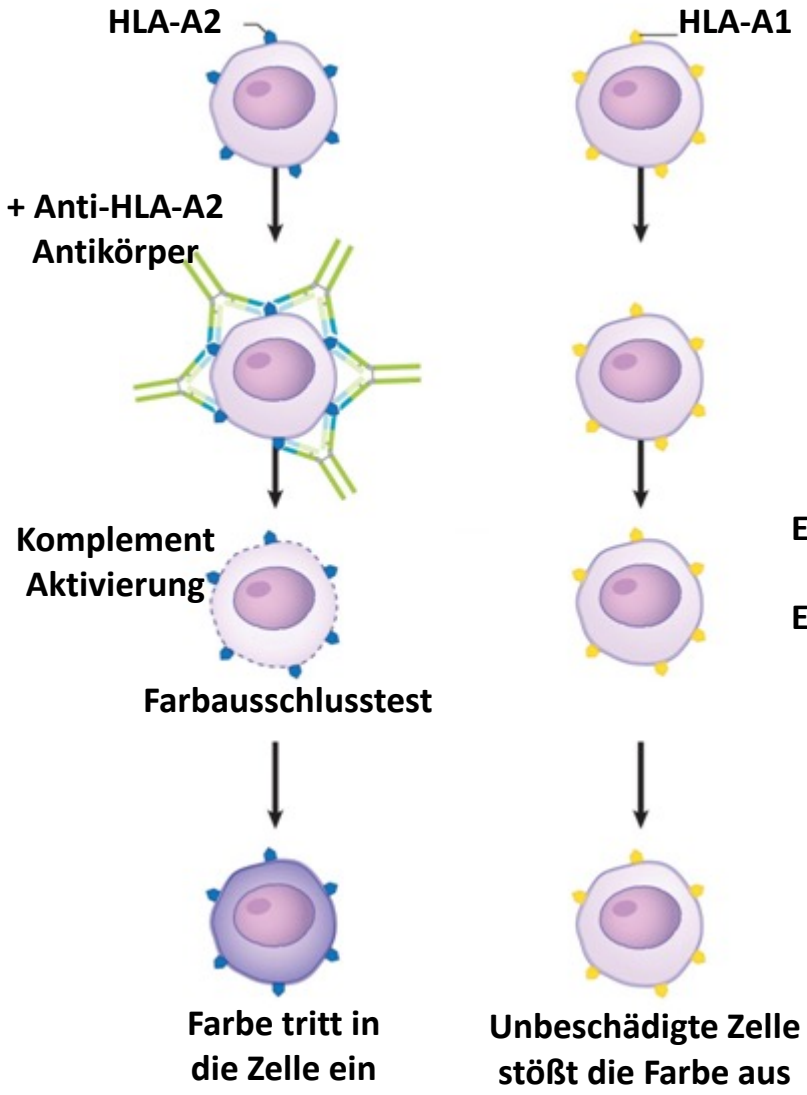
Methoden der HLA Typisierung

- **Serologische Methoden:**
 - Mikrozytotoxizitäts Assay (MCA)
 - Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)
- **Molekular biologische Methoden:** (→ siehe molekulare Zellbiologie)
 - Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (RFLP)
 - Sequenzspezifische Oligonukleotid Sonden (SSOP) → DNA Hybridisierung
 - **Sequenzspezifische Primer → SSP-PCR**
 - DNA-Sequenzierung

Die **Molekularbiologischen Methoden** werden bevorzugt da sie ... sind:

- **Spezifischer** (klar definierte Sonden werden genutzt)
- **Flexibler** (Neue oligonukleotid Sonden oder Primer können entwickelt werden sobald ein neues Allel beschrieben wird)
- **Zuverlässiger** (Brauchen keinen spezifischen Zelltyp und sind weniger abhängig vom Zustand des Patienten)

Mikrozytotoxizitäts Assay (MCA)



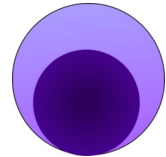
Wird genutzt um **Immunologische Inkompatibilität** des Spenders und des Empfängers vor Transplantationen auszuschließen. Z.B.:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Spender	●	○	○	○	○	○	●	○	○
Empfänger 1	●	○	○	○	○	○	●	○	○
Empfänger 2	○	●	●	○	○	○	○	○	○

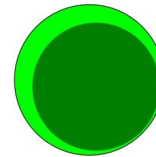
Der Spender und Empfänger 1 passen auf basis des serologischen Tests zueinander.

Gemischte Lymphozytenkultur (Erinnerung)

Lymphozyten
des Empfängers

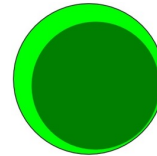
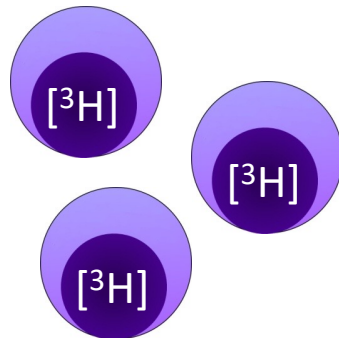


Lymphozyten
des Spenders



Inaktivierung (mit
Strahlung oder
Mitomycin C)

+ [³H]-thymidine



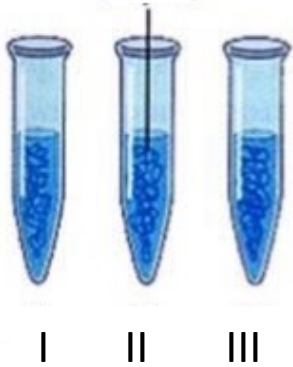
Im Fall der HLA Inkompatibilität (später) erkennen die getesteten Lymphozyten die inaktivierten Zellen als fremd, aktivieren sich und **proliferieren**. Die proliferierenden Zellen **bauen das markierte Thymidin in ihre DNA ein**.

Anwendung:

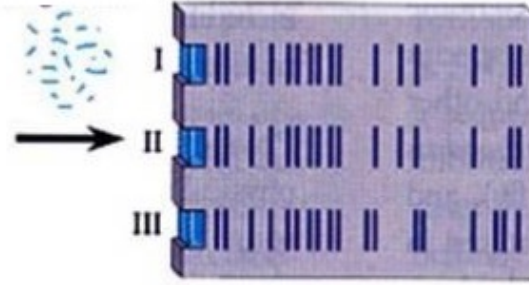
Um **immunologische Inkompatibilität** des Spenders und Empfängers vor Transplantationen zu überprüfen.

RFLP

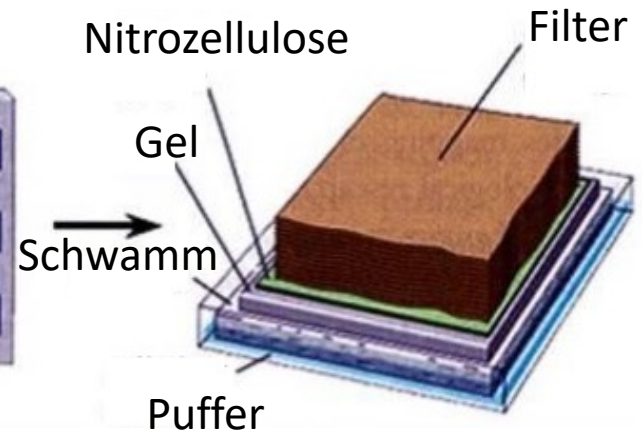
DNA + Restriktions
Endonuklease



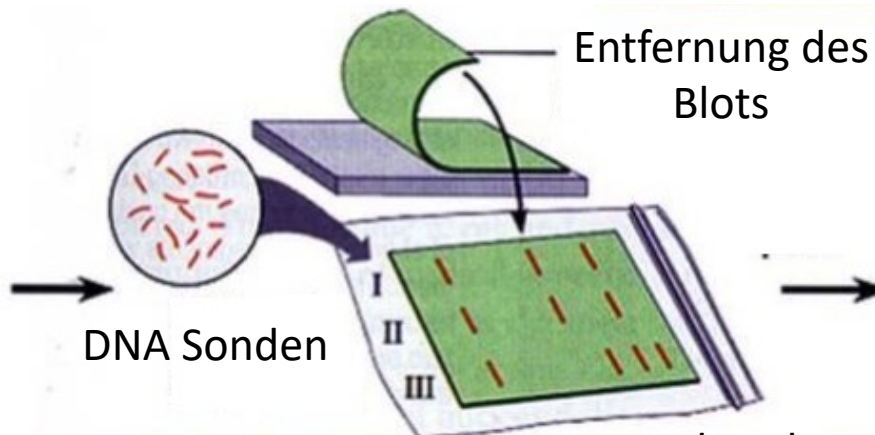
Elektrophorese



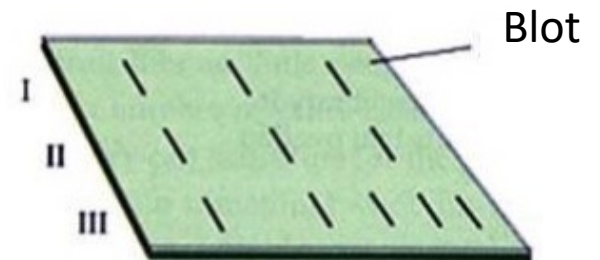
Blotting



Hybridisierung

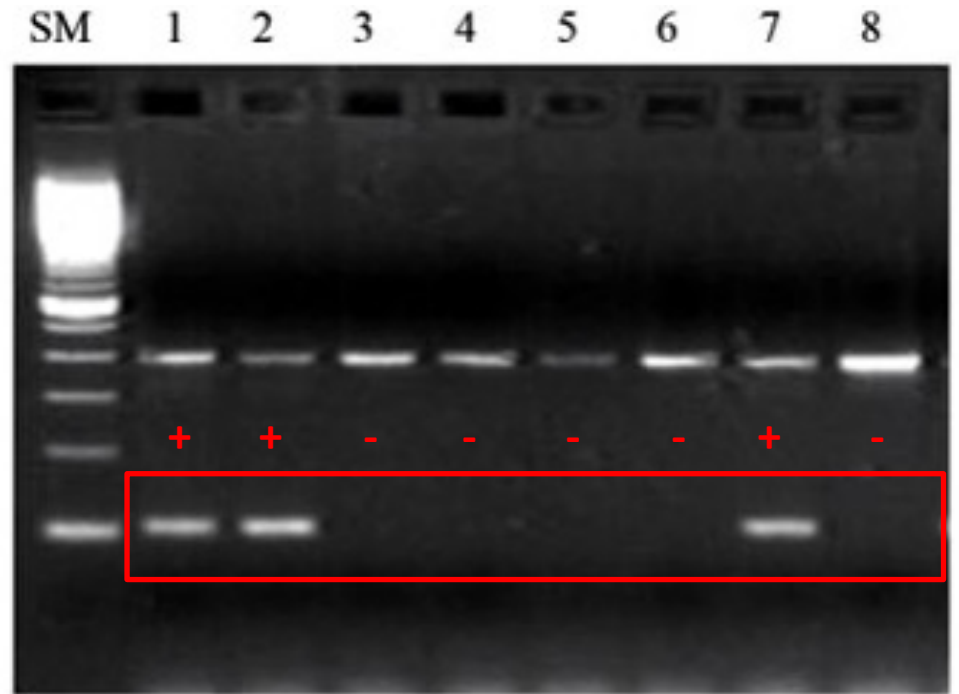
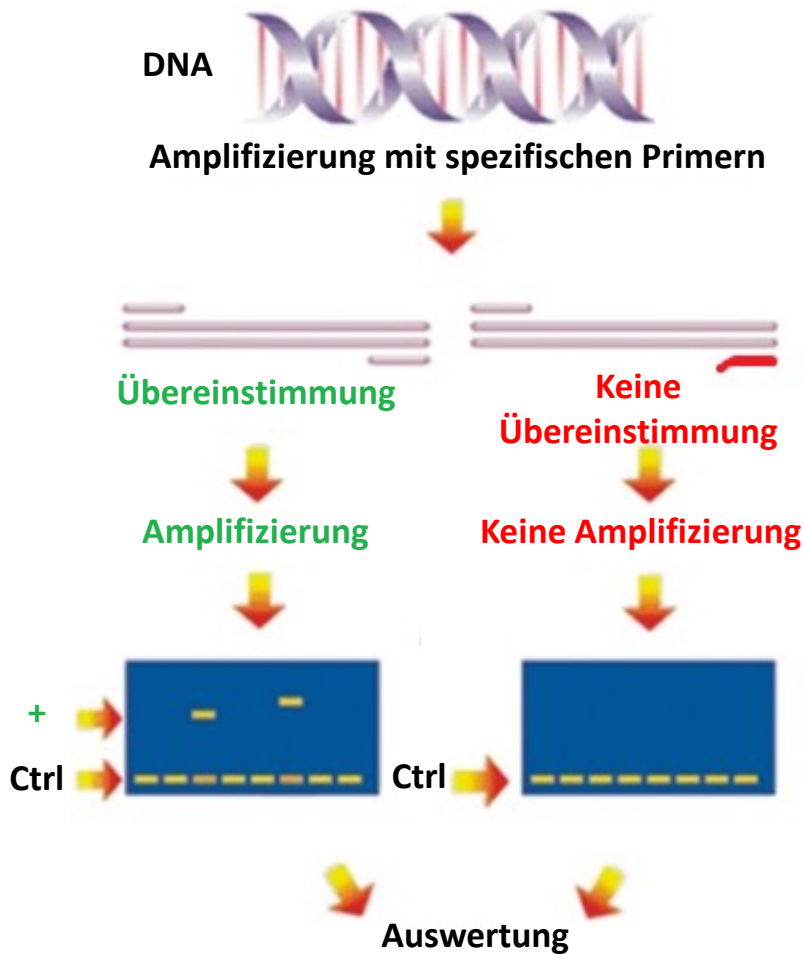


Nachweis



Ungebundene Sonden werden durch waschen entfernt

PCR mit Sequenzspezifischen Primern



HLA-A*01 Genotypisierung: Die sichtbaren Banden in Proben 1, 2 und 7 markieren HLA-A*01 Allele.

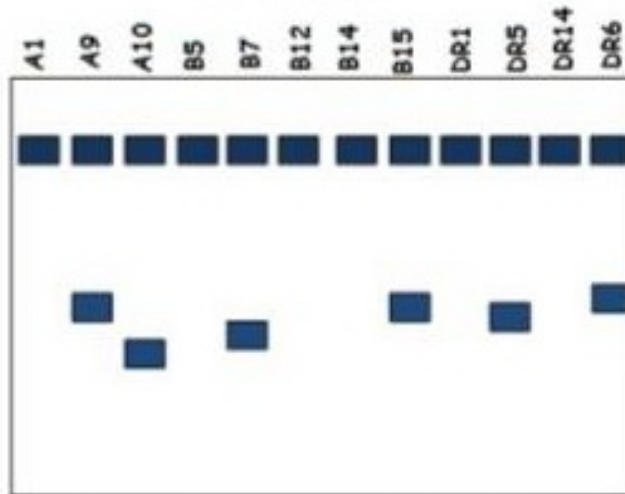
Klinische Signifikanz der HLA Typisierung

- Prüfen der immunologischen Kompatibilität des Spenders und Empfängers vor **Transplantationen** um Abstoßungsreaktionen zu verhindern.
- Weitere diagnostische Bestätigung einiger **autoimmuner Krankheiten** da bestimmte HLA Typen häufiger bei Autoimmunen Störungen zu finden sind z.B.:
 - **HLA-B27**: Morbus Bechterew, Entzündliche Darmkrankheiten (IBD), Psoriasis
 - HLA-DR1: Rheumatoide Arthritis, Colitis Ulzerosa
 - HLA-DR3: Typ I Diabetes Mellitus, Myasthenia gravis, Hashimoto Thyroiditis
 - HLA-DR4: Rheumatoide Arthritis, SLE
 - **HLA-DQ2**: Zöliakie, Typ I Diabetes Mellitus
 - **HLA-DQ8**: Zöliakie, Typ I Diabetes Mellitus

HLA Übereinstimmung vor einer Nierentransplantation

Das Überleben des Grafts ist vor allem vom Grad der Übereinstimmung von **HLA-A**, **HLA-B** und **HLA-DR** Allelen abhängig, diese warden vor Transplantationen untersucht.

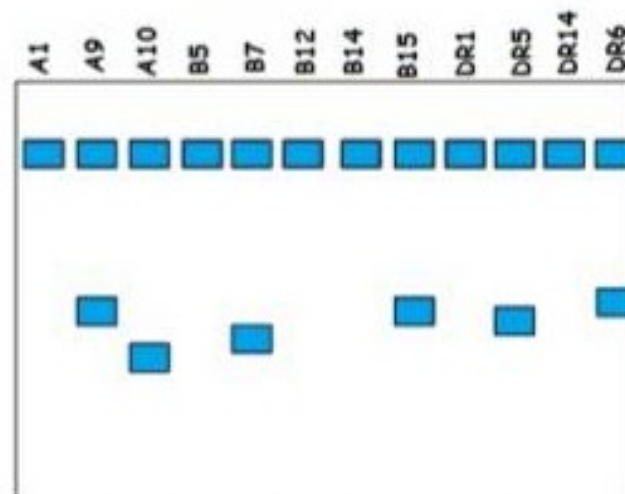
Empfänger



HLA Genotyp:

- A9, A10
- B7, B15
- DR5, DR6

Spender



HLA Genotyp:

- A9, A10
- B7, B15
- DR5, DR6

12/12 Übereinstimmungen ✓

Transplantation – Grundlagen

Empfänger- Rezipient (Host); Spender- Donor

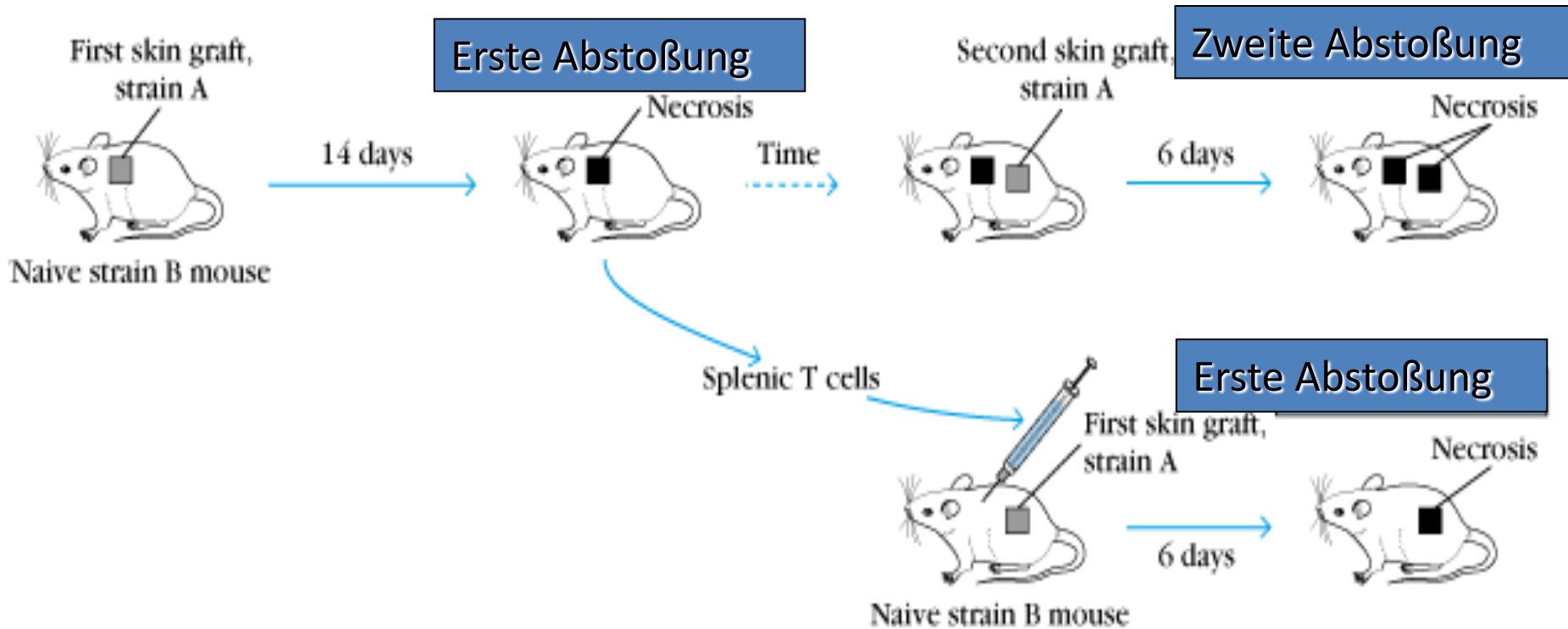
Graft = das transplantierte Organ / Gewebe

- **autolog** (selbst), **syngen** (genetisch identisch, z.B. Zwillinge, inzüchtete Mäuse);
- **allogen** (verschiedene Individuen einer Spezies),
- **xenogen** (verschiedene Spezies)

Auto-, Allo-, Xeno-Transplantation

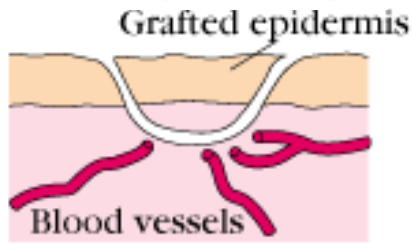
- Gewebetransplantationen: Cornea; Blut; Knochenmark; Haut
- Organtransplantationen: Lunge; Herz; Niere usw.

Allograft Abstoßung

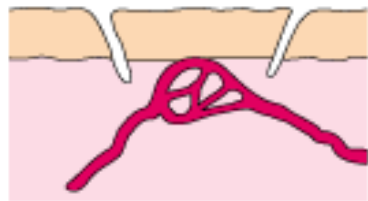


Transplantatakteptierung und -abstoßung

(a) Akzeptierung



Days 3-7: Revaskularisation



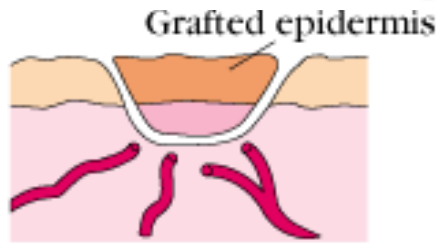
Days 7-10: Heilung



Days 12-14 Resolution



(b) Erste Abstoßung



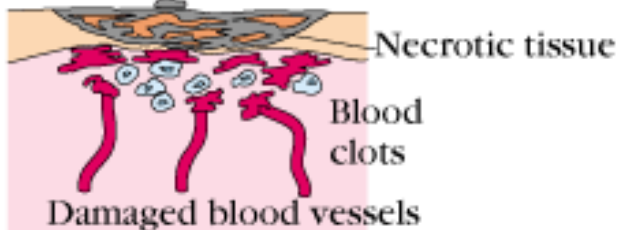
Days 3-7: Revaskularisation



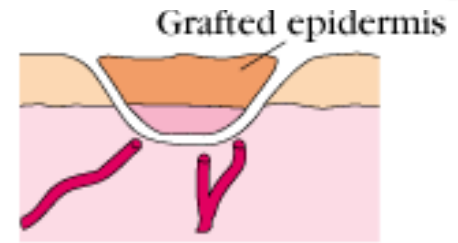
Days 7-10: Zelluläre Infiltration



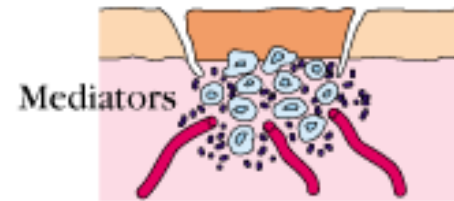
Days 10-14: Thrombosis and necrosis



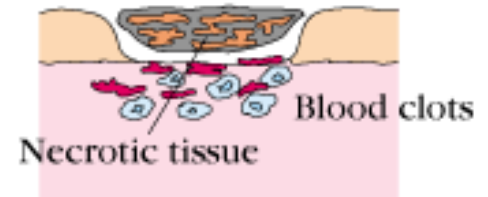
(c) Zweite Abstoßung



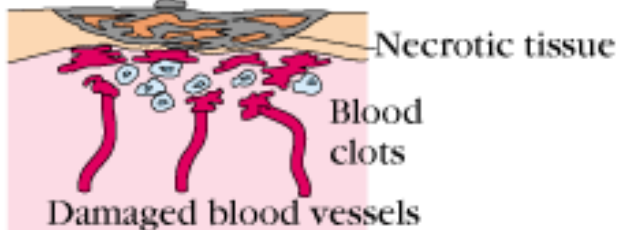
Days 3-4 Zelluläre Infiltration



Days 5-6: Thrombosis and necrosis



Days 10-14: Thrombosis and necrosis



Abstoßung: Host versus graft Reaktion

- hyperakute Abstoßung - verursacht von präformierten Antikörpern (sensibilisiertes Individuum) (innerhalb von 24 Stunden)
- akute Abstoßung - vermittelt von T-Zelle, ADCC und DTH (5 bis 90 Tagen)
- kronische Abstoßung – langfristige Endothelbeschädigung und Komplementaktivierung (Monate oder Jahre später)

Transplantat gegen den Wirt Reaktion (Graft Versus Host Disease=GVHD)

GVHD ist möglich nur bei Knochenmarktransplantation.

- **akute GVHD (akute Gewebenekrose von Zielorganen)**
- **chronische GVHD (autoimmunes Phänomenon)**

Graft versus Host 1. (GVHD)

- Kann sich nach allogener **hämatopoetische Stammzellen Transplantation** (HSCT) bilden.
- Die Spender-Immunzellen greifen die Wirtsgewebe an und beschädigen sie.
- Hauptrisikofaktoren: **HLA nicht übereinstimmung** zwischen Spender und Empfänger.
- Therapie: Steroide (Immunsuppression), Letalität ist ca. 15%, aber Steroidresistenter akuter GVHD hat eine Letalität von 90%.

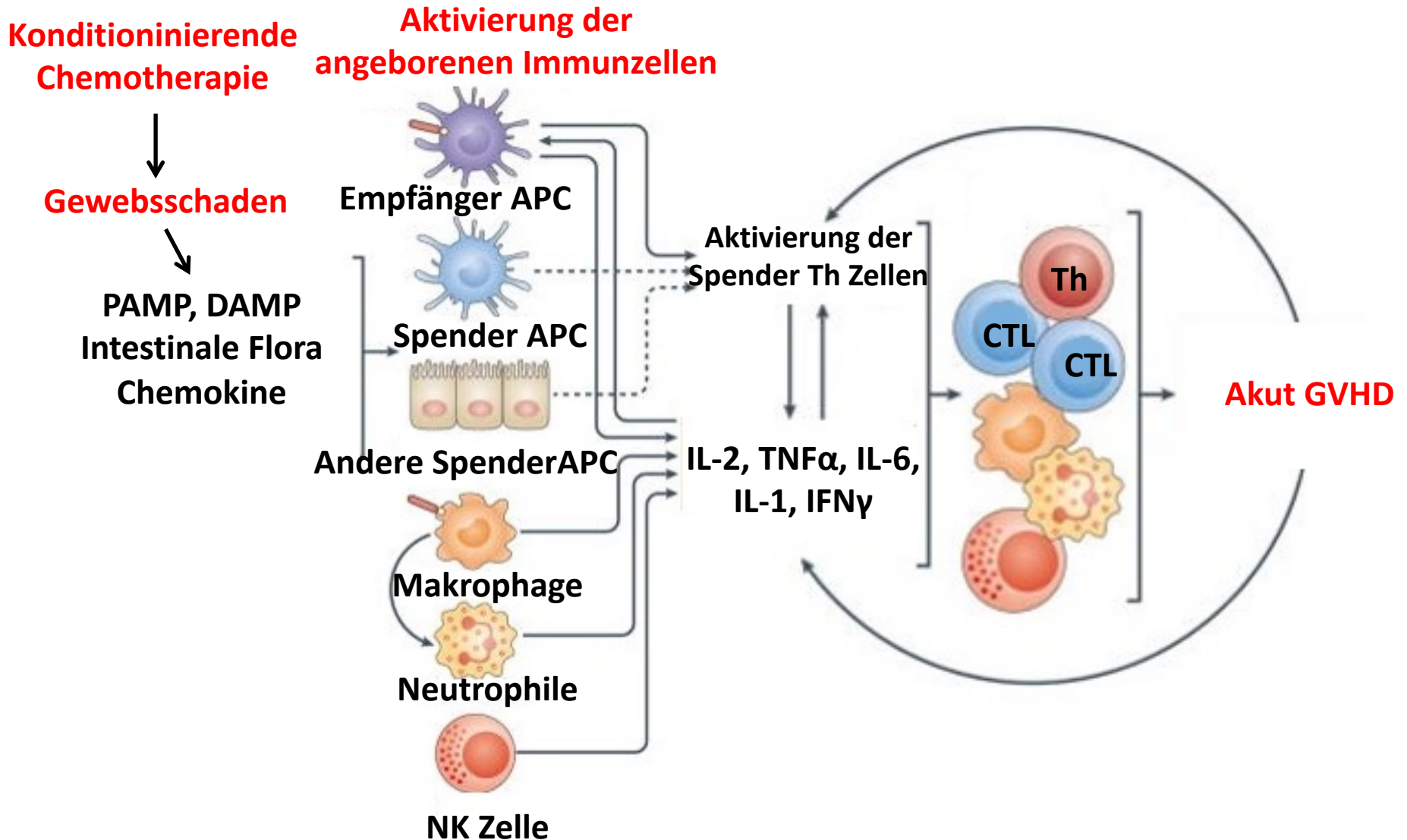


Schwere Haut GVHD



Akute Intestinale GVHD
(endoskopisches Bild)

Graft versus Host 2. (GVHD)

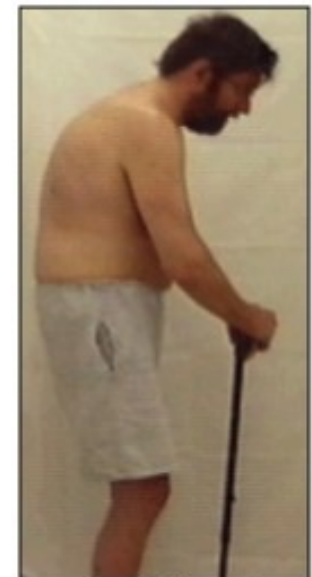
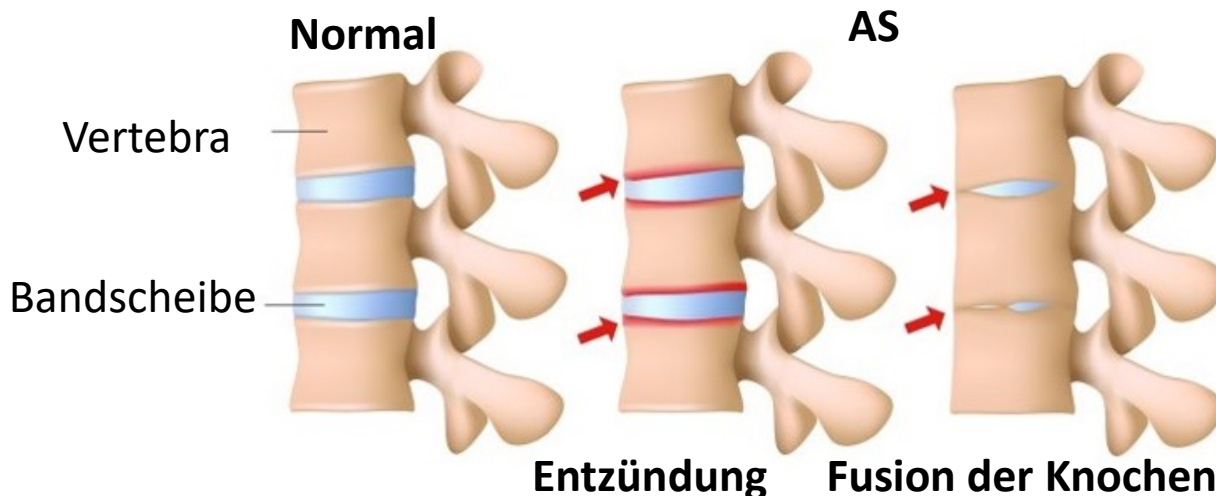


Immunsuppressiva

- **Cyclosporin A; Tacrolimus; Sirolimus**
- **Glukokortikoid-Hormone**
- **monoklonale Antikörper**

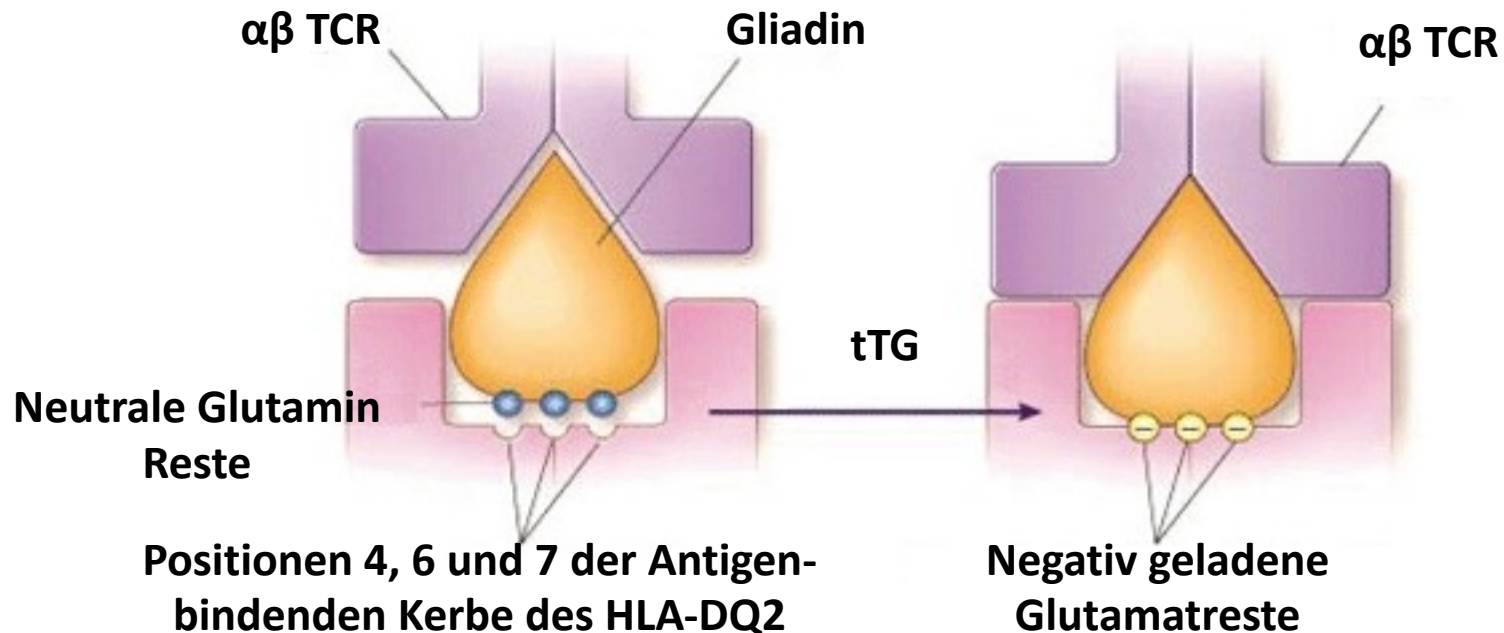
HLA und Krankheitsassoziationen 1.

- **Morbus Bechterew** (Ankylosierende Spondylitis, AS): **HLA-B27**
 - Ca. **90%** der AS Patienten sind HLA-B27 positiv.
 - Prävalenz von HLA-B27 in der Kaukasischen Population ist 8%, in Skandinavien erreicht es 24%.
 - Ca. 1,8% der HLA-B27 positiven Individuen entwickeln manifeste AS.
- HLA-B27 positivität **erhöht nur das Risiko der Krankheit**, es ist **allein nicht genug** um die Krankheit zu entwickeln! (Das gilt für alle HLA Assoziationen.)



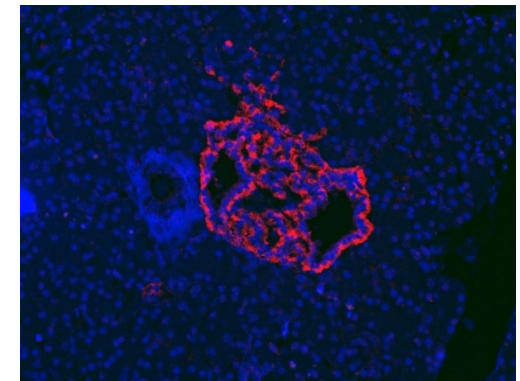
HLA und Krankheitsassoziationen 2.

- **Zöliakie** (Gluten-sensitive Enteropathie): **HLA-DQ2** und **HLA-DQ8**
- Mindestens eins von beiden Allelen ist in **98%** der Patienten. (Stärkste bekannte HLA Assoziation und am besten verstandene Rolle in der Pathogenese)
- Prävalenz von HLA-DQ2 in der Kaukasischen Population ist 30%, aber Prävalenz der Krankheit ist nur 1%. → Positivität reicht nicht um die Krankheit zu entwickeln.
- Diese zeigen eine **höhere Affinität für Gliadin** als andere MHC Typen, besonders wenn sie deaminierte Formen binden.



HLA und Krankheitsassoziationen 3.

- **Typ I Diabetes Mellitus (IDDM): HLA-DR3, HLA-DR4**
- HLA-DR3-DQ2 → 3X Risiko
- HLA-DR4-DQ8 → 10X Risiko
- **HLA-DR3-DR4 heterozygotes → 25X risk**
- HLA-DQ6.2 → 0,1X Risiko (protektiv)



Direkt IF: Humane Langerhans Insel (Patient mit IDDM)

Grün: Insulin (fehlt)

Rod: Glukagon

Blau: Zellkerne

Quellen (keine bestimmte Reihenfolge)

- 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.

Quellen

- 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.