

εφαρμογή της τεχνολογίας NGS στην HLA τυποποίηση



Αικ. Τάραση

Διευθύντρια

Τμ. Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας

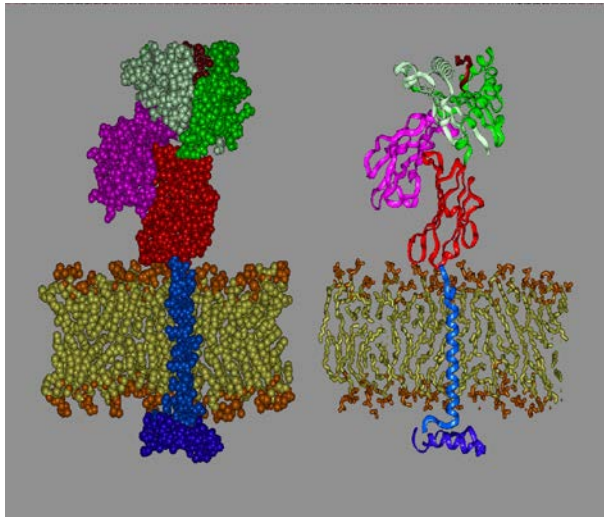
ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»



Δεν υπάρχει σύγκρουση συμφερόντων
με τις παρακάτω χορηγούς εταιρείες:

PFIZER, JANSSEN ONCOLOGY, SOFMEDICA,
NOVARTIS, ABBVIE, MSD, WINMEDICA,
GENESIS, ROCHE, TAKEDA, ASTELLAS,
AMGEN, ANGELINI, ANTISEL, SERVIER,
BRISTOL-MYERS SQUIBB, ABBOTT, GILEAD,
SANDOZ, BIANEΞ, RONTIS, MAVROGENIS,
AENORASIS, SPECIFAR, KARYO

HLA αντιγόνα



- γλυκοπρωτεΐνες
της κυτταρικής μεμβράνης
- διακρίνονται

- τάξης I

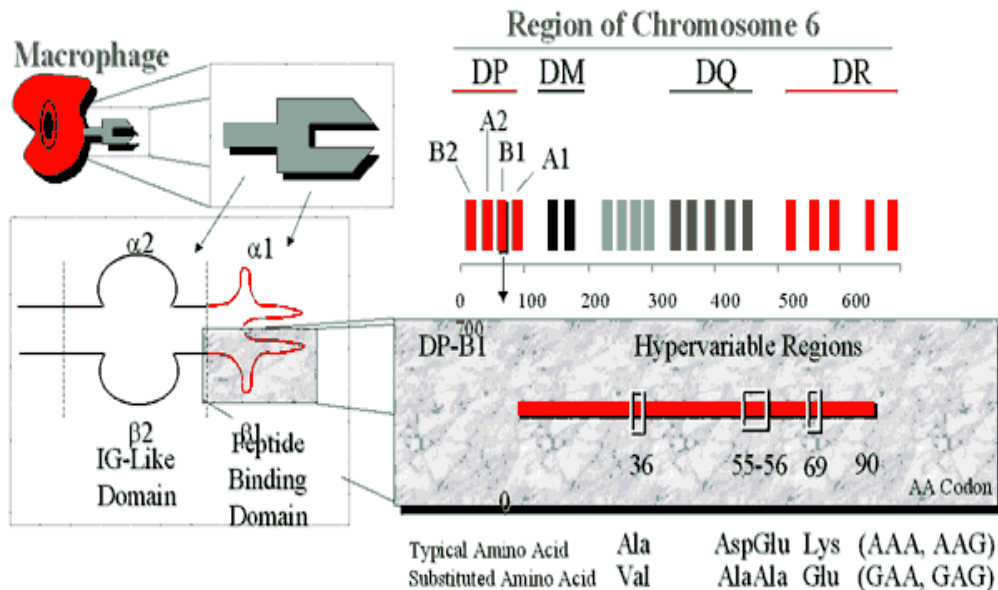
HLA-A, -B, -Cw

- τάξης II

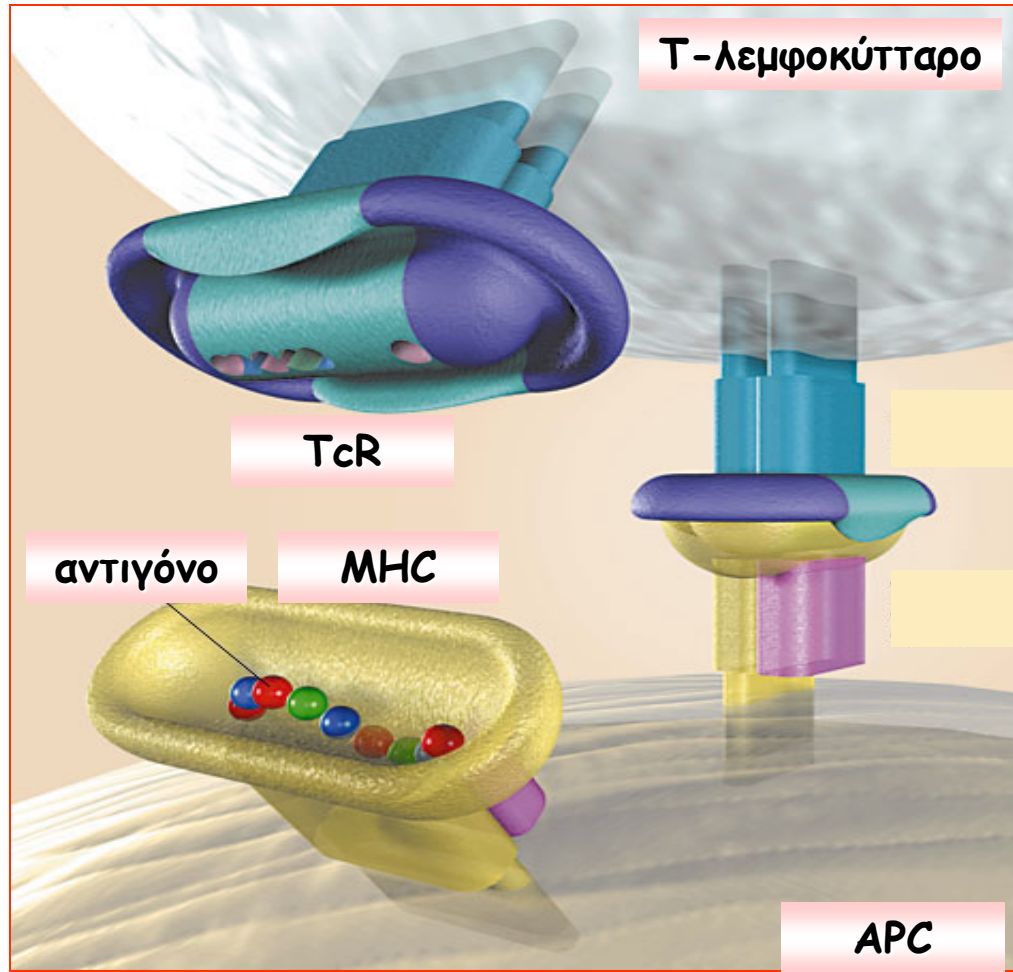
HLA-DR, -DQ, -DP

- κωδικοποιούνται

από γονίδια εντός της
MHC περιοχής

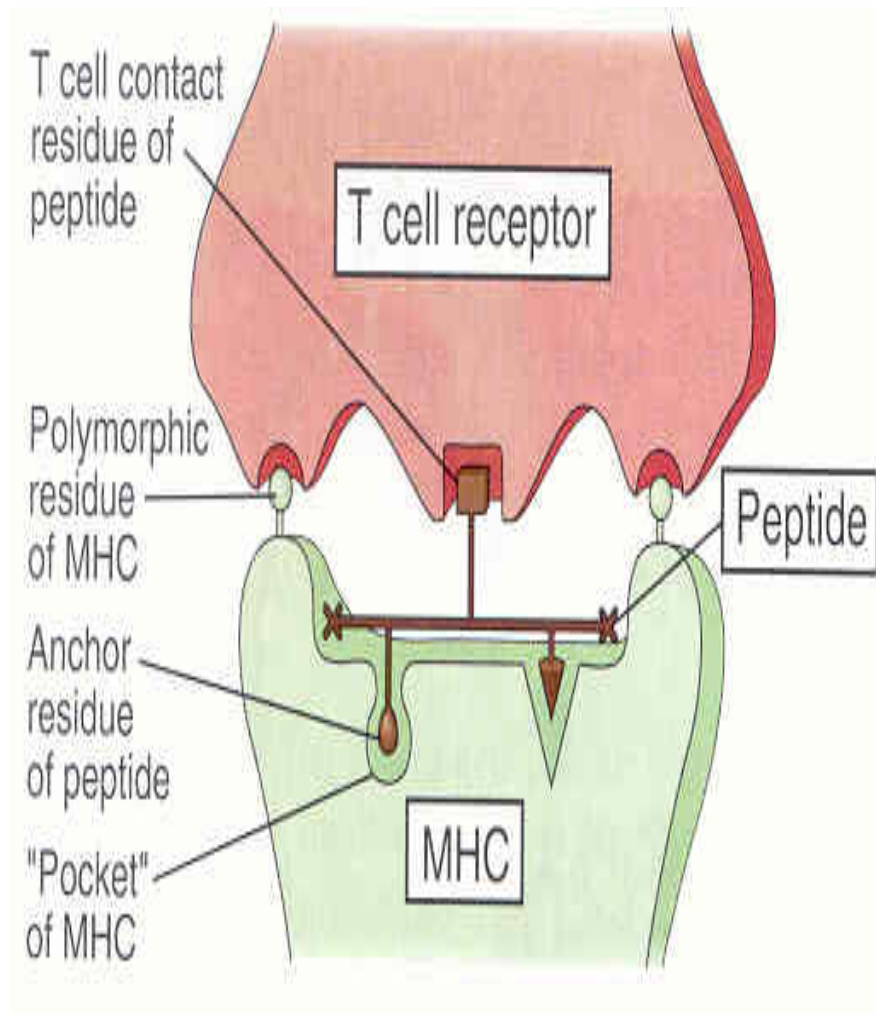


φαινόμενο του ΜΗC περιορισμού (MHC restriction)



Τ κύτταρα
αναγνωρίζουν
το ξένο αντιγόνο
μόνο εφόσον αυτό
παρουσιασθεί
σε σχέση με
«ίδια» ΜΗC μόρια

τριμοριακό σύμπλεγμα : TcR-MHC-πεπτιδίδιο



Peter Doherty & Rolf Zingernagel

χρησιμοποίησαν

στα πειράματα τους (1974)

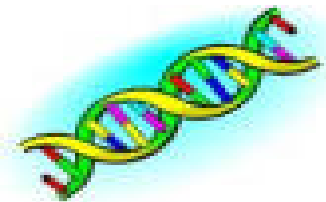
Τ κυτταροτοξικά κύτταρα

ειδικά για συγκεκριμένο ιό

Βραβείο Nobel το 1996

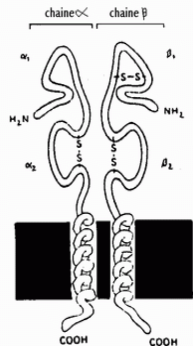
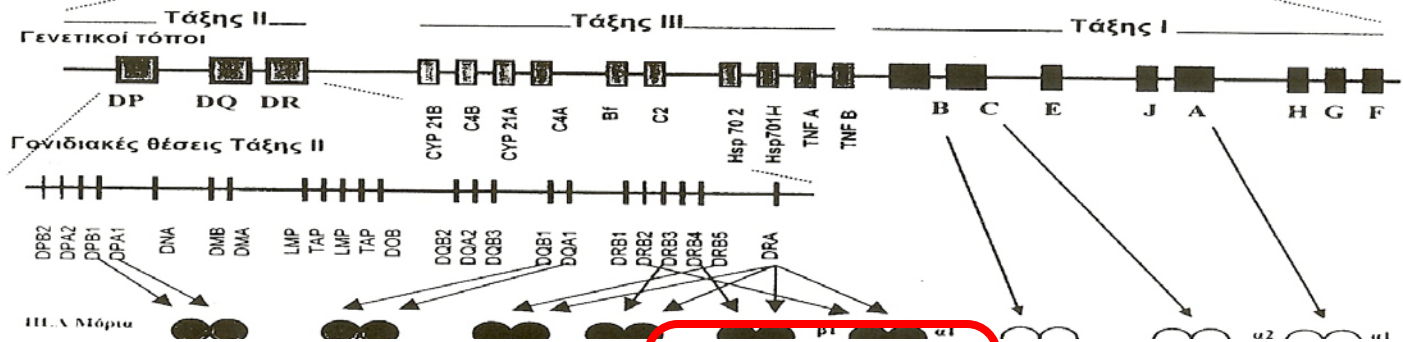


μέθοδοι HLA τυποποίησης



Χρωμόσωμα 6

HLA περιοχή

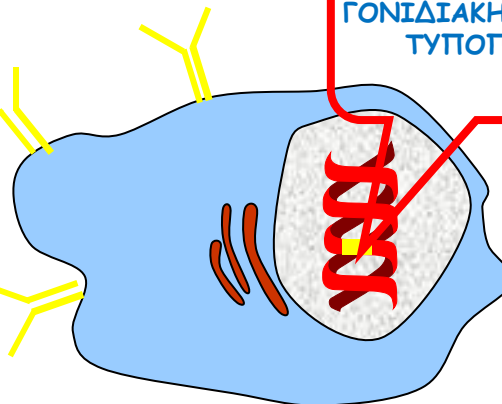


ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ (ΜΟΡΙΑΚΗ)
ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Καθορισμός
αλληλίων
(αλληλομόρφων γονιδίων)

Καθορισμός
αντιγόνων

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ
ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ



μέθοδοι HLA τυποποίησης

HLA

	A	B	Cw	DR	DQ	DP
--	---	---	----	----	----	----

Ορολογικές

+	+	+	+	+	-
---	---	---	---	---	---

- CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity)

Μοριακές

+	+	+	+	+	+
---	---	---	---	---	---

- PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Specific Sequence Primers)

- PCR-SSOP (Polymerase Chain Reaction-Specific Sequence

Oligonucleotide Probes)

- SBT (Sequencing-Based Typing)

- NGS (Next-Generation Sequencing)

low-resolution, high-resolution, allele-level

HLA class I γονίδια

a

MHC class I genes



Exon 1: 5' untranslated region & leader sequence

Exon 2: alpha 1 domain

Exon 3: alpha 2 domain

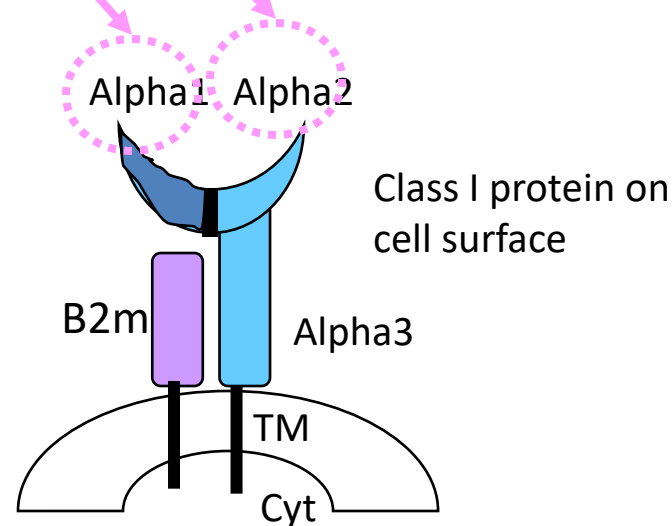
Exon 4: alpha 3 domain

(interacts with $\beta 2M$)

Exon 5: transmembrane region

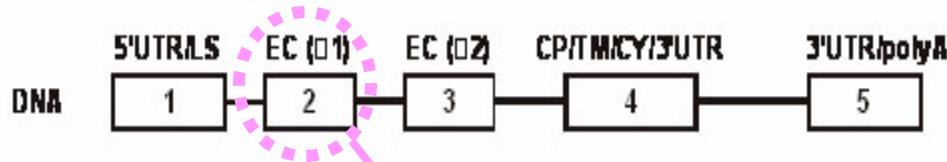
Exon 6-7: cytoplasmic domain

Exon 8: 3'UTR

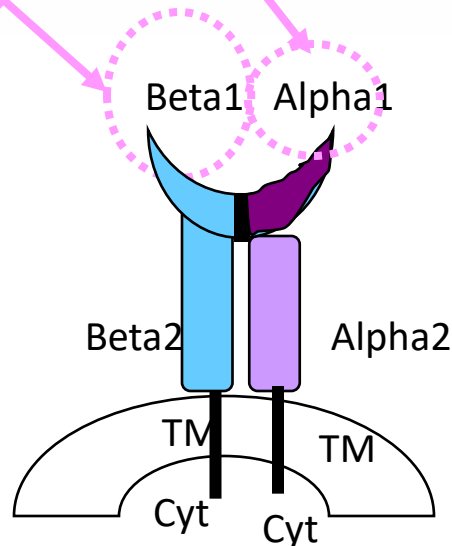
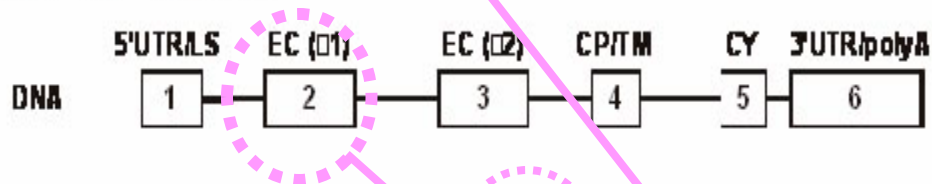


HLA class II alpha (α) & beta (β) γονίδια

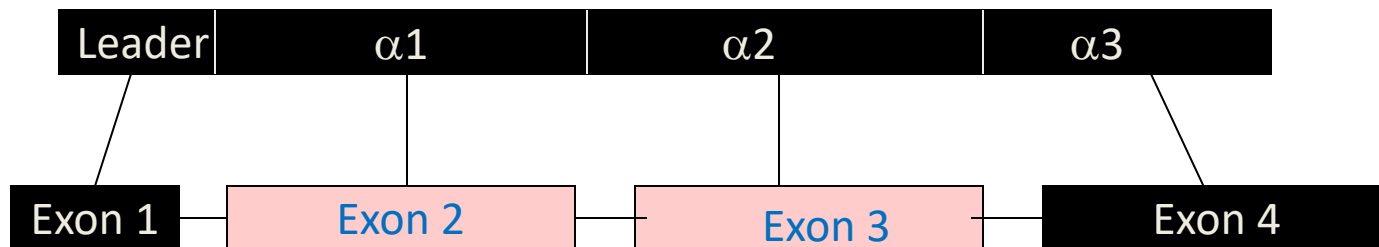
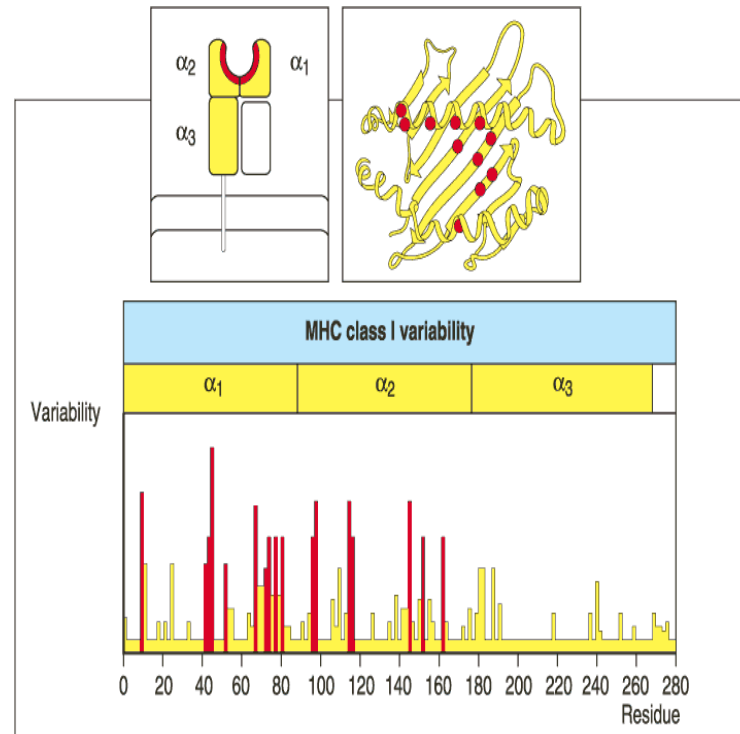
MHC class II A genes



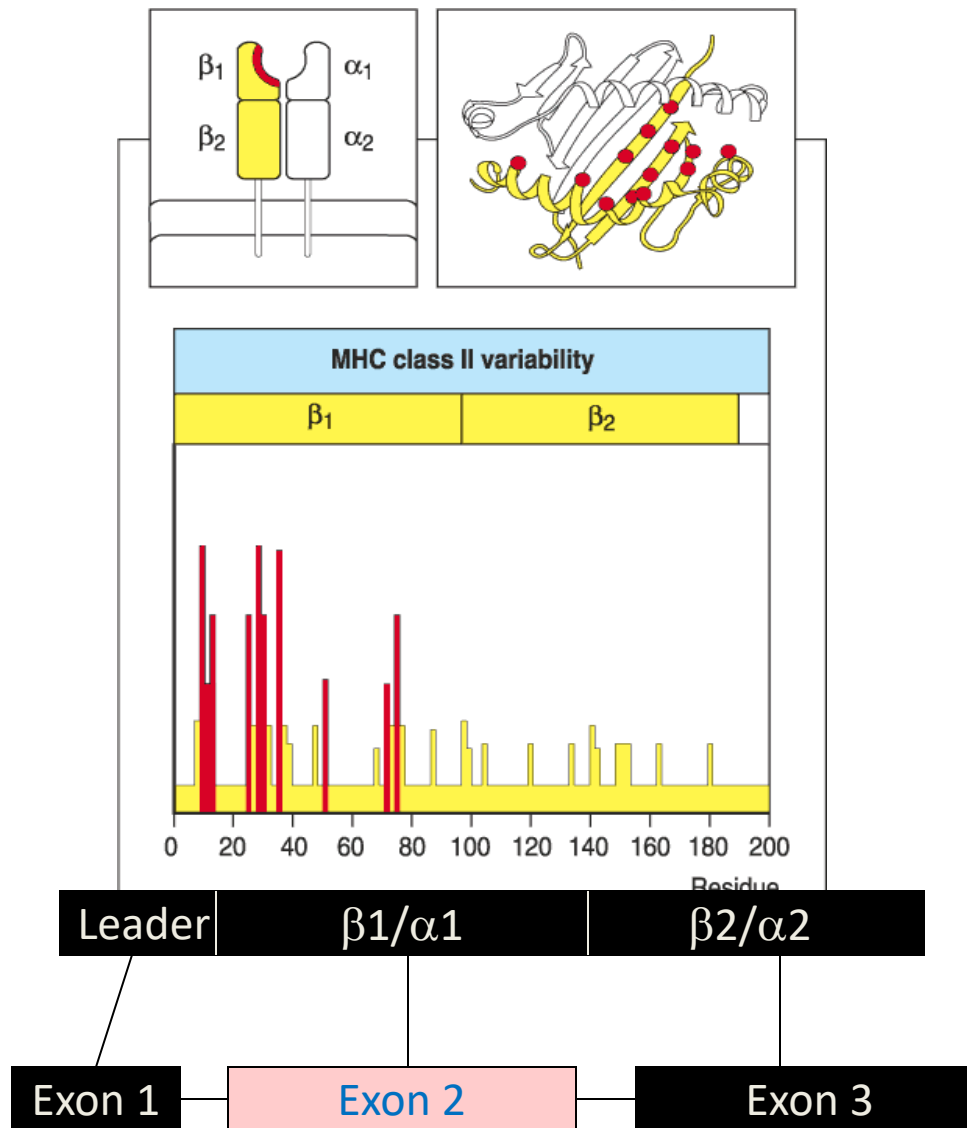
MHC class II B genes



ποικιλομορφία (variability) στα HLA class I γονίδια

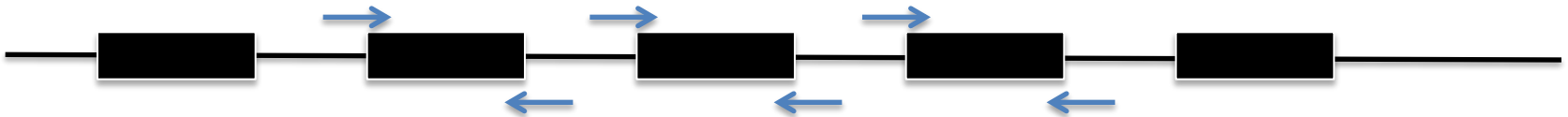


ποικιλομορφία (*variability*) στα HLA class II γονίδια



HLA τυποποίηση χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αλληλούχησης υψηλής απόδοσης

exon-wise amplification of few exons (SBT, NGS)



whole-gene amplification (NGS)



HLA τυποποίηση με NGS

τα τελευταία χρόνια

έχει καταδειχθεί ότι η τεχνολογία NGS

μπορεί να εφαρμοσθεί στην HLA τυποποίηση

δίδοντας αποτελέσματα

υψηλής ανάλυσης (HR)

με ελάχιστες ασάφειες (ambiguities)



HLA τυποποίηση με NGS

- νέες τεχνικές προετοιμασίας των δειγμάτων
- βελτιωμένα λογισμικά

έχουν δώσει τη δυνατότητα ανάπτυξης μεθόδων HLA τυποποίησης με NGS

- ✓ σχετικά απλές στην εφαρμογή
- ✓ οικονομικά αποδοτικές
- ✓ εφαρμόζονται σήμερα στα κλινικά εργαστήρια
- ✓ χρησιμοποιούν εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα (kits)
- ✓ σε διαφορετικές πλατφόρμες

NGS Platforms

- 454-Roche: exon coverage only -
multiplexing - work flow was demanding

έχει εγκαταλειφθεί

- S5-Ion Torrent (αλλαγή Ph):

instrument problems - reads too short - homopolymer problems

χρησιμοποιείται στα κλινικά Εργαστήρια

- Pacific Biosciences: extremely long reads - throughput and workflow still in development; appears to be simple - base calling (15 percent error) by consensus - homopolymer problems

δεν είναι κατάλληλη για κλινικά Εργαστήρια (υψηλό κόστος)

- Illumina (εκπομπή φωτός):

less error rate - robust instruments - various systems

η πιο ευρέως διαδεδομένη στα κλινικά Εργαστήρια (MiSeq)

Platform Features				
				
Feature	HiSeq2500 - Highoutput	HiSeq2500 - Rapid mode	MiSeq	PacBio RSII
Number of reads	150-180M/lane	100-150M/lane	12-15M (v2) 20-25M (v3)	50-80K/SMRT cell
Read length	2 x 100 bp	2 x 150 bp	2 x 300 bp (v3)	~ 10-20 kb
Yield per lane (PF data)	up to 35 Gb	up to 45Gb	up to 15 Gb	up to 0.4 Gb
Instrument Time	~12-14 days	~2 days	~2 days	~2 hours
Pricing per Gb	\$59 (PE100)	\$53 (PE150)	\$108 (PE300)	\$697

στάδια της HLA τυποποίηση με NGS

7. Data analysis

1. Sample Collection

2. Long-Range PCR

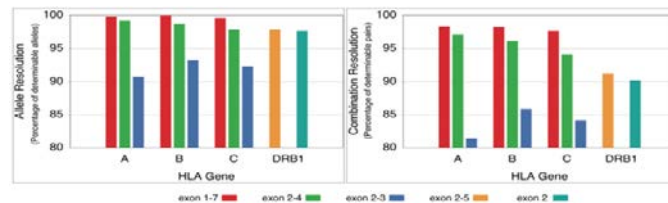
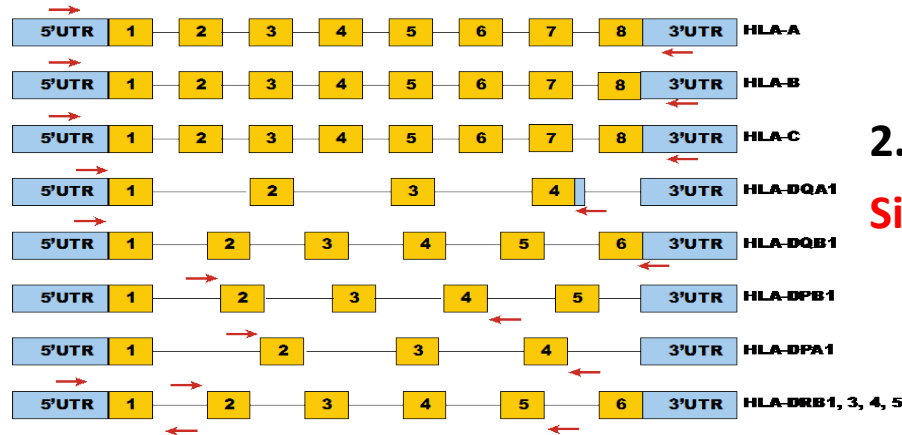
Single amplification condition

3. Quantification & Pooling

4. Fragmentation

5. Library preparation

6. Sequencing



ανάλυση δεδομένων

Data
Analysis

1

Sequence



Ion Torrent
PGM™
Sequencer

2

Analysis via
TypeStream Plug-In



Torrent
Server

Data
Transfer

3

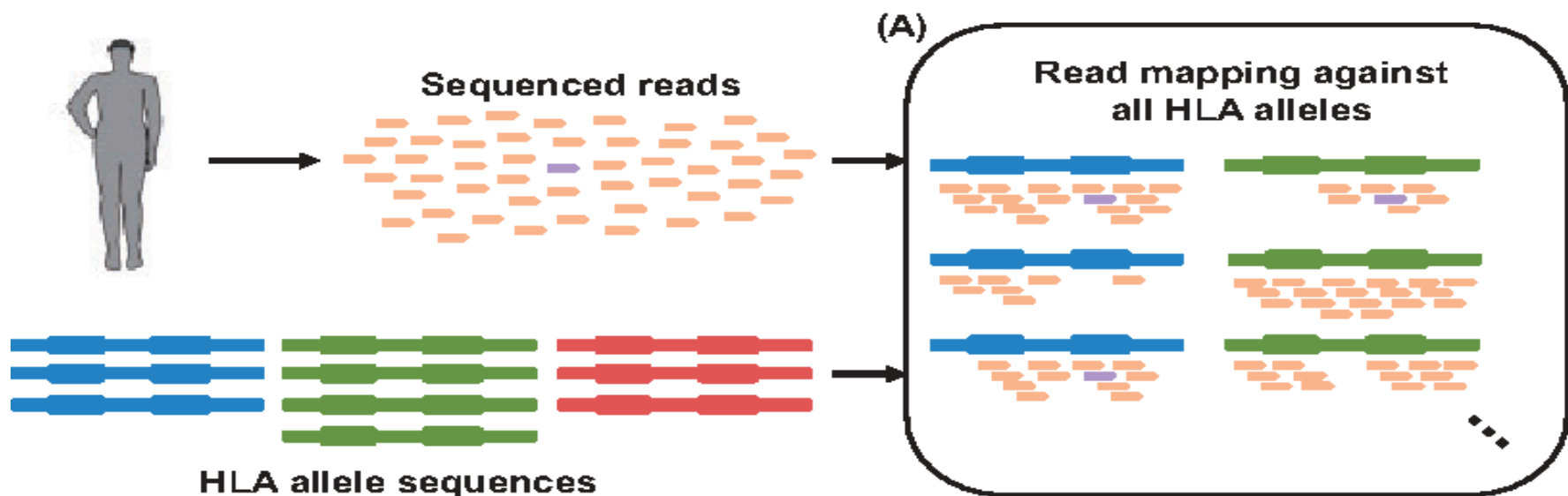
View Data



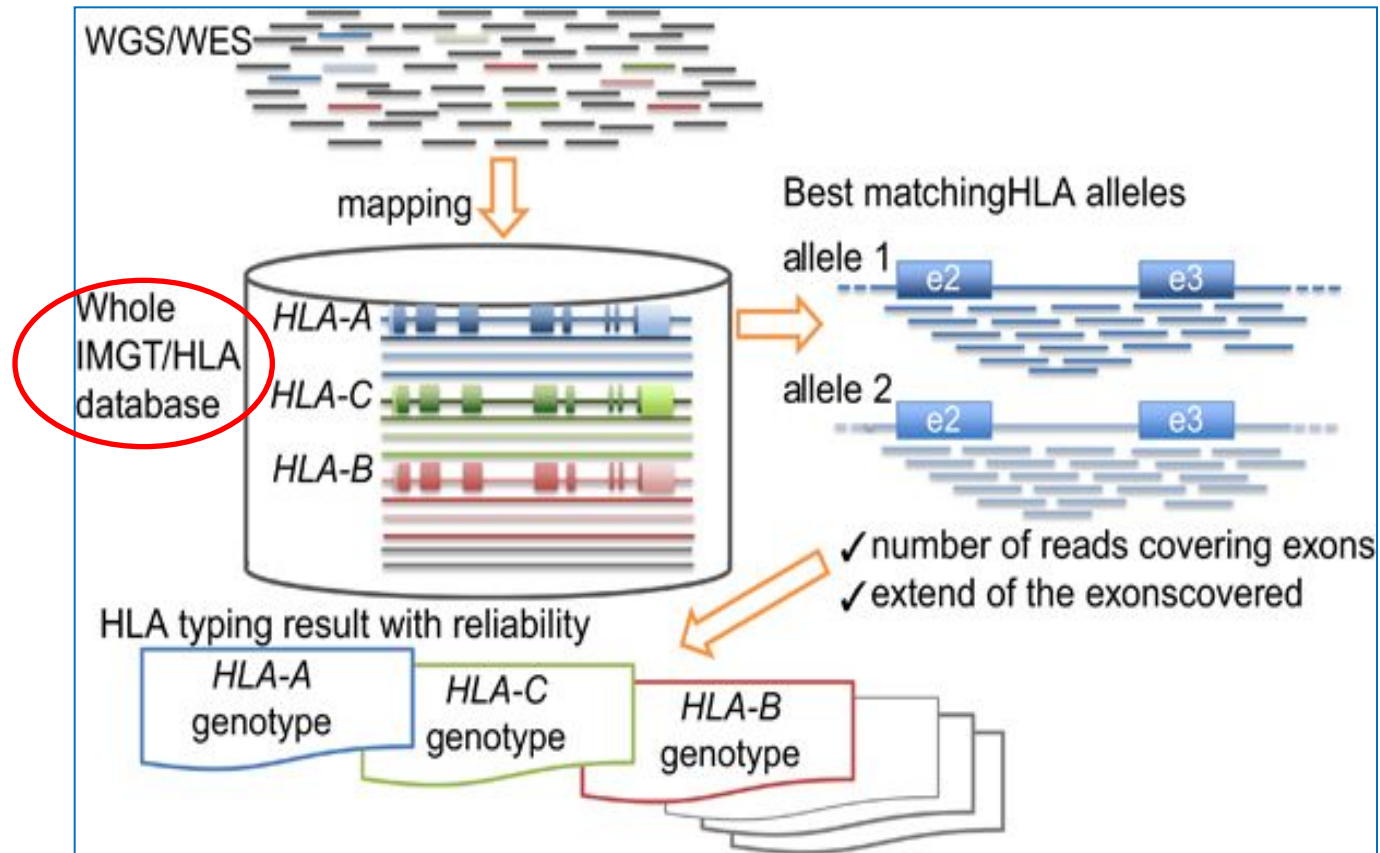
TypeStream data is viewed on the Torrent Suite
from any device with web browser access.



HLA τυποποίηση με NGS - ανάλυση δεδομένων (mapping)



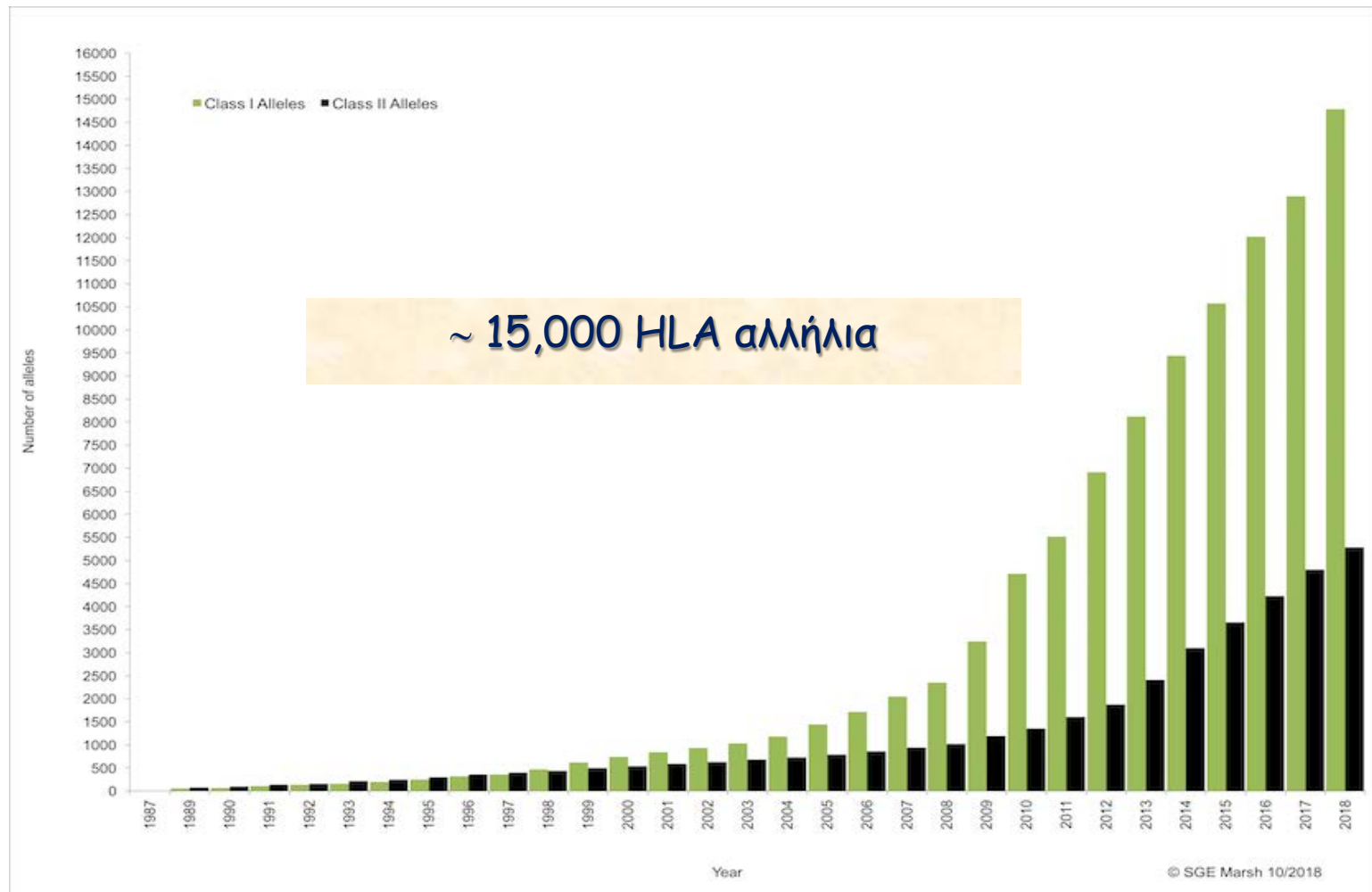
HLA τυποποίηση με NGS - ανάλυση δεδομένων (mapping)



WGS: Whole Genome Sequencing

WES: Whole Exome Sequencing

ΜΗC πολυμορφισμός



πλεονεκτήματα NGS έναντι κλασσικών μοριακών τεχνικών HLA τυποποίησης

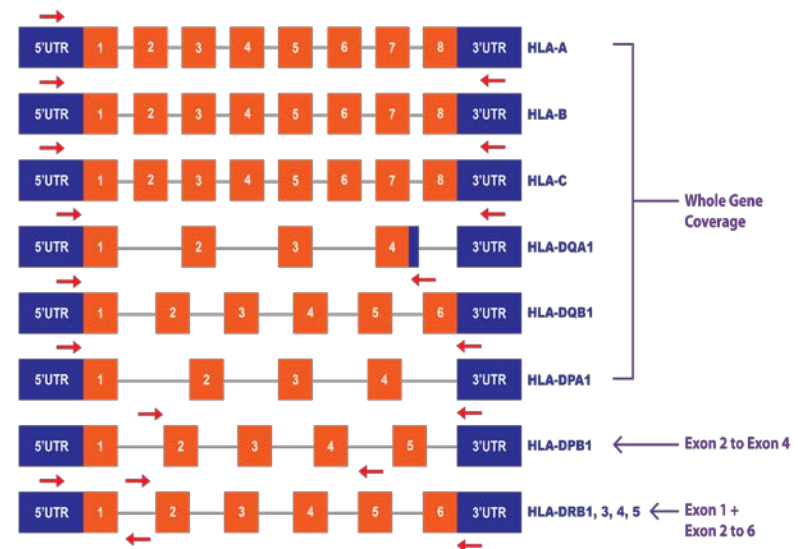
- υψηλότερη απόδοση ανάλυσης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
- μεγαλύτερη διαγνωστική ευαισθησία
- σημαντικά χαμηλότερο κόστος
- περιλαμβάνει όλα τα εξόνια

(στους περισσότερους HLA γενετικούς τύπους) αλλά και μη κωδικοποιούσες περιοχές (introns) του γονιδίου

σε αντίθεση

με τις κλασσικές DNA τεχνικές που αναλύουν συγκεκριμένα εξόνια

- 2^ο & 3^ο για HLA τάξης I
- 2^ο για HLA τάξης II



ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ
ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ (low-resolution)

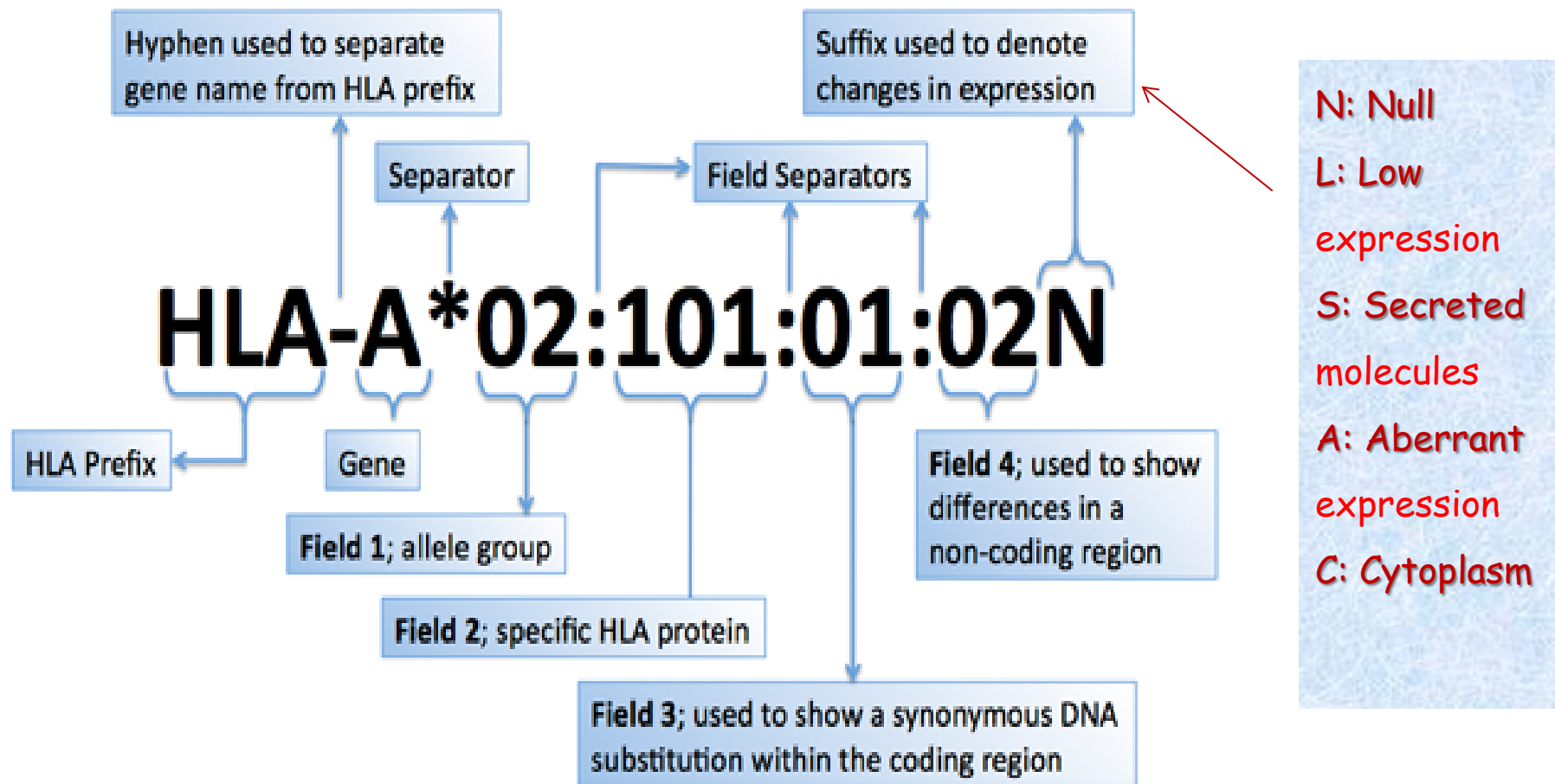
HLA - A1, A2 / B35, B51 / Cw3, Cw6 / DR11, DR15 / DQ6, DQ7

ΜΟΡΙΑΚΗ
ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ (high-resolution)

HLA - A*01:01, A*02:01 / B*35:03, B*51:02 / Cw* 03:02, Cw*06:01
/ DRB1*11:04, DRB1*15:02 / DQA1*03:01, DQA1*05:01
/ DQB1*06:01, DQB1*03:01 / DPB1*02:01, DPB1*04:02

HLA Nomenclature-4 πεδία (fields)



© SGE Marsh 04/10

NGS τυποποίηση επιτρέπει τον **προσδιορισμό του 3^{ου} & 4^{ου} πεδίου**, σε επίπεδο ρουτίνας ενώ οι **κλασσικές μοριακές τεχνικές** περιορίζονται στην ανάλυση μόνο της **θέσης σύνδεσης του αντιγόνου (ARS)** των HLA γονιδίων (**1^ο & 2^ο πεδίο**)

κλινική σημασία των null αλληλίων

μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

με κλασσικές τεχνικές θεωρείται ότι ο δότης φέρει
ένα εκφραζόμενο αλλήλιο,

ενώ στην πραγματικότητα φέρει null αλλήλιο $\Rightarrow$

ασυμβατότητα στην κατεύθυνση GvH (graft-versus host)

- Λήπτης: A*02:01, 24:02/~~24:09N~~
- Δότης: A*02:01, ~~24:02~~/24:09N

κλινική σημασία των null αλληλίων

μεταμόσχευση νεφρού

με κλασσικές τεχνικές θεωρείται ότι ο ασθενής φέρει
ένα εκφραζόμενο αλλήλιο,
ενώ στην πραγματικότητα φέρει null αλλήλιο $\Rightarrow$
ασυμβατότητα στην κατεύθυνση της απόρριψης

- Ασθενής: A*02:01, ~~24:02~~/24:09N
- Δότης A*02:01, 24:02/~~24:09N~~

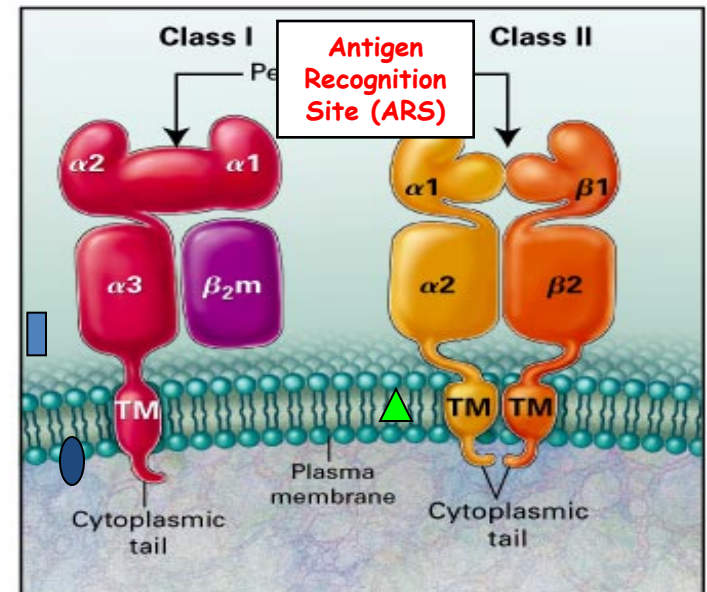
διαφορετικά αλλήλια - ARS (Antigen Recognition Site) ταυτόσημα

A*02:01

A*02:09

αυτά τα αλλήλια διαφέρουν σε περιοχές,
οι οποίες δεν επηρεάζουν την αλλοαναγνώριση
(αντικατάσταση ενός αμινοξέος στη θέση 236)

τα διαφορετικά αμινοξέα
που καθορίζουν
τα διαφορετικά αλλήλια
μπορεί να εντοπίζονται
σε θέσεις του μορίου
(κυτταροπλασματική, διαμεμβρανική)
οι οποίες πιθανόν δεν διεγείρουν
ανοσπαντήσεις

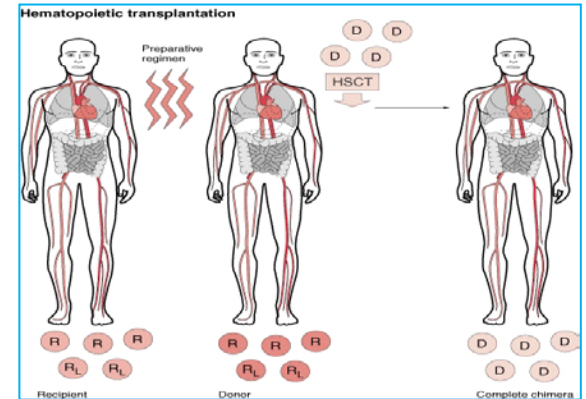


εφαρμογές στη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

πρώτοι που εφάρμοσαν την NGS ήταν:

- ✓ Δεξαμενές Εθελοντών Δοτών (Registries)
- ✓ Εργαστήρια που υποστηρίζουν τη ΜΑΑΚ

όπου απαιτείται HLA-HR τυποποίηση σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων



λαμβάνοντας υπόψη

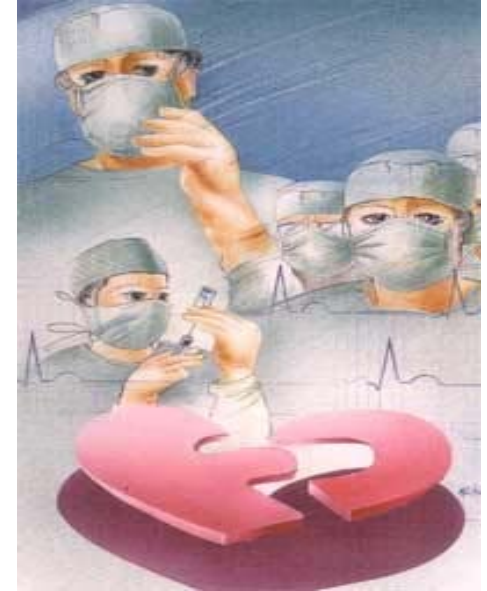
το μέγεθος της πληροφορίας αλλά και το κόστος

η τυποποίηση αιματολογικών ασθενών και των δοτών τους με NGS

αποτελεί την **καλύτερη επιλογή**

εφαρμογές στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων (κυρίως νεφρού)

- μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο
- επιλογή του πλέον κατάλληλου δότη
- ανταλλαγή των μοσχευμάτων
- ερμηνεία των αντι-HLA αντισωμάτων στο λήπτη
- μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά



η έννοια των «αποδεκτών ασυμβατοτήτων» και κατ' επέκταση

η συμβατότητα σε επίπεδο επιτόπων (epitope-matching) ⇒

περιορίζει την ανάπτυξη de-novo DSA (Donor-Specific Antibodies)

και κατά συνέπεια τον κίνδυνο απόρριψης

εφαρμογές στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων (κυρίως νεφρού)

- ✓ χρησιμότητά της περιορίζεται στις μεταμοσχεύσεις από ζώντα δότη
- ✓ αναζητούνται τρόποι περιορισμού του χρόνου ολοκλήρωσης της εξέτασης (σε 6-8 ώρες)
- με τις νεότερες πλατφόρμες (π.χ. Oxford Nanopore)
- γεγονός που **δεν φαίνεται εφικτό στο άμεσο μέλλον**
- με σκοπό να εφαρμοσθεί
- και στις μεταμοσχεύσεις από πτωματικό δότη

εφαρμογές στη γενετική των πληθυσμών (ανθρωπολογικές μελέτες)

➤ τα επόμενα χρόνια αναμένεται να είναι διαθέσιμος

ένας τεράστιος όγκος δεδομένων

νουκλεοτιδικής ανάλυσης των HLA αλληλίων ⇒

θα αλλάξουν δυνητικά την κατανόηση μας

για την ποικιλομορφία στους ανθρώπινους πληθυσμούς

➤ προβλέπεται να επιφέρει σημαντικές αλλαγές

στις μελέτες γενετικής των πληθυσμών

εφαρμογές στην ανοσογενετική

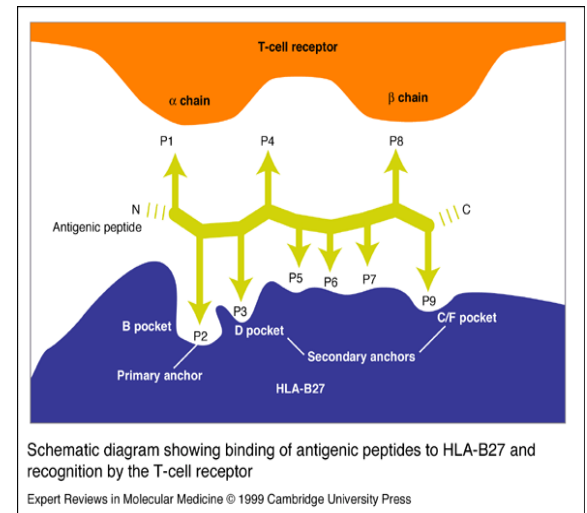
αναμένεται επίσης ότι

στις μελέτες συσχετίσεων με νοσήματα (ανοσογενετικές)

η τεχνολογία NGS θα χρησιμοποιείται

ως μέθοδος εκλογής

για την HLA τυποποίηση



περιορισμοί της τεχνολογίας NGS

- ✓ ο χρόνος ολοκλήρωσης της εξέτασης ανέρχεται σε 4-5 ημέρες
- ✓ το κόστος του εξοπλισμού είναι σχετικά υψηλό
- ✓ είναι δύσκολο να αξιολογηθεί η κλινική σημασία των νέων HLA αλληλίων που ανακαλύπτονται

συμπερασματικά

η τεχνολογία NGS έχει και θα συνεχίσει να παίζει σημαντικό ρόλο για

- πλήρη χαρακτηρισμό των HLA μορίων
- καλύτερη κατανόηση του ρόλου τους στην υγεία και στη νόσο



Ευχαριστώ για την προσοχή σας

