

Сравнительный анализ методов генотипирования минорных антигенов гистосовместимости

А.С. Вдовин¹, А.М. Постовская^{1,2}, Н.А. Быкова¹, Д.С. Романюк¹, А.Х. Алиева³, П.Р. Ефимова^{1,2},
С.А. Шитиков², У.Л. Джулакян¹, Г.А. Ефимов¹

¹ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4;

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1;

³ФГБУН «Институт молекулярной генетики Российской академии наук»; Россия, 123182, Москва, площадь академика И.В. Курчатова, 2

Контакты: Григорий Александрович Ефимов grigory@efimov.info

Для определения различий донора и реципиента по минорным антигенам гистосовместимости при трансплантации могут быть использованы разнообразные подходы. В настоящей работе нами был проведен сравнительный анализ методов генотипирования, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), для четырех минорных антигенов. Три метода: аллель-специфичная ПЦР, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов и ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan продемонстрировали 100% достоверность результатов генотипирования при сравнении с секвенированием по Сэнгеру для всех изученных полиморфизмов. Метод анализ кривых плавления оказался неприменимым для генотипирования одного минорного антигена (HA-1), имеющего сцепленный синонимичный полиморфизм. Полученная информация может быть использована при выборе метода для крупномасштабного генотипирования в клинической практике.

Ключевые слова: минорные антигены гистосовместимости, однонуклеотидные полиморфизмы, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, генотипирование, аллельная дискриминация.

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-2-40-50

Comparative analysis of minor histocompatibility antigens genotyping methods

A.S. Vdovin¹, A.M. Postovskaya^{1,2}, N.A. Bykova¹, D.S. Romaniuk¹, A.K. Alieva³, P.R. Yefimova^{1,2},
S.A. Sheetikov², H.L. Julhakyan¹, G.A. Efimov¹

¹National Research Center for Hematology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation;
4 Novy Zyikovskiy pr., Moscow, 125167, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Goryi St., Moscow, 119991, Russia;

³The Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences; 2, Kurchatova Sq., Moscow, 123182, Russia

The wide range of techniques could be employed to find mismatches in minor histocompatibility antigens between transplant recipients and their donors. In the current study we compared three genotyping methods based on polymerase chain reaction (PCR) for four minor antigens. Three of the tested methods: allele-specific PCR, restriction fragment length polymorphism and real-time PCR with TaqMan probes demonstrated 100% reliability when compared to Sanger sequencing for all of the studied polymorphisms. High resolution melting analysis was unsuitable for genotyping of one of the tested minor antigens (HA-1) as it has linked synonymous polymorphism. Obtained data could be used to select the strategy for large-scale clinical genotyping.

Keywords: minor histocompatibility antigen, single nucleotide polymorphism, allogeneic hematopoietic stem cells transplantation, genotyping, allelic discrimination

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) широко применяется для лечения гемобластозов. При алло-ТГСК клетки иммунной системы пациента уничтожаются методом предтрансплантационного кондиционирования и заменяются клетками иммунной системы донора [1]. Помимо восстановления кроветворения, трансплантация за счет иммунного ответа донорских Т-клеток против клеток хозяина приводит к элиминированию остаточных опухолевых клеток. Аллореактивность против злокаче-

ственного клона получила название реакции «трансплантат против опухоли» (РТПО). Однако зачастую в ходе посттрансплантационного иммунного ответа поражаются и здоровые ткани пациента (реакция «трансплантат против хозяина», РТПХ). Оба эти эффекта имеют одинаковую природу и зависят от совместимости донора и реципиента по главному комплексу гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС) и минорным антигенам гистосовместимости (Minor Histocompatibility Antigens, MiHA). Главный комплекс гистосовместимости — группа поверхностных белков,

чей основной функцией является презентация внутриклеточных (МНС I класса) и внеклеточных (МНС II класса) антигенов Т-лимфоцитам. Гены, кодирующие эти белки (Human Leukocyte Antigen, HLA), высокополиморфны [2], т. е. полное совпадение по этим генам у неродственных людей – редкое событие. В то же время существенное различие по аллелям МНС при трансплантации стволовых клеток крови влечет за собой выраженную и потенциально летальную РТПХ [3]. По этой причине были созданы специальные банки для подбора доноров, совместимых по аллелям МНС. Но даже полное совпадение по генам МНС не может полностью предотвратить аллореактивность. Впервые РТПХ при HLA-идентичной ТГСК была описана в 1970 годы [4]. Мишени аллореактивных Т-клеток получили название Минорных антигенов. Потребовалось почти 20 лет, чтобы охарактеризовать MiHA на молекулярном уровне [5]. Выяснилось, что это пептиды, презентируемые на поверхности клеток реципиента в контексте общего с донором аллеля МНС. Тот факт, что они вызывают иммунный ответ, указывает на то, что они не были представлены в ходе негативного отбора в тимусе донора.

Причина существования MiHA – полиморфизм человеческого генома [6]. Небольшие различия в белковых последовательностях между индивидуумами приводят к различным наборам пептидов, получающимся вследствие расщепления белков протеасомой, и в конечном итоге к разным наборам пептидов, представленным на поверхности клеток в МНС. Известно всего несколько MiHA, обусловленных структурными вариантами генома (делеция гена) [7], тогда как происхождение большинства MiHA вызвано присутствием однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), благодаря которым два гомологичных пептида донора и реципиента отличаются друг от друга лишь 1 аминокислотой [8]. Из-за диплоидности генома необходимыми условиями возникновения MiHA являются гомозиготность донора по одному (неиммуногенному) аллелю и присутствие хотя бы одного варианта альтернативного (иммуногенного) аллеля у донора. Количество таких комбинаций полиморфизмов в каждой паре донор–реципиент велико – более 3000 [9], однако не все потенциально иммуногенные комбинации приводят к появлению иммунного ответа на MiHA [10]. На сегодняшний день идентифицированы около 50 полиморфизмов, связанных с MiHA, иммуногенность которых подтверждена экспериментально [8]. Различие, различие донора и реципиента (пациента) по этим полиморфизмам указывает на мишени аллореактивного ответа в данной паре донор–пациент, что позволяет изучить влияние конкретных MiHA на РТПО и РТПХ.

Описание свойств MiHA позволит предсказывать уровень иммунного ответа при алло-ТГСК и своевременно корректировать курс лечения. В перспективе предсказание мишеней аллореактивности позволит селективно модифицировать трансплантат [11].

Генотипирование полиморфизмов методом аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) было описано для минорных антигенов HA-1 [12], HA-2 [13] и HA-3 [14]. В этом методе используются два прямых праймера, комплементарных своим 3'-концом к одному или другому аллельному варианту ОНП гена MiHA, и один общий обратный праймер. Одну и ту же пробу анализируют в двух параллельных реакциях с помощью двух пар праймеров, затем результат ПЦР визуализируют при помощи гель-электрофореза. Аллельная дискриминация обеспечивается тем, что присоединение полимеразой нуклеотидов к 3'-концу праймера происходит при полном связывании праймера на 3'-конце, т. е. при полной комплементарности в месте ОНП. Однако на практике различие в один нуклеотид не всегда достаточно для обеспечения избирательного синтеза полимеразой, что может затруднять аллельную дискриминацию [15]. Еще одним фактором, важным для последующего клинического применения, является возможность проведения анализа для максимального числа полиморфизмов одновременно. Одновременного типирования нескольких MiHA методом АС-ПЦР существуют ограничения: так как специфичность реакции амплификации достигается за счет того, что 3'-конец одного из праймеров приходится на целевой полиморфизм, число возможных вариантов праймеров сильно ограничено, соответственно, ограничены и свойства олигонуклеотидов. Вариант параллельного типирования на 10 аутосомных MiHA методом АС-ПЦР был описан ранее [16] (табл. 1).

В данной работе мы исследовали применимость альтернативных методов генотипирования для одновременного анализа MiHA-полиморфизмов.

Метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) основан на способности эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) специфически узнавать определенные последовательности ДНК и расщеплять обе нити ДНК в месте или рядом с местом узнавания [17]. Для генотипирования ОНП должен находиться в сайте узнавания рестриктазы, при этом один из аллельных вариантов должен приводить к исчезновению сайта. Это означает, что для каждого гена MiHA требуется подбирать свою рестриктазу. Аллельная дискриминация проводится путем наработки фрагментов, содержащих исследуемый ОНП, методом ПЦР и последующей их инкубации со специфичной рестриктазой. Затем длина получившихся продуктов рестрикции анализируется агарозным гель-электрофорезом. Этот метод дешев и не требует синтеза специальных флуоресцентных зондов, а существующее на сегодняшний день разнообразие эндонуклеаз рестрикции позволяет подобрать специфичные рестриктазы для почти любого полиморфизма.

Метод плавления в высоком разрешении (ПВР) основан на различии термостабильности двухцепочечных фрагментов ДНК с полностью комплементарными нитями и фрагментов с одним или несколькими

Таблица 1. Проанализированные минорные антигены гистосовместимости

МiNA	Идентификатор полиморфизма в dbSNP	Частота в популяции	Ген	Расположение	Хромосома	Нуклеотид	Аминокислота	Пептид	Аллель МНС	Иммуногенность	Ткане-специфичность
HA-1	rs1801284	0,404752	HMHA1	экзон	19	A	H	VL <u>H</u> DDLLEA	HLA-A*02:01	да	Миелоидная, лимфоидная
		G				R	VLRDDLLEA	нет			
		0,404752				A	H	KECVL <u>H</u> DDL	HLA-B*40:01	да	
		0,595248				G	R	KECVLRDDLL		нет	
HA-2	rs61739531	0,863019	MYO1G	экзон	7	G	V	YIGEVLV <u>S</u> Y	HLA-A*02:01	да	Миелоидная, лимфоидная
		0,136981				A	M	YIGEVLV <u>S</u> M		нет	
ACC-1Y	rs1138357	0,352037	BCL2A1	экзон	15	A	Y	DYLQ <u>Y</u> VLQI	HLA-A*24:02	да	Миелоидная, лимфоидная
ACC-1C		0,647963				G	C	DYLQ <u>C</u> VLQI		да	
ACC-2	rs3826007	0,203474	BCL2A1	экзон	15	A	D	KEFED <u>D</u> IINW	HLA-B*44:03	да	Миелоидная, лимфоидная
		0,796526				G	G	KEFED <u>G</u> IINW		нет	

Примечания. Жирным шрифтом и подчеркиванием выделены варианты аминокислоты.

неспаренными нуклеотидами. В качестве способа детекции используют интеркалирующие флуоресцентные красители, интенсивность свечения которых возрастает на порядок при включении в образуемые двухцепочечные фрагменты ДНК. За амплификацией исследуемого участка следуют постепенное нагревание проб и регистрация флуоресценции в реальном времени. Ожидается, что образцы, в которых сформировались гетеродуплексы, раньше начнут денатурировать, образуя отдельные нити и высвобождая краситель, при этом из-за свойств красителя свечение в образце понижается. По результатам серии измерений программой формируются кривые плавления двухцепочечных фрагментов [18, 19]. При этом различие лишь по одному нуклеотиду при длине фрагмента до 300 пар оснований вносит достаточные изменения в форму кривой плавления. Сравнивая кривые плавления контролей и образцов, можно определить гетерозиготу и оба гомозиготных варианта. Этот метод генотипирования образцов не требует дополнительных манипуляций (обработка рестриктазами, электрофоретический анализ).

Генотипирование ПЦР-РВ с использованием зондов TaqMan — метод, требующий специальных составных олигонуклеотидов — TaqMan-зондов, двумя концами конъюгированных с флуоресцентными красителями: сигнальным флуорофором на 5'-конце и гасящим флуорофором на 3'-конце. Спектр излучения сигнальной метки совпадает со спектром поглощения гасителя,

поэтому, когда обе молекулы связаны вместе олигонуклеотидом, свет сигнальной молекулы поглощается гасящим флуорофором. В такой ПЦР-РВ используются четыре олигонуклеотида: два праймера для амплификации, фланкирующие область полиморфизма, и два аллель-специфичных TaqMan-зонда, связанные с двумя различными красителями, детектируемыми в разных флуоресцентных каналах. Зонды отличаются на один нуклеотид и комплементарны участку, непосредственно окружающему ОНП. На этапе элонгации в ходе ПЦР Taq-полимераза с 5'-экзонуклеазной активностью, двигаясь от праймера, может наткнуться на зонд, связавшийся с этой же нитью в месте полиморфизма. В этом случае полимеразы расщепляет этот зонд и сигнальная метка разобщается с гасителем, в результате чего возникает флуоресцентный сигнал, который далее нарастает за счет экспоненциального накопления продуктов ПЦР и, соответственно, возрастающего количества сайтов связывания и расщепления зондов. При правильно подобранной температуре реакции не полностью комплементарный зонд связывается менее стабильно, поэтому флуоресценция от другого красителя не наблюдается или ее рост значительно замедлен. В результате оба аллеля могут быть обнаружены в ходе одной реакции в одной пробирке в режиме ПЦР-РВ, что требует минимальных временных затрат. Зная соответствующий красителю TaqMan-зонда аллель, можно по графикам роста флуоресценции раз-

делить тестируемые образцы на гомо- и гетерозиготы. Наглядно разделить аллели можно, если построить двумерный график на основе данных флуоресценции для обоих красителей с одного из поздних циклов ПЦР-РВ.

Для сравнительного исследования были выбраны следующие MiHA: HA-1, HA-2, ACC-1 и ACC-2. При выборе мы учитывали клиническую важность: соответствующие этим MiHA полиморфизмы часто встречаются в популяции (следовательно, возникновение иммуногенной комбинации генотипов донора и реципиента высоко вероятно). Аллели HLA, представляющие эти MiHA, также относятся к наиболее распространенным (см. табл. 1), кроме того, ранее был разработан протокол AC-ПЦР для этих MiHA [16]. Помимо этого, данные MiHA специфичны для гемопоэтических клеток, что делает их перспективными с точки зрения разделения эффектов РТПО и РТПХ. Так, для HA-1, HA-2 и ACC-1 было показано, что появление специфичных к ним Т-клеток предшествует ремиссии после инфузии лимфоцитов донора [20, 21].

Материалы и методы

Выделение геномной ДНК. Геномная ДНК была выделена из крови 10 здоровых доноров с помощью набора WizardGenomic DNA Purification Kit (Promega, США) согласно протоколу производителя.

Подготовка контрольных матриц. Для контроля всех методов анализа ОНП были сконструированы плазмиды, содержащие фрагменты геномной ДНК с обоими аллельными вариантами исследуемых ОНП. Для этого с тотальной ДНК доноров, с помощью рекомбинантной полимеразы Pfu (Thermo Scientific, США) нарабатывались фрагменты ДНК, содержащие изучаемые ОНП. Полученные фрагменты очищались электрофоретически в 1,5 % агарозном геле, для выделения ДНК из геля использовался Gene Jet Gel Extraction Kit

(Thermo Scientific, США). Фрагменты лигировались в вектор pJET1.2 с помощью CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США) по тупым концам. Компетентные клетки штамма *E. coli* штамма DH5α, полученные кальциевым способом, трансформировали полученными плазмидами методом теплового шока. После отбора на селективном агаре колонии культивировались ночь в инкубаторе при 37°C, затем плазмидную ДНК выделяли с помощью GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США). Все полученные контрольные матрицы были проверены секвенированием по Сэнгеру (Евроген) [22].

АС-ПЦР. Условия амплификации искомым фрагментов геномной ДНК методом аллель-специфичной ПЦР, состав смеси ПЦР и последовательности праймеров (табл. 2) с небольшими изменениями были заимствованы из ранее опубликованной работы [16]. ПЦР-смесь содержала 80 нг геномной ДНК, 0,25 Ед. Taq-полимеразы (ThermoScientific, США), 0,01 % желатина, 0,2 мМ dNTP (ThermoScientific, США), по 0,5 мкМ праймеров (Евроген, Россия), 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3) и 6 % сахарозы (S7903, Sigma-Aldrich, Германия). Для увеличения выхода ПЦР концентрация праймеров для HA-1 была удвоена. Концентрация dNTP была снижена с 0,8 мМ до 0,2 мМ, поскольку исходная концентрация значительно превышала оптимальную и ингибировала реакцию. Цикл амплификации начинался с 2 мин при 94°C, затем 10 циклов: 10 с на 94°C и 60 с на 65°C, далее 20 циклов проходили при следующих условиях: 10 с на 94°C, 50 с на 61°C, 30 с на 72°C. Образцы были проанализированы при помощи электрофореза на 2 % агарозном геле.

Подбор праймеров для ПВР и TaqMan-ПЦР. Подбор праймеров, фланкирующих полиморфные регионы (см. табл. 2), производился с использованием программ Beacondesigner 7.0 и Primer 3 [23]. Во избежание попадания праймеров на другие ОНП, для каждого

Таблица 2. Последовательности праймеров для аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

MiHA	Аллельный вариант (вариантная аминокислота)	Прямой праймер	Обратный праймер
HA-1	H	CTTAAGGAGTGTGTGCTGCA	ACTCCTACACATCCCTCAGA
HA-1	R	CTTAAGGAGTGTGTGTTGCG	
HA-2	V	ACAGTCTCTGAGTGGCTCAG	GCTCCTGGTAGGGGTTTCAС
HA-2	M		GCTCCTGGTAGGGGTTTCAT
ACC-1	Y	CATTGCCTCAACAGCTTCAAG	GGTTGTGGTATCTGTAGG <u>G</u> CGT
ACC-1	C		GGTTGTGGTATCTGTAGG <u>G</u> CGC
ACC-2	D	GATGGAAAAGGAGTTTGAAGGCGA	CAGCCTCCGTTTTGCCTTATC
ACC-2	G	GATGGAAAAGGAGTTTGAAGGCGG	

Примечание. Приведены 5'-3'-последовательности олигонуклеотидов. Жирным шрифтом выделены аллель-специфичные нуклеотиды на 3'-конце, подчеркиванием – дополнительные замены, внесенные для увеличения специфичности полимеразной цепной реакции.

ОНП были взяты фланкирующие нуклеотидные последовательности из генома человека версии hg38 (UCSCGenomeBrowser — <http://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg38/database/>), на которых отмечались варианты нуклеотидных полиморфизмов из базы данных dbSNP версии 142 (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/snp/database>), встречающиеся более чем в 1 % человеческой популяции. Проверка на специфичность подобранных праймеров к исследуемым областям генома проводилась с помощью ресурса Primer-Blast, NCBI.

ПЦРФ. Фрагменты, содержащие исследуемые ОНП, амплифицировались с помощью ПЦР. В реакционную смесь входили 1,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTP, 0,5 мкМ прямого праймера, 0,5 мкМ обратного праймера, Taq-полимераза (ThermoScientific, США), буфер для Taq-полимеразы с KCl (ThermoScientific, США) и 10 нг геномной ДНК. Контрольные пробы содержали 0,5 нг контрольной матрицы. ПЦР проходила при следующих температурных условиях: 95 °С – 5 мин, 30 циклов; 95 °С – 30 сек, 60 °С – 30 сек, 72 °С – 8 сек, 72 °С – 5 мин.

После завершения реакции амплификации непосредственно в ПЦР-смесь добавляли соответствующие эндонуклеазы: для HA1 и HA2 – 2 Ед. FatI (СибЭнзим, Россия), ACC1 – 10 Ед. RsaI (СибЭнзим, Россия), ACC2 – 10 Ед. SfaNI (СибЭнзим, Россия). Рестрикция проходила в течение 30 минут при 37 °С. Получившиеся фрагменты разделялись в 10 % полиакриламидном геле, приготовленном на однократном TBE буфере. Для визуализации гель помещали в раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и инкубировали, перемешивая, 15 минут. Анализ аллельных вариантов проводили по наличию фрагментов ДНК определенной длины (табл. 3).

ПЦР-РВ с использованием технологии TaqMan. Для амплификации фрагментов геномной ДНК, содержащих изучаемые полиморфизмы, методом ПЦР-РВ использовались подобранные, как описано выше, праймеры, приведенные в таблице 4. Подбор TaqMan-

зондов, комплементарных полиморфному региону, производился с использованием программ Beacon Designer 7.0 и Primer3 [23]. Использовались флуоресцентные красители – FAM и HEX и гаситель флуоресценции BHQ1.

Список использованных флуоресцентных зондов (выделен нуклеотид, комплементарный соответствующему полиморфизму):

HA1-G: 5' – FAM-TGGCTCTCACCGTCACGCAACACA-BHQ1-3'

HA1-A: 5' – HEX-TGGCTCTCACCGTCATGCAACACA-BHQ1-3'

HA2-C: 5' – FAM-TGGTGTCCGTGAACCCCTAC-BHQ1-3'

HA2-T: 5' – HEX-TGGTGTCCATGAACCCCTAC-BHQ1-3'

ACC1-C: 5' – FAM-CTATCTGCAGTGCGTCCTACAGA-BHQ1-3'

ACC1-T: 5' – HEX-CTATCTGCAGTACGTCCTACAGA-BHQ1-3'

ACC2-C: 5' – FAM-AGTTTGAAGACGGCATCATTAACCTGG-BHQ1-3'

ACC2-T: 5' – HEX-AGTTTGAAGACGACATCATTAACCTGG-BHQ1-3'.

ПЦР-РВ проводили на приборе CFX96 (BioRad, США). В состав 25 мкл реакционной смеси входили 10 нг ДНК, по 400 нМ прямого и обратного праймеров, по 100 нМ каждого из двух зондов, qPCRmix-HS (Евроген, Россия), содержащий HSTaq ДНК-полимеразу, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg²⁺ и реакционный буфер. Каждый образец анализировался в трех повторностях. Цикл амплификации начинался с 60 сек при 50 °С, затем 300 сек – 95 °С, далее 40 циклов: 95 °С – 10 сек, 62,5 °С – 20 сек, 72 °С – 30 сек. Аллельная дискриминация ОНП производилась при помощи программного обеспечения BioRad CFXManager 3.1.

Метод ПВР. Для амплификации фрагментов геномной ДНК, содержащих изучаемые полиморфизмы, методом ПВР использовались праймеры (таблица 4), подобранные и проанализированные с использованием алгоритма программы Primer3 [23]. Размер амплифицируемого фрагмента составлял 80–100 пар нуклеотидов и включал в себя полиморфизм. Реакция ПЦР-РВ проводилась в смеси Precision Melt Supermix (Bio-Rad, США) при рекомендованных производителем условиях, после чего снималась кривая плавления полученного продукта. Кривые плавления были проанализированы при помощи программного обеспечения Precision Melt Analysis (Bio-Rad, США), присутствие аллельных вариантов в пробах определялось по кластеризации кривых плавления образцов с кривыми, полученными на контрольных матрицах.

Секвенирование по Сэнгеру

ПЦР-амплификация кодирующих MiHA участков проводилась Phusion High-Fidelity ДНК-полимеразой (Thermo Scientific, США).

Таблица 3. Длина фрагментов при типировании методом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов

МиНА	Аллель	Рестриктаза	Наличие сайта рестрикции	Длина фрагментов с учетом липких концов п. н.
HA1	A	FatI	+	85 и 54
	G		-	135
HA2	G		-	135
	A		+	100 и 39
ACC1	A	RsaI	+	47 и 69
	G		-	116
ACC2	A	SfaNI	-	126
	G		+	70 и 60

Таблица 4. Последовательности праймеров, использованных для генотипирования (в направлении 5'–3')

МиНА	Ал- лель	Прямой праймер	Обратный праймер	Фрагмент, п. н.	Метод
HA-1	H	CTTAAGGAGTGTGTGCTGCA <u>A</u>	ACTCCTACACATCCCTCAGA	190	АС-ПЦР
	R	CTTAAGGAGTGTGTGTTGC <u>G</u>			
	H, R	GTCGTCGAGGACATCTCCC	TCTGGCTCTGTCTTCCACC	135	TaqMan ПЦР, ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру
	H, R	GCTGAGGGCCTTGAGAAACT	CTTGGGTCTGGCTCTGTCTT	96	ПВР
HA-2	V	ACAGTCTCTGAGTGGCTCAG	GCTCCTGGTAGGGGTTCA <u>C</u>	271	АС-ПЦР
	M		GCTCCTGGTAGGGGTTCA <u>T</u>		
	V, M	CACAGCATAGAGATGGGGTG	CGCATCTACACCTACATCGG	135	TaqMan ПЦР, ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру
	V, M	AGGGGCAGCTCCTGGTAG	TGTGTCCAGGTTTCGAGAAGG	84	ПВР
ACC-1	Y	CATTGCCTCAACAGCTTCAAG	GGTTGTGGTATCTGTAGGGCG <u>T</u>	137	АС-ПЦР
	C		GGTTGTGGTATCTGTAGGGCG <u>C</u>		
	Y, C	CCACCAGGCAGAAGATGACA	GGACGTTTTGCTTGGACCTG	116	TaqMan ПЦР, ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру
	Y, C	AGCACTCTGGACGTTTTGCT	CAGGCTGGCTCAGGACTATC	81	ПВР
ACC-2	D	GATGGAAAAGGAGTTTGAAGGCG <u>A</u>	CAGCCTCCGTTTTGCCTTATC	197	АС-ПЦР
	G	GATGGAAAAGGAGTTTGAAGGCG <u>G</u>			
	D, G	CGTAGACACTGCCAGAACACTATT	CGTAGAAGTTTCTT GATGAGAATACCTTC	126	TaqMan ПЦР, ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру
	D, G	CCGTAGACACTGCCAGAACA	TGGTTACAATTCTTCCCCAGT	87	ПВР

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция, АС-ПЦР – аллель-специфичная полимеразная цепная реакция, ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов. Подчеркиванием отмечены аллель-специфичные нуклеотиды.

Плазмиды рJET и продукты ПЦР секвенировались в компании «Евроген» (Москва).

Для амплификации исследуемого фрагмента и его секвенирования применялись те же праймеры, что и для ПЦР-РВ. Для секвенирования плазмиды рJET применялись универсальные праймеры для этой плазмиды («Евроген», Россия): прямой праймер рJET – CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC, обратный праймер – AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG.

Результаты секвенирования анализировались с помощью программного обеспечения CLC Genomics Workbench (QIAGEN, Германия) и Geneious Pro (Biomatters, Новая Зеландия).

Результаты и обсуждение

Образцы ДНК от 10 доноров были протипированы с использованием 5 методов. Результаты АС-ПЦР (рис. 1), ПДРФ (рис. 2), ПЦР-РВ с использованием зондов TaqMan (рис. 3) и секвенирования по Сэнгеру совпали (табл. 5).

Секвенирование по Сэнгеру выступало в данном случае как контроль качества типирования. Полученные результаты говорят о надежности указанных методов. Выбор между ними зависит от области применения типирования по МиНА, которая, в свою очередь, определяет оптимальное сочетание временных и финансовых затрат, простоты и прочих параметров.

АС-ПЦР и ПДРФ – наиболее дешевые из всех описанных методов, однако они проигрывают по показателю затрачиваемого на анализ времени. В обоих случаях для получения конечного результата требуется разделение продуктов ПЦР при помощи электрофореза. АС-ПЦР осложняется тем, что на каждый образец требуется ставить 2 реакции. Кроме того, поскольку один из праймеров для АС-ПЦР строго привязан к полиморфизму, это осложняет подбор условий для унифицированного типирования одновременно большой панели МиНА. Этот метод обычно применяется для определения аллельных вариантов при исследовании отдельных МиНА, но не подходит для масштаб-

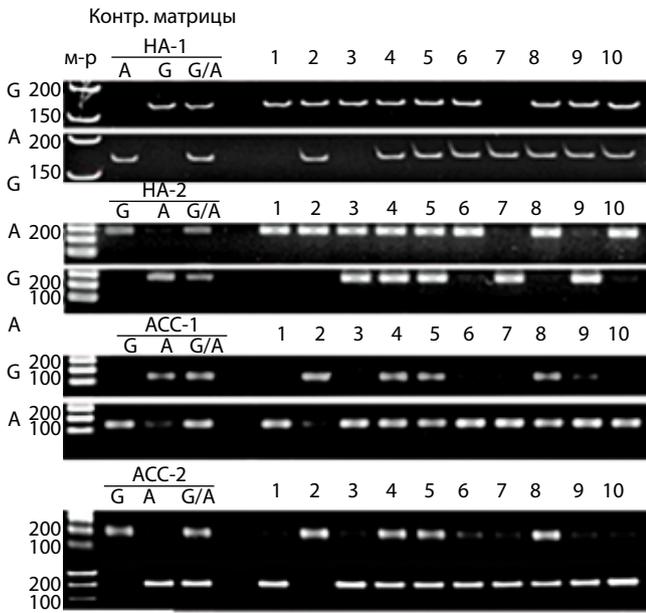


Рис. 1. Типирование образцов ДНК при помощи аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

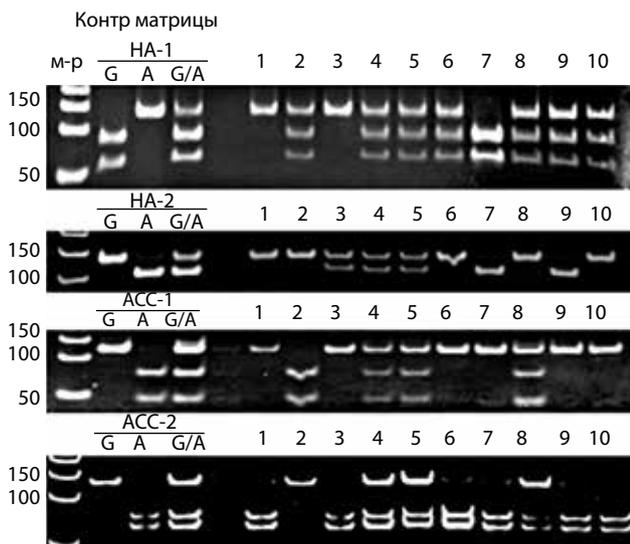


Рис. 2. Типирование образцов ДНК при помощи анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов

ного типирования, что потенциально востребовано в клинике.

ПДРФ помимо электрофоретического анализа включает еще одну дополнительную стадию – реакцию рестрикции. При типировании панелей MiNA возникает необходимость использования большого набора эндонуклеаз, что не только увеличивает время анализа, но и повышает вероятность ошибки. Кроме того, для эффективной работы некоторых рестриктаз может потребоваться этап очистки ДНК после амплификации и/или большее время инкубации. Необходимость электрофоретического анализа для АС-ПЦР и ПДРФ также создает угрозу контаминации рабочего пространства и реагентов продуктами ПЦР, особенно

при регулярном проведении типирования, что может послужить причиной ложно-положительных результатов.

Метод ПЦР-РВ с использованием флуоресцентных зондов TaqMan требует минимальных затрат по времени и позволяет получить результат типирования сразу после проведения ПЦР. После отработки условий этот метод возможно масштабировать для типирования большого числа доноров на целые панели MiNA. Ограничением является лишь относительно высокая стоимость реагентов.

Метод анализа кривых плавления показал надежные результаты только для 3 из 4 исследуемых MiNA: HA-2, ACC-1 и ACC-2. В случае HA-1 обработка результатов позволяет отличить только гомозиготные образцы от гетерозиготных (рис. 4). Для всех MiNA в изучаемом полиморфизме пара G/C в одном аллельном варианте заменяется на A/T в другом. Такие замены являются наиболее распространенными среди ОНП, и обычно разница в энергии связывания между ними позволяет детектировать изменения в кривых плавления.

Более редкие замены G/C на C/G и A/T на T/A определить гораздо труднее, и это не всегда удается. Для полиморфизма rs3764653, дающего начало антигену HA-1, ситуация осложняется еще и тем, что всего в 3 нуклеотидах от него находится сцепленный полиморфизм rs1801284, таким образом, замена G/C на A/T в rs3764653 всегда сопровождается заменой T/A на C/G в rs1801284, что не дает значительного изменения в энергии связывания. Тем не менее такой случай не относится к числу распространенных, и метод ПВР может применяться для типирования других MiNA. Это важно, поскольку по скорости анализа и простоте он практически не уступает ПЦР-РВ и при этом более экономически выгодный.

Заключение

Основное внимание при выборе оптимального метода следует уделить таким параметрам, как затрачиваемое на анализ время, стоимость анализа и возможность масштабирования для большого числа пациентов и изучаемых полиморфизмов. Экономически самые выгодные – АС-ПЦР и ПДРФ. Однако, если перед исследователем стоит задача массового и регулярного генотипирования больших объемов образцов, более перспективными представляются методы, не требующие дополнительных манипуляций после проведения ПЦР. Метод ПВР показал свою эффективность для 3 из 4 изучаемых полиморфизмов. Неприменимость ПВР для типирования HA-1 обусловлена особенностями строения участка ДНК, а именно наличием близлежащего сцепленного полиморфизма. Метод ПЦР-РВ сочетает в себе универсальность и быстроту получения результатов, ограничением для его применения является лишь его относительно высокая стоимость.

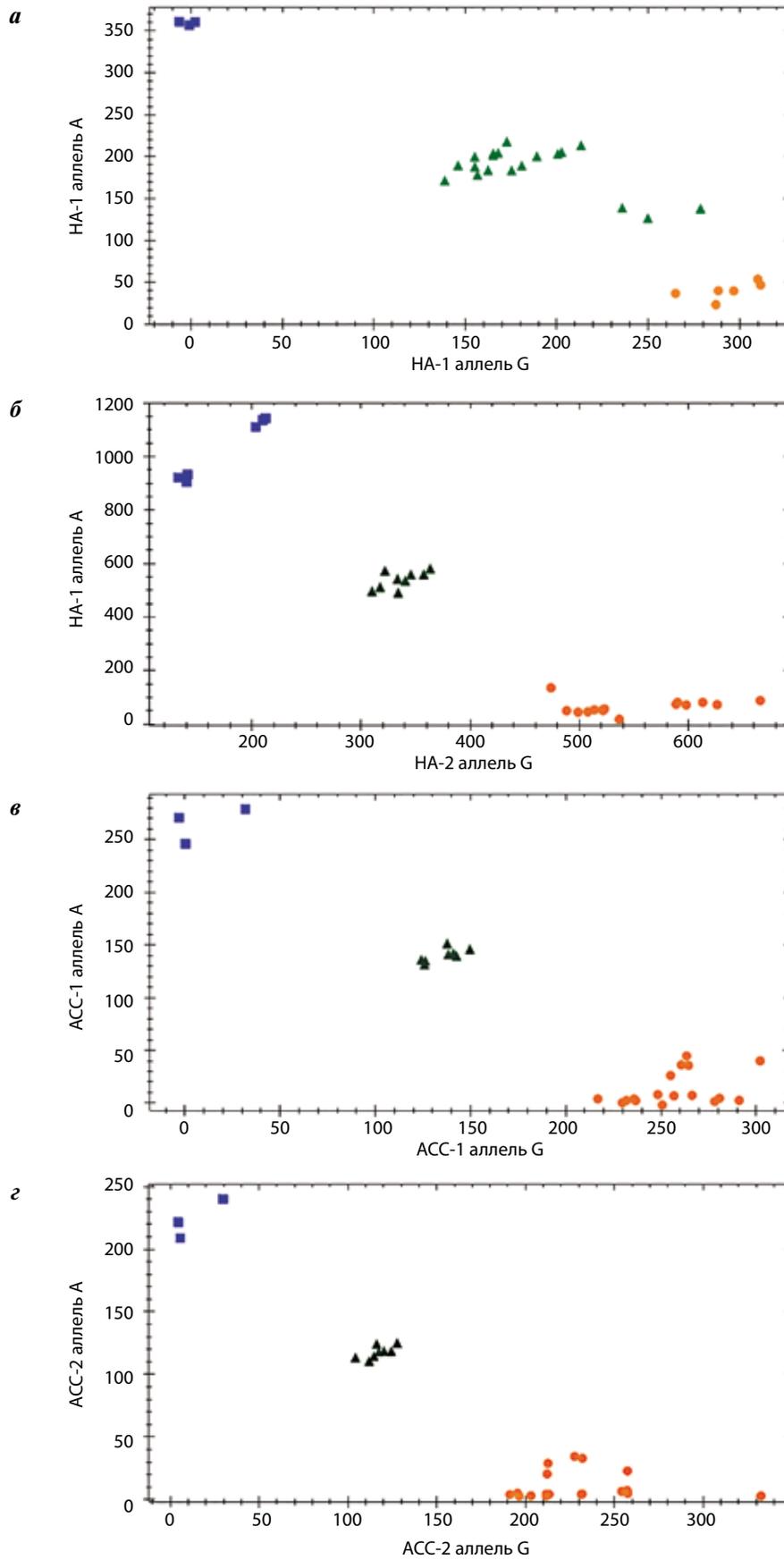


Рис. 3. Аллельная дискриминация образцов ДНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием зондов TaqMan: HA-1 (а), HA-2 (б), ACC-1 (в), ACC-2 (г). По осям X и Y отложена флуоресценция в каналах FAM и HEX. Различными значками обозначены кластеризующиеся по уровню флуоресценции образцы

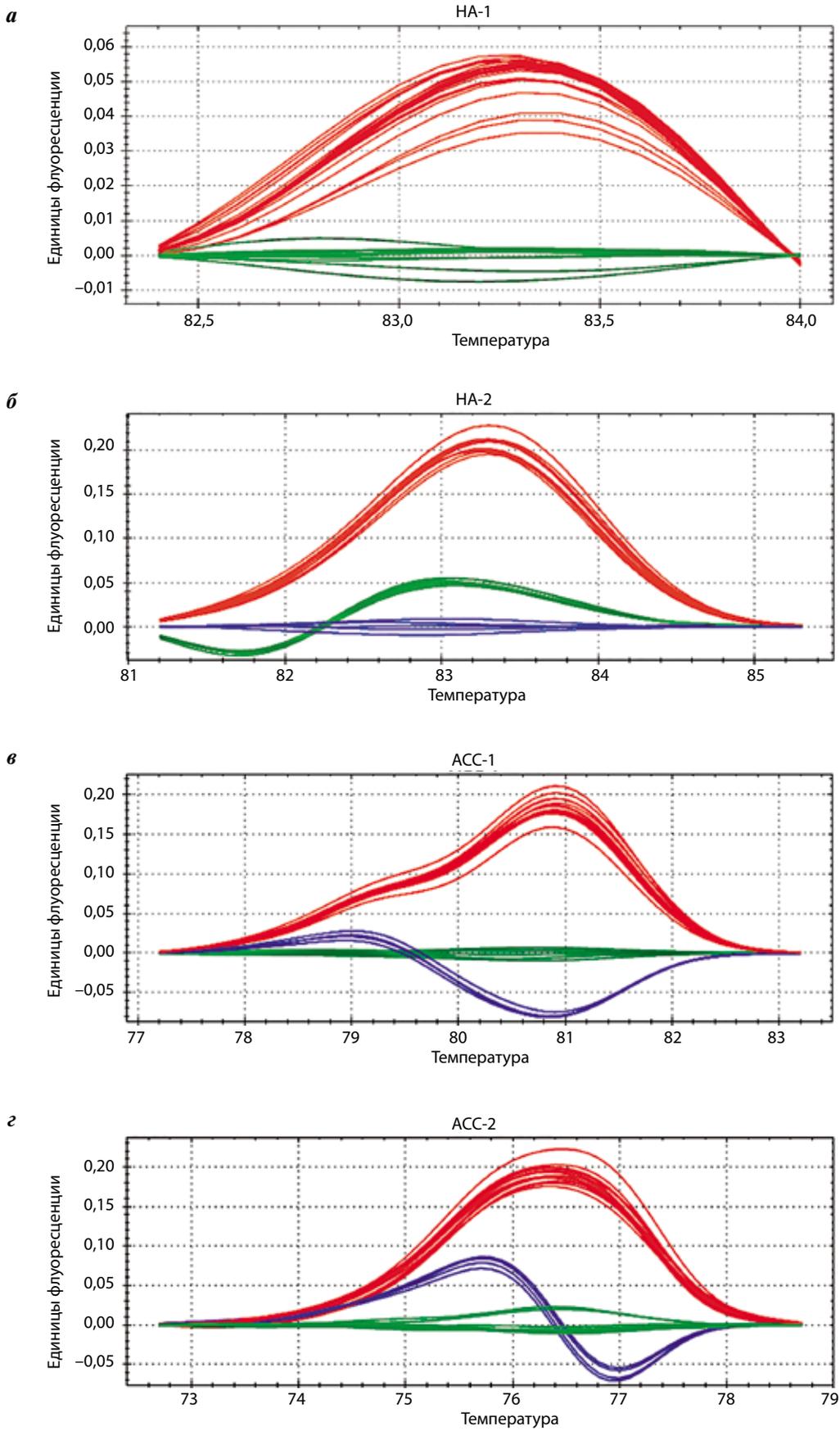


Рис. 4. Типирование образцов ДНК при помощи метода плавления в высоком разрешении: HA-1 (а), HA-2 (б), ACC-1 (в), ACC-2 (г). Приведены графики скорости изменения интенсивности флуоресценции от температуры. Различными цветами обозначены кластеризующиеся образцы

Таблица 5. Сводная таблица результатов типирования

Донор	MіNA	Метод типирования				
		АС-ПЦР	ПДРФ	ПВР	TaqMan	Секвенирование по Сэнгеру
1	HA-1	G/G	G/G	G/G или A/A	G/G	G/G
	HA-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-1	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
2	HA-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	HA-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-1	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
	ACC-2	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
3	HA-1	G/G	G/G	G/G или A/A	G/G	G/G
	HA-2	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	ACC-1	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
4	HA-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	HA-2	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	ACC-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	ACC-2	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
5	HA-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	HA-2	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	ACC-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	ACC-2	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
6	HA-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	HA-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-1	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
7	HA-1	A/A	A/A	G/G или A/A	A/A	A/A
	HA-2	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
	ACC-1	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
8	HA-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	HA-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	ACC-2	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
9	HA-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	HA-2	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
	ACC-1	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
10	HA-1	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
	HA-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-1	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	ACC-2	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Talmadge J.E. Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(8):1121–43. DOI: 10.1016/S1567–5769(03)00014–6; PMID: 12860168.
2. Marsh S.G. and WHO Nomenclature Committee for Factors of HLA System. System, nomenclature for factors of the HLA system, update December 2015. *HLA*, 2016;87(2):126–30 DOI: 10.1111/tan. 12745; PMID: 26889910.
3. Felix N.J., Allen P.M. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(12):942–53. DOI: 10.1038/nri2200; PMID: 18007679.
4. Goulmy E., Termijtelen A., Bradley B.A., van Rood J.J. Alloimmunity to human H-Y. *Lancet* 1976;2(7996):1206. PMID: 63036.
5. den Haan J.M., Sherman N.E., Blokland E. et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995;268(5216):1476–80. PMID: 7539551.
6. Ефимов Г.А., Вдовин А.С., Григорьев А.А. и др. Иммунобиология острой реакции «трансплантат против хозяина. Медицинская иммунология 2015;17(6):499–516. [Efimov G.A., Vdovin A.S., Grigoryev A.A. et al. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical immunology* 2015;17(6):499–516 (In Russ.)]. DOI:10.15789/1563-0625-2015-6-499-516.
7. Murata M., Warren E.H., Riddell S.R. A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med.* 2003;197(10): 1279–89. DOI: 10.1084/jem. 20030044; PMID: 12743171.
8. Griffioen M., van Bergen C.A., Falkenburg J.H. Autosomal minor histocompatibility antigens: how genetic variants create diversity in immune targets. *Front Immunol.* 2016;7:100. DOI: 10.3389/fimmu. 2016.00100; PMID: 27014279.
9. Быкова Н.А., Малько Д.Б., Вдовин А.С., Ефимов Г.А. In silico анализ иммуногенного потенциала однонуклеотидных полиморфизмов при полностью HLA-совместимой трансплантации. *Российский иммунологический журнал* 2016; 10(19)(1):39–49. [Bykova N.A., Malko D.B., Vdovin A.S., Efimov G.A. In silico analysis of single nucleotide polymorphism immunogenic potential in fully HLA-matched transplantation. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Immunology Journal* 2016; 10(19)(1): 39–49 (In Russ.)].
10. Granados D.P., Sriranganadane D., Daouda T. et al. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat Commun.* 2014;5:3600. DOI: 10.1038/ncomms4600; PMID: 24714562.
11. Li J.M., Giver C.R., Lu Y. et al. Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunotherapy* 2009;1(4): 599–621. DOI: 10.2217/imt. 09.32; PMID: 20191089.
12. Wilke M., Poo J., den Haan J.M., Goulmy E. Genomic identification of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus by allele-specific PCR. *Tissue Antigens* 1998;52(4):312–7. PMID: 9820596.
13. Wilke M., Pool J., Goulmy E. Allele specific PCR for the minor Histocompatibility antigen HA-2. *Tissue Antigens* 2002;59(4):304–7. PMID: 12135429.
14. Spierings E., Brickner A.G., Caldwell J.A. et al. The minor histocompatibility antigen HA-3 arises from differential proteasome-mediated cleavage of the lymphoid blast crisis(Lbc) oncoprotein. *Blood* 2003;102(2):621–9. DOI: 10.1182/blood-2003-01-0260; PMID: 12663445.
15. Simsek M., Adnan H. Effect of single mismatches at 3'-end of primers on polymerase chain reaction. *J Sci Res Med Sci* 2000;2(1):11–4. PMID: 24019700.
16. Spierings E., Drabbels J., Hendriks M. et al. A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications. *PLoS One* 2006;1: e42. DOI: 10.1371/journal. pone. 0000042; PMID: 17183671.
17. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350–4. PMID: 2999980.
18. Krypuy M., Newnham G.M., Thomas D.M. et al. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2006;6:295. DOI: 10.1186/1471-2407-6-295; PMID: 17184525.
19. Gundry C.N., Vandersteen J.G., Reed G.H. et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem.* 2003;49(3):396–406. PMID: 12600951.
20. Turpeinen H., Volin L., Partanen J. Domestic and foreign donor candidates result in differential probability of matching minor histocompatibility antigens—relevance of selection for hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2009;73(3):236–41. DOI: 10.1111/j. 1399–0039.2008.01210. x; PMID: 19254253.
21. Di Terlizzi S., Zino E., Mazzi B. et al. Therapeutic and diagnostic applications of minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 disparities in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey of different populations. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(1):95–101. DOI: 10.1016/j. bbmt. 2005.09.017; PMID: 16399573.
22. Ryazantsev D.Y., Rogozhin E.A., Dimitrieva T.V. et al. A novel hairpin-like antimicrobial peptide from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds: structure-functional and molecular-genetics characterization. *Biochimie* 2014;99:63–70. DOI: 10.1016/j. biochi. 2013.11.005; PMID: 24275143.
23. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40(15): e115. DOI: 10.1093/nar/gks596; PMID: 22730293.