

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia.

**Noves aproximacions per a l'estudi del sistema HLA:
De la tipificació dels loci HLA basada en la PCR a temps
real al desenvolupament de tetràmers de classe II**

Memòria de la Tesi presentada per a obtenir el grau de Doctor en Ciències
Biològiques per la Universitat Autònoma de Barcelona, Maig 2006

M^a Rosa Faner Canet



IIGTiP BST LIRAD

Crtra. del Canyet s/n,
08916 Badalona
tel. 34.93.497.86.66,
fax. 34.93.497.86.70
e-Mail Manel.Juan@uab.es



Universitat
Autònoma de
Barcelona

Departament de Biologia Cel·lular,
Fisiologia i Immunologia
Hospital Universitari
Germans Trias i Pujol,
Universitat Autònoma de
Barcelona

Lab. d'Immunobiologia per
Recerca i Aplicacions
Diagnòstiques (LIRAD)
Banc de Sang i Teixits (BST)

Manel Juan i Otero, Professor Associat d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i Metge Especialista en Immunologia al LIRAD,

Certifica:

Que la tesi titulada "*Noves aproximacions per a l'estudi del sistema HLA: De la tipificació dels loci HLA basada en la PCR a temps real al desenvolupament de tetràmers de classe II*" ha estat realitzada per M^a Rosa Faner Canet sota la seva direcció i considera que és apta per a ésser presentada i optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que en quedi constància signa la present certificació a Badalona 23 de Maig 2006.

Dr. Manel Juan i Otero

A la meva família i al Joan

ABREVIATURES

Ag	antigen
APC (<i>antigen presenting cell</i>)	cèl·lula presentadora d'antigen
ARMS	sistema d'amplificació refractari de mutació
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	albúmina sèrica bovina
CD	grup de diferenciació
°C	graus centígrads
CFSE	Carboxy Fluoresceina Succinimidyl Ester
CTL	limfòcits T citotòxics
CML	cultiu mixt limfocitari
DEPC	dietilpirocarbonat
DL	desequilibri de lligament
DMSO	dimetil sulfòxid
dNTPs	desoxinucleòtids
DO	densitat òptica
dsDNA	DNA de doble cadena
EBV	virus Epstein-Barr
-FITC	isotiocianat de fluoresceïna
FRET (<i>Fluorescent resonant emission transfer</i>)	Transferència fluorescent d'energia ressonant
gDNA	DNA genòmic
HLA	antigen d'histocompatibilitat leucocitari
HRP (<i>horseradish peroxidase</i>)	peroxidasa del rave
IL	interleucina
kDa	kilodalton
Mpb	mega parell de bases
MHC	complex major d'histocompatibilitat
xMHC	complex major d'histocompatibilitat extens
min	min
mM	milimolar
μM	micromolar
OR (odds ratio)	raó de probabilitat
OG	n-Octyl β-D-Glucopyranoside
pb	parell de base
PBLs (<i>peripheral blood lymphocytes</i>)	limfòcits de sang perifèrica
PBMCs (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)	cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PBS (<i>phosphat buffered saline</i>)	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PCR-SSP	PCR-cebadors específics de seqüència
PCR-SSO	PCR-oligosondes específiques de seqüència
PCR-SBT	PCR-tipificació basada en la seqüenciació
-PE (<i>phycoerythrin</i>)	ficoeritrina
-PerCP	proteïna clorofil·la peridina
PHA (<i>phytohemagglutinin</i>)	aglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
pMHC	complex MHC i pèptid
RE	reticle endoplasmàtic
RFLP (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)	polimorfisme de la llargada de restricció del fragment
RSCA	anàlisi de conformació mediat per cadena de referència
RR	risc relatiu
s	segons
SFB	sèrum fetal boví
SNP	polimorfisme d'un sol nucleòtid
SNE	extensió múltiple d'un sol nucleòtid
T.A	temperatura ambient
TBE	Tris-Borat-EDTA (tampó d'electroforesi)
TCR	receptor de limfòcit T
TGEM	mapatge d'epítops guiat per tetràmers

I	ÍNDEX.....	1
II	INTRODUCCIÓ.....	7
II.I	HLA - MHC: Conceptes Generals.....	8
II.I.1.1	Genètica del MHC	8
II.I.1.2	Loci i regions del MHC clàssic.....	9
II.I.1.2.1	Regió de classe I.....	9
II.I.1.2.2	Regió de classe II.....	10
II.I.1.2.3	Regió de classe III	12
II.I.1.3	Regions i extensió del xMHC.....	12
II.I.1.4	Evolució del MHC	13
II.I.1.5	Característiques gèniques del MHC (i xMHC).....	14
II.I.1.5.1	Desequilibri de lligament i haplotips.....	14
II.I.1.5.2	Paralogia	16
II.I.1.5.3	Polimorfisme	17
II.I.1.5.4	MHC i Selecció balancejadora.....	19
II.I.1.6	Nomenclatura dels al·lels HLA	20
II.I.1.7	Codominància	20
II.I.1.8	Al·lels nuls	21
II.II	TIPIFICACIÓ HLA.....	21
II.II.1	<i>TIPIFICACIÓ DEL POLIMORFISME DELS LOCI HLA</i>	<i>21</i>
II.II.1.1	Metodologies per a la tipificació de les molècules HLA expressades.....	22
II.II.1.1.1	Microlimfocitotoxicitat mediada per complement.....	22
II.II.1.1.2	Cultiu Mixt Limfocitari (CML).....	23
II.II.1.1.3	Tipificació mitjançant anticossos monoclonals	24
II.II.1.2	Detecció del polimorfisme en els gens HLA.....	24
II.II.1.2.1	PCR-SSO	25
II.II.1.2.2	PCR-SSP	28
II.II.1.2.3	PCR-SBT	30
II.II.1.2.4	Altres aproximacions clàssiques descrites.....	31
II.II.1.2.5	Limitacions i inconvenients comuns de les metodologies basades en la PCR	32
II.II.1.2.6	Noves metodologies descrites	32
II.II.2	<i>MHC I ASSOCIACIÓ AMB MALALTIA.....</i>	<i>33</i>
II.II.2.1	Malalties autoimmunitàries.....	34
II.II.2.1.1	HLA i malalties reumatològiques:.....	35
II.II.2.1.1.1	Artritis Reumatoide (AR):.....	35
II.II.2.1.1.2	Espondiloartropaties:	35
II.II.2.1.2	HLA i malalties renals:	36
II.II.2.1.3	HLA i malalties neurològiques:	37
II.II.2.1.3.1	Esclerosis Múltiple:.....	37
II.II.2.1.4	HLA i malalties endocrines:	37
II.II.2.1.4.1	Diabetis Mellitus tipus I (DM-I):.....	37
II.II.2.1.5	Malalties Autoimmunes de la Tiroide (Malaltia de Graves-Basedow, mixedema primària i tiroïditis de Hashimoto):.....	38
II.II.2.1.6	HLA i malalties digestives:	38
II.II.2.1.6.1	Malaltia celíaca:.....	38
II.II.2.1.6.2	Altres malalties digestives:.....	38
II.II.2.1.7	HLA i malalties dermatològiques:.....	39
II.II.2.1.8	HLA i malalties oculars:	39
II.II.2.1.9	HLA i malalties sistèmiques:	39
II.II.2.2	Malalties relacionades amb absència de molècules HLA:	41

II.II.2.3	Malalties no immunitàries relacionades amb gens ubicats dins el MHC però que no afecta les molècules HLA (no molècules presentadores d'antigen).....	42
II.II.2.4	Malalties infeccioses	42
II.II.3	<i>LA PCR A TEMPS REAL</i>	43
II.II.3.1	Fonaments i aplicacions	43
II.II.3.2	Detecció de fluorescència mitjançant la incorporació del fluorocrom Sybr Green I.	44
II.II.3.3	Detecció de fluorescència mitjançant sondes d'hibridació	45
II.II.3.3.1	Sondes d'hibridació i hidròlisi.....	45
II.II.3.3.2	Sondes d'hibridació.....	46
II.III	ESTRUCTURA I FUNCIÓ DE LES MOLÈCULES HLA.....	48
II.III.1.1	Molècules classe I	48
II.III.1.2	Les molècules d'HLA de classe II:.....	50
II.III.1.3	La zona d'unió a pèptid.....	51
II.III.2	<i>MULTÍMERS D'MHC</i>	53
II.III.2.1	Tetràmers de classe I.....	54
II.III.2.2	Tetràmers de classe II.....	55
II.III.2.3	Utilitats dels tetràmers.....	58
III	HIPÒTESI DE TREBALL.....	60
III.I	HIPÒTESI DE TREBALL	61
IV	OBJECTIUS	62
IV.I	OBJECTIU	63
IV.I.1	<i>Tipificació HLA (OBJECTIU GENERAL 1)</i>	63
IV.I.2	<i>Anàlisi de la funcionalitat de les molècules DRB3: Tetràmers d'HLA-DRB3 (OBJECTIU GENERAL 2)</i>	64
V	RESULTATS.....	65
V.I	CAPÍTOL I TIPIFICACIÓ HLA-B27.....	66
V.I.1	<i>1 Consideracions inicials al capítol I: Tipificació HLA-B27</i>	67
V.I.1.1	Per tant s'ha pretès dissenyar un sistema de tipificació d'HLA B27 basat en l'ús de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació Light Cycler FRET, centrant-se en la resolució dels següents punts:	67
V.I.2	<i>Resum (traducció adaptada del resum de l'article)</i>	69
V.I.3	<i>Article HLA-B27 (Human Immunology 65: 826-838)</i>	70
V.II	CAPÍTOL II TIPIFICACIÓ HLA-B	83
V.II.1	<i>Consideracions inicials al capítol II: Tipificació HLA-B</i>	84
V.II.1.1	Per tant en aquest capítol s'ha pretès dissenyar un sistema de tipificació de baixa-mitja resolució del locus HLA B basat en l'ús de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació FRET, centrant-se en la resolució dels següents punts:	84
V.II.2	<i>Resum (traducció adaptada del resum de l'article)</i>	86
V.II.2.1	Carta d'acceptació de l'article HLA-B.....	87
V.II.3	<i>Article HLA-B (Human Immunology, en premsa)</i>	88
V.III	CAPÍTOL III TIPIFICACIÓ HLA-DRB1	115
V.III.1	<i>Consideracions inicials al capítol III: Tipificació HLA-DRB1</i>	116
V.III.1.1	Per tant s'ha pretès dissenyar un sistema de tipificació d'HLA DRB1 basat en l'ús de la PCR a temps real amb sondes Taqman® centrant-se en la resolució dels següents punts:.....	116
V.III.2	<i>Resum (traducció adaptada del resum de l'article)</i>	118
V.IV	CAPÍTOL IV- ANNEX I TETRÀMERS DE DRB3	126
V.IV.1	<i>MATERIAL I MÈTODES TETRÀMERS DRB3</i>	127

V.IV.1.1	Preparació del DNA genòmic	127
V.IV.1.1.1	Càlcul de la concentració i de la puresa i integritat del DNA... ..	127
V.IV.1.2	PCR específica per a la identificació d'individus DRB3 positius: ..	128
V.IV.1.2.1	Electroforesi.....	129
V.IV.1.3	Tipificació d'alta resolució dels individus DRB3 positius:	129
V.IV.1.4	Aïllament de PBMCs dels individus de tipificació DRB3*0101 i DRB3*0202	129
V.IV.1.5	Obtenció de RNA total i retrotranscripció	129
V.IV.1.5.1	Càlcul de la concentració i de la puresa i integritat de l'RNA ..	130
V.IV.1.5.2	Retrotranscripció	130
V.IV.1.6	PCR genèrica dels loci DRB.....	131
V.IV.1.6.1	Electroforesi.....	131
V.IV.1.7	Clonació i transformació.....	132
V.IV.1.7.1	Cribatge de les colònies	132
V.IV.1.7.2	Creixement de les colònies i extracció del DNA plasmídic	133
V.IV.1.7.3	Quantificació del DNA plasmídic	133
V.IV.1.7.4	Seqüenciació de l'amplímer	134
V.IV.1.7.5	Anàlisi de la seqüència de l'amplímer.....	134
V.IV.1.8	Subclonació dels fragments de les cadenes DRB3*0101 i DRB3*0202 dins del vector pRmHa-3:	134
V.IV.1.8.1	Reacció de lligació	135
V.IV.1.8.2	Creixement de les colònies i extracció del DNA plasmídic	135
V.IV.1.8.3	Quantificació del DNA plasmídic	135
V.IV.1.8.4	Seqüenciació de l'amplímer	135
V.IV.1.8.5	Anàlisi de la seqüència de l'amplímer.....	136
V.IV.1.9	Maxipreparació plasmídica i purificació amb clorur de cesi	136
V.IV.1.10	Transfecció estable de les cèl·lules S2	138
V.IV.1.11	Expansió de les cèl·lules S2 transfectants i inducció de producció de monòmer	139
V.IV.1.12	Western o dot blot per avaluar la producció de monòmer en les cèl·lules S2.	139
V.IV.1.13	Clonació de cèl·lules S2 productores de monòmer.....	140
V.IV.1.13.1	Cribatge de les clones productores de monòmer.....	141
V.IV.1.14	Producció de monòmer.....	141
V.IV.1.14.1	Expansió de les clones.....	141
V.IV.1.14.2	Elaboració de la columna d'afinitat	141
V.IV.1.14.3	Purificació del monòmer	142
V.IV.1.14.4	Quantificació de l'eluit.....	143
V.IV.1.14.5	Concentració de l'eluit	143
V.IV.1.14.6	Diàlisis de l'eluit	143
V.IV.1.15	Càrrega del monòmer amb el pèptid.....	144
V.IV.1.16	TGEM (<i>Tetramer guided epitope mapping</i>): Obtenció i estimulació de limfòcits T CD4+ amb pèptids.....	144
V.IV.1.17	Anàlisi per citometria.....	145
V.IV.1.18	Obtenció de clones de limfòcits T CD4+ específiques per al tetràmer	145
V.IV.1.19	Cribatge de les clones T CD4+ obtingudes	146
V.IV.1.20	Producció de línies limfoblàstiques transformades amb el virus d'Epstein Barr	146
V.IV.1.21	Assajos de proliferació de limfòcits T CD4 antígen-específics monitoritzats amb CFSE.....	147

V.IV.1.22	Anàlisi dels pèptids antigènics trobats i el seu ancoratge en els diferents motius d'unió dels al·lèls de DR.....	148
V.IV.2	RESULTATS CAPÍTOL IV-ANNEX I.....	149
V.IV.2.1	Detecció, amplificació i clonació dels al·lèls DRB3*0101 i DRB3*0202	149
V.IV.2.2	Producció de Tetràmers de DRB3 en cèl·lules de <i>Drosophila melanogaster</i> S2	150
V.IV.2.3	Anàlisi de l'existència de pèptids antigènics a la toxina tetànica que puguin ser presentats i reconeguts en el context de DRB3*0101	152
V.IV.2.4	Anàlisi de la freqüència de precursors T CD4+ específics per TT 102 en sang perifèrica un mes post-vacuna de la toxina tetànica:.....	154
V.IV.2.5	Anàlisi de l'existència de pèptids antigènics a la toxina tetànica que puguin ser presentats i reconeguts en el context de DRB3*0202.....	155
V.IV.2.6	Anàlisi de l'existència de pèptids antigènics al virus de la grip que són presentats i reconeguts en el context de DRB3*0202.....	156
V.IV.2.6.1	Hemaglutinina H1N1	157
V.IV.2.6.2	Proteïna de la matriu H1N1	158
V.IV.2.6.3	Nucleoproteïna	159
V.IV.2.6.4	Valoració de la resposta a l'hemaglutinina del virus Influenza A de la soca /Panama/2007/99 (H3N2)	161
V.IV.2.7	Anàlisi de la freqüència de precursors T CD4+ específics pels pèptids antigènics de la proteïna de la matriu 42-43 i 51 en sang perifèrica	162
V.IV.2.8	Anàlisi de l'existència de pèptids antigènics al virus de la grip que són presentats i reconeguts en el context de DRB3*0101.....	163
V.IV.2.9	Correspondència dels pèptids antigènics identificats amb els motius d'unió descrits	164
V.IV.2.9.1	DRB3*0202.....	164
V.IV.2.9.2	DRB3*0101	165
VI	DISCUSIÓ GENERAL	167
	DISCUSIÓ GENERAL.....	168
VII	Millores en les metodologies per a la tipificació dels loci HLA	168
VII.1	<i>Comparació de la utilització de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació respecte a les metodologies de tipificació convencionals basades en la PCR.....</i>	<i>168</i>
VII.1.1	Reducció del nombre de reaccions de PCR a realitzar i de sondes a híbrida	169
VII.1.2	Reducció de la durada de la tècnica i dels passos a realitzar	169
VII.1.3	Capacitat de mostres a processar.....	170
VII.1.4	Confusions heterozigotes.....	171
VII.1.5	Aplicacions.....	171
VII.1.6	Reproduïbilitat	172
VII.1.7	Millores futures que permeten els sistemes de tipificació desenvolupats.....	173
VII.1.8	Cost comparatiu de la tècnica	173
VII.1.9	Possibilitats d'automatització	174
VII.2	<i>Comparació dels dos sistemes de PCR a temps real utilitzats.....</i>	<i>174</i>
VII.2.1	En quant a la capacitat discriminativa dels polimorfismes dels diferents tipus de sondes utilitzades.....	174
VII.2.2	En quant al nombre de reaccions a realitzar per a obtenir una resolució determinada	175
VII.2.3	En quant a les característiques de ciclat i optimització de les reaccions	175

VII.I.2.4	Versatilitat de les reaccions en diferents equips.....	176
VI.II	Millores en les metodologies d'anàlisi de la funcionalitat de les molècules HLA.....	177
VII.II.1	Producció de tetràmers de DRB3.....	177
VII.II.2	Nivells de producció.....	178
VII.II.3	Resposta de limfòcits T CD 4+ en el context de DRB3.....	178
VII.II.4	Diversitat en el motius d'unió DRB3 respecte als DRB1 del seu haplotip associat	179
VII.II.4.1	DRB1*1101-DRB3*0202.....	180
VII.II.4.2	DRB3*0101-DRB1*1301-DRB1*0301.....	181
VII	CONCLUSIONS GENERALS.....	184
VII.I	CONCLUSIONS GENERALS.....	185
VII.I.1	Tipificació HLA per PCR a temps real.....	185
VII.I.2	Anàlisi de la funcionalitat de les molècules DRB3 utilitzant tetràmers.....	186
VIII	BIBLIOGRAFIA.....	187
VIII.I.1	BIBLIOGRAFIA.....	188
IX	APÈNDIX I - PATENTS.....	203
IX.I	Patent HLA-B27.....	205
IX.II	Patent HLA-B.....	207
IX.III	Patent HLA-DRB1.....	209

II INTRODUCCIÓ

II.I HLA - MHC: Conceptes Generals

Les sigles HLA provenen de les paraules angleses *Human Leukocyte Antigen* (antigen leucocitari humà); amb aquest nom tant genèric es coneixen les glicoproteïnes de membrana que són responsables de la presentació antigènica als limfòcits T. Aquesta funció de presentació antigènica porta com a conseqüència que siguin responsables de la histocompatibilitat, fet gràcies al qual les molècules HLA van ser descobertes el 1952: Jean Dausset [Dausset, 1952] va observar que els individus que havien rebut diverses transfusions de persones no relacionades familiarment amb ells desenvolupaven anticossos contra els leucòcits del donant. A causa de la rellevància clínica que tenen els fenòmens de rebuig de teixits en els trasplantaments, des d'aleshores s'han fet molts esforços per a trobar, caracteritzar i estudiar els gens que codifiquen pels antigens d'histocompatibilitat.

II.I.1.1 Genètica del MHC

Els gens que codifiquen les diverses molècules presentadores d'antigen (HLA en humans) es localitzen conjuntament en un complex genètic que s'anomena complex principal o major d'histocompatibilitat (*Major Histocompatibility Complex*, MHC); en humans alguns l'anomenen també regió genètica HLA, tot i que l'ús d'aquest terme hauria de restringir-se a anomenar les glicoproteïnes presentadores que codifiquen aquests gens. Aquesta agrupació dels gens de les molècules presentadores d'antigen es manté en totes les espècies de vertebrats mandibulats (gnatostomats) estudiats fins ara [van Erp, et al., 1996, Kasahara, et al., 1995, Flajnik, et al., 1999]. En humans, el MHC se situa al braç curt del cromosoma 6, i tradicionalment s'ha considerat que comprèn uns 3,6 Mpb de DNA.

En la darrera dècada, amb l'arribada de la seqüenciació automàtica, ha anat millorant el coneixement del MHC tant a nivell de seqüència com dels loci que el componen. En aquest sentit, una de les primeres fites fou l'obtenció l'any 1999 del primer mapa genètic del MHC basat en seqüència, resultat dels esforços del *MHC Sequencing Consortium* [1999]. El pas definitiu va ser l'obtenció el 2003 de la seqüència completa de tot el cromosoma 6 [Mungall, et al., 2003]. Gràcies a aquests treballs es va definir que la regió del MHC: 1) conté 224 loci, dels quals un 58% són expressats; 2) té una densitat

gènica global d'un gen cada 16 Kb; i 3) una gran part dels seus loci tenen una funció immunològica principalment relacionada amb el processament i presentació d'antígens.

Estudis on es quantificava el grau de recombinació i de desequilibri de lligament en el cromosoma 6 [Malfroy, et al., 1997] havien posat de manifest que les zones adjacents al MHC hi mantenien un fort desequilibri de lligament (DL). Alhora, en ratolins, s'havia observat la co-duplicació de la regió MHC de classe I juntament amb una regió més telomèrica que conté un *cluster* de receptors olfactoris [Amadou, et al., 2003]. Aquestes observacions van fer que es revisés el concepte del MHC i es definís l'anomenat MHC extens (xMHC), com una regió del braç curt del cromosoma 6 que inclou el MHC clàssic i s'estén 2 Mpb més en direcció centromèrica i 2 Mpb en direcció telomèrica; comprenen així un total de 7,6 Mpb.

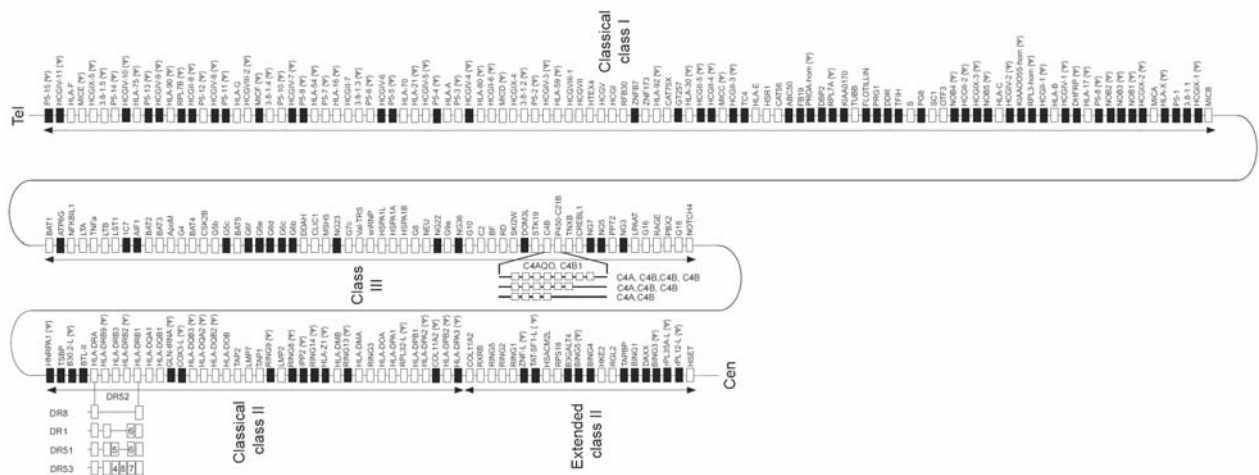


Figura 1: Mapa del MHC clàssic [extret de [1999]].

II.I.1.2 Loci i regions del MHC clàssic

Pel que fa a l'extensió gènica del MHC clàssic, es considera dividida en tres grans regions: classe I, classe II i classe III.

II.I.1.2.1 Regió de classe I

La regió de classe I és la més telomèrica; s'estén 1,8 Mpb i conté els loci que codifiquen per la cadena α de les tres molècules de classe I principals: HLA-A, HLA-B i HLA-C. Aquestes molècules s'expressen en gairebé tots els tipus cel·lulars (els eritròcits són l'excepció més notable) i presenten a les cèl·lules T CD8+ pèptids que provenen de

patògens intracel·lulars (pe. virus que han infectat les cèl·lules). A part d'estar formades per la cadena α , ho estan també per la β 2-microglobulina, molècula que s'hi associa de manera no covalent. El gen que codifica la β 2-microglobulina es troba fora del MHC (en humans al cromosoma 15).

A la regió de classe I, a banda de les molècules clàssiques (A, B, C) hi ha altres loci funcionals, com són els que codifiquen per les molècules HLA-E, HLA-F i HLA-G [Geraghty, 1993]. Aquestes són part de les considerades molècules d'HLA classe I no clàssiques, i són molt menys polimòrfiques, alhora que tenen una expressió més restringida de teixit. També es localitzen en aquesta regió els loci que codifiquen per les molècules MICA i MICB, que no són molècules de classe I però mantenen amb elles una certa homologia en quant a seqüència; són les anomenades molècules relacionades amb classe I (*MHC-class I chain-related = MIC*).

A més de loci funcionals, la regió de classe I també conté un gran nombre de pseudogens i de gens fragmentats (o truncats) d'HLA de classe I (per exemple: *HLA-X*, *-17*, *-30*, *-Ly92*, *-Jy59*, *-80*, *-21*, *-Ky70*, *-16*, *-Hy54*, *-90* i *-75*) [Geraghty, et al., 1992], i també pseudogens de les MIC (*MICC*, *MICD*, i *MICE*) [Bahram, et al., 1994] (figura 1).

II.1.1.2.2 Regió de classe II

La regió de classe II es troba en la situació més centromèrica del MHC i s'estén 800 Kpb. En aquesta regió trobem els loci codificants de les molècules HLA de classe II: en humans les principals són HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP. Aquestes molècules s'expressen a la membrana de les cèl·lules presentadores d'antígens (*Antigen Presenting Cells*, APC) i presenten pèptids que provenen de patògens extracel·lulars (pe. bacteris fagocitats) a les cèl·lules T CD4+. Totes les molècules de classe II estan formades per una cadena α i una cadena β , i els gens que codifiquen per ambdues cadenes es troben a la regió de classe II: es designen amb el nom del loci seguit de "A" o "B" en funció de respectivament la cadena " α " o " β " que codifiquen (per exemple: DRA i DRB).

En aquesta regió també hi ha pseudogens de les molècules de classe II (per exemple: DQA2, DQB2, DQB3).

Un cas particular és el de la cadena β de la molècula DRB, ja que pot estar codificada per diferents loci paral·lels: alguns són funcionals i altres són pseudogens. Els diferents loci que codifiquen per a cadenes β de DRB s'indiquen amb nombres. Els loci de DRB1

i el del pseudogèn DRB9 es troben en tots els individus. Ara bé, segons l'al·lel de DRB1 que tingui un individu podem trobar diferents pseudogens i gens paràlegs de DRB [Andersson, et al., 1987, Gorski, et al., 1987], tal i com es detalla a la figura 2. Totes les diferents cadenes β de DRB (β 1, β 3, β 4 i β 5) es combinen amb la mateixa cadena de DRA, per formar diferents molècules de DRB (DRB1, DRB3, DRB4, DRB5) que poden expressar-se a la superfície cel·lular.

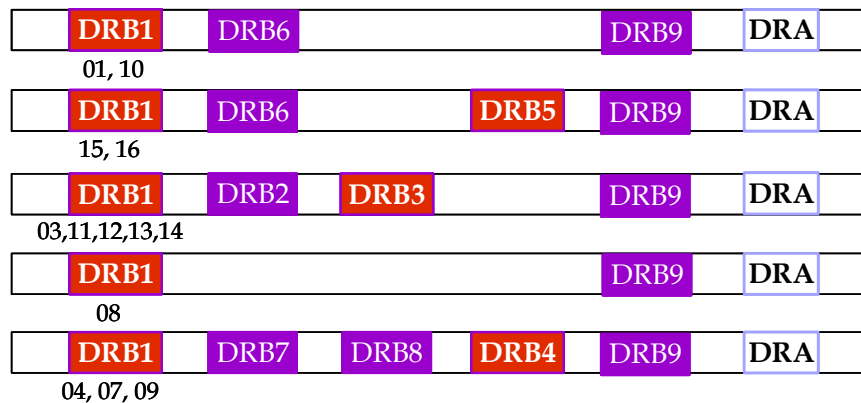


Figura 2. Distribució de gens paràlegs de DRB. Sota cada regió s'indiquen els al·lells DRB1 que especifiquen aquests gens.

En la regió de classe II també trobem els loci d'un grup de gens que codifiquen proteïnes necessàries per a la presentació d'antígens, alguns via classe I i altres via classe II.

Respecte als loci que dins de la regió de classe II codifiquen per a molècules relacionades amb la presentació d'antígens via classe I, cal destacar els productes gènics dels diversos loci de TAP (1, 2) i de LMP (2, 7). Les molècules TAP són transportadors de membrana, i estan associades amb la presentació d'antígens, ja que formen un complex a la membrana del reticle endoplasmàtic (RE) que transloca pèptids des del citoplasma cap al lumen del RE, per a que puguin ésser presentats via classe I. Els productes de LMP formen part del proteasoma, un complex implicat en la digestió proteolítica d'un elevat nombre de proteïnes citoplasmàtiques.

En relació als loci que dins de la regió de classe I codifiquen per a molècules relacionades amb la presentació d'antígens via classe II, trobem els loci DOA, DOB, DMA i DMB, que codifiquen les molècules HLA-DM i HLA-DO. Aquestes s'anomenen molècules no clàssiques de classe II i intervenen en el trànsit intracel·lular i en la

càrrega de pèptids a les molècules de classe II [LeibundGut-Landmann, et al., 2004, Reith, et al., 2001, Ting, et al., 2002].

II.I.1.2.3 Regió de classe III

La regió de classe III es troba entre de les dues anteriors i s'estén 730 Kb. Hi trobem loci que codifiquen per funcions ben diverses, des de components del sistema del complement (C2, C4 i factor Bf) fins a gens com el del *Tumor Necrosis Factor* (TNF) i les limfotoxines α i β [Dunham, et al., 1987]. S'ha vist que aquesta regió és la que té una densitat gènica més elevada de tot el genoma humà amb una total de 62 gens expressats [Stewart, et al., 2004]. Tanmateix però, a diferència del que succeeix en les regions de classe I i II, en ella no hi trobem loci que codifiquin per molècules presentadores d'antigen.

II.I.1.3 Regions i extensió del xMHC

El MHC extens (xMHC) conté 421 loci, dels quals 252 (60%) són considerats com expressats, 30 (7%) són considerats productors potencials de transcrits ja que s'han trobat EST (*Expressed Sequence Tags*) però no tenen un ORF (*Open Reading Frame*) definit i 139 (33%) són considerats com a pseudogens [Horton, et al., 2004].

Quan es fa referència a l'organització gènica del xMHC es parla dels *superclusters* i *clusters*¹ de gens:

- Sis grans *superclusters*: Histones, HLA classe I, tRNAs, *Butyrophilin*, receptors olfactoris i proteïnes *Zinc finger*.
- Sis *clusters*: HLA classe II, proteïnes de Transport de Solut, receptors vomeronasals, TNF, antigens Limfocitaris 6 i proteïnes *Heat shock*.

A primer cop d'ull ja es veu que, per la diversitat de *clusters* que conté, molts dels gens que hi ha al xMHC no tenen funció immunològica. Així, per explicar el desequilibri de

¹Entenent com a *cluster* tres o més gens/pseudogens paràlegs que es troben en una regió compresa en 1 Mpb; i com a *superclusters* els *clusters* amb gens relacionats addicionals fora del centre del cluster (de 1 Mpb) però dins dels xMHC [Horton, et al., 2004].

l·ligament que mantenen aquests gens amb els loci clàssics del MHC, s'ha proposat que alguns *clusters* (ex: histones i tRNAs) es trobarien en aquesta posició privilegiada per aprofitar l'elevada taxa de transcripció del MHC [Mungall, et al., 2003]. D'altra banda, també és plausible que sigui el MHC qui es beneficiï del l·ligament amb aquests *clusters* (de proteïnes vitals per a la cèl·lula).

II.I.1.4 Evolució del MHC

Com ja hem dit, la presència d'una regió que agrupa els diferents loci que codifiquen per a les molècules d'histocompatibilitat (MHC) és una característica present en tots els vertebrats mandibulats, o almenys s'ha trobat en totes les espècies estudiades fins al moment. A través de la comparació de la seqüència del MHC de diverses espècies de vertebrats s'ha elaborat una representació hipotètica de com hauria estat la regió MHC de l'ancestre comú dels vertebrats gnostomats. El seu contingut gènic seria el d'una classe I, II i III molt reduïdes tal i com es mostra a la figura 3. Cal dir però que estudis en el Cefalocordat *Ampiox*, han demostrat ja en aquesta espècie la presència d'una regió proto-MHC que conté gens ortòlegs a alguns gens humans de classe III. S'ha postulat doncs que aquest proto-MHC seria la regió precursora del MHC de l'ancestre comú a tots els vertebrats gnostomats [Danchin, et al., 2004, Castro, et al., 2004].

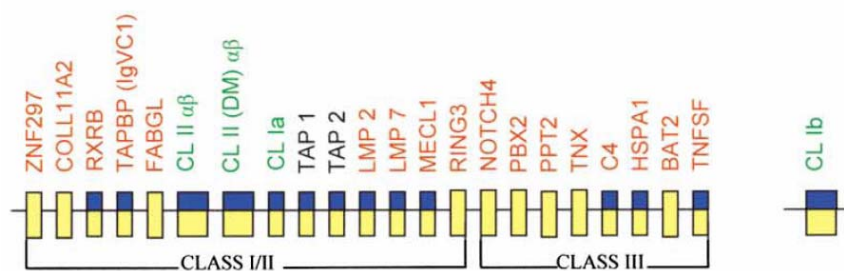


Figura 3, representació hipotètica de com hauria estat la regió MHC de l'ancestre dels vertebrats gnostomats (extret de [Flajnik, et al., 2001]).

D'altra banda, els estudis comparatius del MHC de diversos vertebrats [Kelley, et al., 2005, Amadou, 1999, Hughes, et al., 1989, Hurt, et al., 2004, Kumanovics, et al., 2003, Yeager, et al., 1997] han mostrat que el nombre de gens que formen aquesta regió varia en gran mesura entre les diferents espècies, igual com varia també la disposició

física dels loci. És possible afirmar, doncs, que l'MHC és una regió molt dinàmica on la ràpida evolució a partir d'un ancestre comú d'espècies relacionades [Kulski, et al., 2002, Shiina, et al., 1999, Watkins, 1995] s'aconsegueix mitjançant mecanismes de duplicació i polimorfisme. Per explicar-la, es pot suposar l'actuació de pressions evolutives degudes a diferents paràsits i infeccions, específics de cada espècie [Hurt, et al., 2004, Vogel, et al., 1999].

En relació a les pèrdues i guanys de loci entre diferents espècies, cal dir que quan es perden loci, generalment n'apareixen d'altres per compensar la seva falta i que acaben assumint una funció addicional. Un bon exemple d'això és el cas dels felins, on s'ha perdut la regió DQ però s'observa una extensió de la regió DR. Fins i tot, en alguns casos es poden veure diferències en nombre de loci dins del mateix gènere [Cadavid, et al., 1997], cosa que torna a ser una bona mostra del dinamisme d'aquesta regió.

II.I.1.5 Característiques gèniques del MHC (i xMHC)

Una regió tant important (degut als gens que conté) com és el MHC, té unes característiques gèniques determinades que podem dir que la diferencien de la resta del genoma i que són fonamentals per tal de garantir la funció de les molècules MHC.

De manera genèrica, aquestes característiques són: 1) el fort desequilibri de lligament que fa que aquests gens s'heretin en haplotips, 2) la paralogia, i 3) el seu elevat polimorfisme.

II.I.1.5.1 Desequilibri de lligament i haplotips

Des dels inicis de la utilització de les tècniques de tipificació² es va observar que en una població determinada alguns al·lels HLA (tant de classe I com de classe II) eren més freqüents que d'altres; també es va veure que en poblacions diferents no eren els mateixos els al·lels predominants. Alhora s'observà que alguns d'aquests al·lels més freqüents es presentaven habitualment junts; per tant s'observaven associacions de determinats al·lels HLA que no eren degudes l'atzar. Avui en dia se sap que aquestes

² Identificació de quines variants de les molècules HLA té un individu.

associacions són degudes al fort desequilibri de lligament³ (DL) que hi ha entre els loci HLA, que fa que s'heretin aquests gens en blocs o haplotips.

El mapa de DL del MHC [Miretti, et al., 2005] del que disposem avui en dia s'ha fet amb una resolució de 1,9Kb entre SNPs. En ell s'observa que no en totes les seves regions tenen la mateixa quantitat de DL. En total s'han trobat 202 blocs d'haplotips al MHC que abasten el 81,95% de la seva extensió. S'ha calculat que la taxa de recombinació mitjana de la regió del MHC és de 0,66714 cM/Mb [Cullen, et al., 2002], per tant és més baixa que la mitjana del genoma que és de 0,81 cM/Mb [Kong, et al., 2002] o $\approx 1\text{cM/Mb}$ [Altshuler, et al., 2005].

La part més telomèrica de la regió de classe I juntament amb el *cluster* de receptors olfactoris representa la regió més llarga en DL que s'ha trobat al genoma: s'estén unes 540 Kb [Younger, et al., 2001] i té una taxa de recombinació mitjana força baixa de 0,195 cM/Mb.

La regió de classe I clàssica, té blocs d'haplotips llargs, però en les zones que voregen HLA-A, HLA-B, HLA-C i MICA el patró de DL es trenca i els blocs són més curts. La taxa de recombinació mitjana d'aquesta regió és de 0,443 cM/Mb.

En quant a la zona de classe II, s'ha vist que els blocs d'haplotips són més curts. Aquest fet es troba en concordança amb la seva taxa de recombinació més alta: 1,712 cM/Mb. Alhora s'ha vist que aquesta regió conté diversos *hot-spots* de recombinació [Cullen, et al., 1995, Cullen, et al., 1997, Cullen, et al., 2002, Jeffreys, et al., 2001, Jeffreys, et al., 2004]: els principals són dos i es troben en la porció més centromèrica de classe II: el més fort es troba entre HLA-DOA i HLA-DPA1 i l'altre entre HLA-DPB1 i HLA-DPB2.

³ **Desequilibri de lligament:** Es defineix com a desequilibri de lligament (DL) a l'associació al·lèlica que s'observa en una determinada regió genètica, i que fa que les freqüències dels al·lèls a la població no siguin les esperades de trobar si els al·lèls estiguessin seguint l'equilibri Hardy-Weinberg.

Per tal de poder quantificar el DL s'utilitza D' , que és el la diferència de la freqüència d'un al·lèl a la població respecte a la freqüència que tindria si les freqüències estiguessin en equilibri. Tot i això aquesta mesura de desviació respecte l'equilibri també té en compte la recombinació $D'=D(1-r)$. D' és una mesura normalitzada de l'associació al·lèlica, però degut a que els valors de D' fluctuen quan es mira un nombre petit de mostres o bé al·lèls rars; en la majoria del estudis que s'han fet [Gabriel, et al., 2002] és valoren rangs de D' per tal de classificar el desequilibri de lligament.

El mapa de desequilibri de lligament del MHC s'ha fet basant-se en els valors de D' entre SNPs **informatius**. Es consideren SNPs informatius aquells amb una freqüència al·lèlica superior a 0,2 i que entren en un dels rangs de DL.

Cal definir també com a **bloc haplotípic**, una regió genètica on una proporció molt petita (<5%) de SNPs informatius mostren una forta evidència de recombinació històrica.

Un **hot spot de recombinació** es defineix com a un lloc on la recombinació és més elevada a la mitjana de la regió genètica que l'envolta (o del genoma), i un **cold spot** allà on és més baixa. En el cas del MHC en aquests punts és on es trenquen els blocs haplotípics, degut a l'augment a la taxa de recombinació i per tant presenten una disminució del DL.

II.I.1.5.2 Paralogia

Se sap que el fenomen de la duplicació gènica que dona lloc a diverses còpies d'un gen en una espècie determinada és un mecanisme d'evolució del genoma⁴ [Mazet, et al., 2002, Ohno, et al., 1968]. Però a part de duplicacions gèniques pot ser que en el genoma trobem grups de gens duplicats junts i lligats, distribuïts en més d'un cromosoma. Aquest fet s'anomena paralogia genòmica i als segments duplicats se'ls anomena regions paràlogues.

Al MHC trobem les dues formes de paralogia: a) s'han trobat tres regions paràlogues del MHC als cromosomes 1, 9, 19 [Katsanis, et al., 1996, Mazet, et al., 2002, Kasahara, 1999, Abi Rached, et al., 1999], on la regió més conservada és la de classe III, b) alhora es troben dins del propi MHC i també en diferents punts del genoma, diversos gens paràlegs als del MHC.

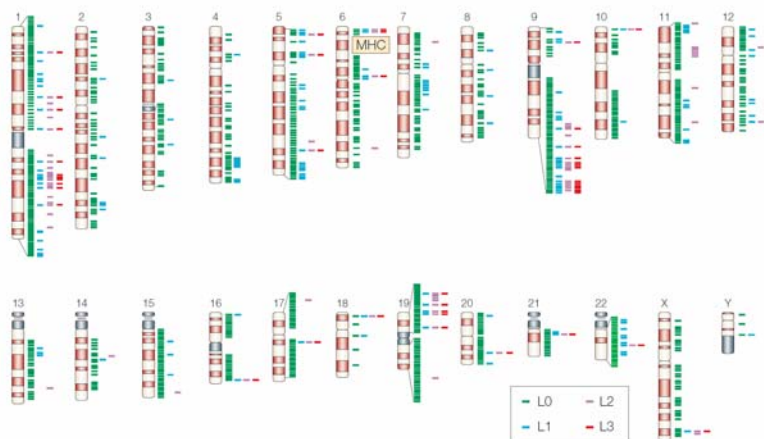


Figura 4: regions paràlogues al MHC en els diferents cromosomes (extret de [Horton, et al., 2004]).

a) Per explicar l'existència de regions paràlogues del MHC a diferents punts del genoma s'han proposat diverses hipòtesis, però la que ho explica millor és la de la duplicació [Sidow, 1996]. La teoria proposa que en un avantpassat comú als vertebrats es van donar dues rondes de duplicació genòmica, i per això es troben 3 regions paràlogues i el MHC (cromosomes 1, 9, 19 i 6). Aquesta hipòtesi falla però a l'hora d'explicar l'existència de gens paràlegs distribuïts a la resta del genoma.

⁴ Segons el model funcionalitzador o d'evolució genòmica mitjançant aquest mecanisme [41] un gen paràleg té tres opcions evolutives: la no funcionalització de manera que una còpia del gen dividit perd la seva funció; la neo-funcionalització on la còpia adquireix una nova funció (tot i que també pot adquirir-la el gen original) i la sub-funcionalització, on els gens duplicats que tenien múltiples funcions divergeixen entre ells perquè hi ha hagut una pèrdua recíproca de la funció.

b) La paralogia que trobem a dintre del propi MHC s'explica com a conseqüència de la duplicació gènica i com a forma de fer evolucionar aquesta regió. La seva significació fa referència a la funcionalitat de les molècules HLA, ja que per a una efectiva presentació de tots els antigens possibles, és millor disposar de diferents molècules que puguin realitzar aquesta funció que no pas només d'una única molècula. Un exemple clar d'aquesta paralogia serien els loci de classe I HLA-A, B i C. Però cal dir que s'ha postulat que tota la regió de classe I [Shiina, et al., 1999, Danchin, et al., 2004] es podria haver format a partir de set duplicacions successives d'una regió de només 300Kpb (que s'estén des d'HLA-Jy59 a HLA-F, figura 1).

II.1.1.5.3 Polimorfisme

En les molècules del MHC apareix el polimorfisme de forma complementària a la paralogia per fer augmentar la seva variabilitat [Hughes, et al., 1998]. Cal dir però que el grau de polimorfisme que trobem al MHC és realment molt elevat, com ho posa de manifest el nombre d'al·lels que estan descrits segons fonts de la IMGT/HLA Sequence Database [Robinson, et al., 2000, Robinson, et al., 2003] (www.ebi.imgt.org/hla) a data de març del 2006.

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1
429	751	219	429	68	121

Taula 1. Nombre d'al·lels de classe I i classe II (en el cas de classe II només s'assenyalen els 3 loci més polimòrfics).

El polimorfisme de les molècules HLA s'ha generat en part per fenòmens de conversió gènica⁵, mutacions puntuals, insercions, delecions i recombinació. Això fa que els al·lels d'un mateix loci, tot i pertànyer a especificitats serològiques diferents,

⁵ En els últims anys s'ha vist que els *hot spots* de recombinació del MHC es donen mecanismes de conversió gènica i *crossover* durant la recombinació meiótica en espermatozoides (39). També s'ha vist, de manera experimental, que la major part de la recombinació en el MHC té lloc en *hot-spots* petits, que es troben limitant regions d'elevat DL (33, 38, 39, 40).

[Jeffreys, et al., 2001, Jeffreys, et al., 2004, Cullen, et al., 1997, Cullen, et al., 2002].

el polimorfisme del MHC és degut a una selecció Darwiniana més que no pas per deriva genètica i mutació [Parham, et al., 1989, Parham, 1989, Takahata, et al., 1992].

II.1.1.5.4 MHC i Selecció balancejadora

És ben sabut que la selecció pot afectar directament la quantitat de polimorfisme dels loci que estan sota la seva influència [Kimura, et al., 1983]; trobem tres tipus de selecció amb aquests efectes: la selecció negativa que elimina les variants deletèries i per tant disminueix el polimorfisme, la selecció positiva que fixa les variants afavorides i per tant disminueix el polimorfisme, i la selecció balancejadora que afavoreix el polimorfisme a través de mantenir les diferents variants al llarg d'un locus.

La forma de selecció que s'ha postulat que actua al MHC per tal de mantenir el polimorfisme en les zones d'unió a pèptid és la selecció balancejadora. Ara bé, cal dir que s'entén per selecció balancejadora tant la sobre-dominància dels heterozigots en termes de *fitness* (eficàcia biològica), com la selecció que depèn de la freqüència i també la selecció diversificadora que afavoreix diferents genotips en diferents ambients [Watanabe, et al., 1970]. En els estudis clàssics [Takahata, et al., 1990, Hughes, et al., 1998] es va considerar que en el cas del MHC estaria actuant la selecció dels heterozigots, ja que un hoste heterozigot per totes les molècules MHC pot presentar fins un màxim del doble de pèptids que no pas un individu homozigot. En aquest sentit cal dir que en humans l'heterozigòsia del MHC es correlecciona negativament amb la malaltia en pacients infectats per HIV [Carrington, et al., 1999] i HTLV-1 [Jeffery, et al., 2000]. Però respecte aquest punt, hi ha hagut certa controvèrsia [Hughes, et al., 1988, Hughes, et al., 1989, Parham, et al., 1989, Takahata, et al., 1990, Borghans, et al., 2004, De Boer, et al., 2004] degut a que el polimorfisme del MHC és molt elevat i explicar-lo només amb la superioritat dels heterozigots no sembla suficient. Així alguns altres autors creuen que a part de la selecció dels heterozigots també seria necessària una pressió de selecció depenent de la freqüència [Hedrick, 2002], mentre que d'altres creuen en una selecció deguda a la co-evolució amb els paràsits; tot i això, de moment no s'ha trobat cap explicació prou concloent.

II.I.1.6 Nomenclatura dels al·lels HLA

Existeix un comitè de nomenclatura pel sistema HLA anomenat *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*, que a més de fixar les normes de nomenclatura també classifica els nous al·lels descrits.

El sistema de nomenclatura utilitzat actualment per aquest comitè per denominar els al·lels HLA, permet identificar el loci i la família del loci al qual pertany un al·lel en concret; alhora dóna informació de les variants d'aquest al·lel que no generen un canvi a nivell proteic i de les variants que no són expressades [Bodmer, et al., 1995].

Aquest sistema de nomenclatura consisteix en: el nom del locus seguit per un asterisc (per indicar que es tracta d'informació al·lèlica) i després fins a un total possible de vuit dígits numèrics. Els dos primers dígits fan referència a la família al·lèlica a la que pertany l'al·lel; els dos següents indiquen de quin nombre de variant al·lèlica dins de la mateixa família es tracta. Aquests quatre primers dígits es troben en tots els al·lels. Quan apareixen dos dígits més donen la informació de que aquell al·lel presenta diverses variants de seqüència que no provoquen canvis d'aminoàcids en la proteïna. Si es troben un setè i vuitè dígits indiquen que s'han descrit polimorfismes en zones no codificants de l'al·lel en qüestió.

Per exemple: el nom HLA-B*270502, indica que és un al·lel pertanyent al locus B, membre de la família B27; en concret, n'és la variant al·lèlica nombre 05. També indica que d'aquesta variant al·lèlica existeixen polimorfismes de seqüència que no donen lloc a canvi a nivell d'aminoàcid codificat, dels quals en concret aquesta n'és la variant 02.

De vegades també s'incorpora al final del nom una N (nul) quan es tracta d'un al·lel que no presenta expressió (tot i que s'ha vist que alguns d'aquests al·lels són de baixa expressió), una S (soluble) quan només es presenta en forma soluble, una C (citoplasmàtic) per quan l'al·lel es queda al citoplasma i no es troba a superfície, i una A (aberrant) quan hi ha dubtes de si s'expressa proteïna.

Quan es parla d'especificitats serològiques el nom dels loci no va seguit d'un asterisc, i només es continua amb els dígits indicatius de la família al·lèlica a la que pertany.

II.I.1.7 Codominància

Els gens dels loci d'histocompatibilitat són codominants; això vol dir que s'expressen les dues còpies del genoma, i que en un individu trobem expressades 6 molècules de

classe I clàssiques (2x HLA-A, 2x HLA-B, 2x HLA-C) i 6 molècules de classe II de les clàssiques (2x HLA-DR, 2x HLA-DQ, 2x HLA-DP), tot i que en funció del genotip es poden trobar més molècules de DR, formades per l'expressió de la paralògia dels gens DRB3, DRB4, DRB5.

II.I.1.8 Al·lels nuls

Segons el comitè de nomenclatura dels al·lels HLA, els al·lels nuls o els seus gens s'indiquen amb el sufix 'N' i són aquells que tenen un "defecte" que evita l'expressió normal del seu producte a la membrana cel·lular. Des d'aquest punt de vista s'emfatitza que l'alteració no necessàriament implica que no hi hagi un producte intern o parcial que pugui ser diana de cèl·lules T [Bodmer, et al., 1994, Bodmer, et al., 1995].

Tradicionalment s'anomenaven nuls als al·lels que no es detectaven mitjançant les tècniques de serologia, però amb l'arribada de les tècniques de tipificació moleculars s'ha vist que la manca d'expressió pot ser deguda a diverses causes com són: a) polimorfismes que creïn codons de terminació en un exó, b) insercions o delecions que canviïn el marc de lectura, c) mutacions al promotor o en les seqüències intròniques que intervenen en empalmament. Elsner HA, Blasczyk R han fet una interessant revisió sobre tots els al·lels HLA nuls que s'han trobat i la potencial causa de que ho siguin [Elsner, et al., 2004].

II.II TIPIFICACIÓ HLA

II.II.1 TIPIFICACIÓ DEL POLIMORFISME DELS LOCI HLA

La necessitat d'aparellar els al·lels HLA del donant i del receptor per a portar a terme els trasplantaments d'òrgans ha fet necessària l'obtenció de metodologies que permetin la identificació de totes les especificitats del sistema HLA. És amb aquest objectiu amb el que han anat evolucionant els diversos sistemes que es poden utilitzar per a l'estudi i resolució del polimorfisme d'aquestes molècules. Les tècniques que es van utilitzar inicialment estaven basades en la detecció de les molècules HLA unides a la membrana

de la cèl·lula; posteriorment s'han desenvolupat tècniques per a l'anàlisi d'aquestes molècules a nivell gènic. A mesura que la resolució de les tècniques ha anat augmentant s'han descobert més especificitats i al·lels, ara bé cal dir que la gran complexitat d'aquest polimorfisme no ha estat del tot revelada fins a l'arribada de les tècniques basades en la seqüenciació [Marsh SGE, 2000, Michael Browning, 1996].

El paper central que tenen les molècules HLA en la resposta immunitària, juntament amb el seu elevat grau de polimorfisme, han fet que les tècniques de tipificació no només hagin estat utilitzades per al trasplantament, sinó que també siguin emprades en àrees tant diferents com són l'epidemiologia, els estudis d'associació amb malaltia, l'antropologia, la medicina forense i òbviament la immunologia cel·lular.

II.II.1.1 Metodologies per a la tipificació de les molècules HLA expressades.

II.II.1.1.1 Microlimfocitotoxicitat mediada per complement

La primera tècnica descrita per a la detecció d'especificitats HLA va ser la microlimfocitotoxicitat mitjançada per complement a l'any 1964 [Terasaki, et al., 1964]. La base d'aquesta tècnica és utilitzar un sèrum específic que contingui anticossos contra un HLA concret, i enfrontar-lo a leucòcits de la persona a tipificar, avaluant la reactivitat si hi ha citotoxicitat mitjançada per una font afegida de complement. En els seus inicis s'utilitzaven sèrums procedents de dones múltiples que potencialment contenien anticossos contra el HLA "patern". El problema de la utilització d'aquests sèrums és que cadascun pot contenir més d'una especificitat, i per tant per poder conèixer l'especificitat HLA s'ha d'utilitzar un panell de sèrums molt ben caracteritzat i força ampli. Les especificitats dels al·lels de classe I van ser les primeres que es van elucidar d'aquesta manera, sobretot les d'HLA-A i B que van permetre un nivell de discriminació important. D'altra banda les especificitats d'HLA-C han costat més d'elucidar per aquesta aproximació, en part com a conseqüència del menor nivell d'expressió d'aquest loci. Les tècniques per a la detecció de classe II per microlimfocitotoxicitat van ser desenvolupades més tardanament [Ceppellini, et al., 1974, van Leeuwen, et al., 1982] i si bé van permetre la tipificació d'alguns loci de classe II els resultats de la utilització d'aquesta metodologia no van ser mai tan bons com els obtinguts per classe I.

Una millora important per aquest tipus de tècnica, va ser la incorporació dels anticossos monoclonals, que potencialment haurien de permetre solucionar els problemes de reactivitat creuada dels sèrums. Però en la realitat no ha estat així del tot, degut a que els epítops més immunogènics de les molècules HLA estan presents en diferents especificitats serològiques. Així doncs, la tipificació amb anticossos monoclonals encara es basa en certa manera en patrons de reacció, tot i que el seu gran avantatge és que la "font" d'on provenen (un híbridoma) en permet una producció il·limitada, no com en el cas del sèrum de múltiples. En bastants laboratoris la serologia es manté com a mètode de tipificació de baixa resolució, però només per a classe I i sovint els seus resultats han de ser verificats mitjançant altres tècniques.

II.II.1.1.2 *Cultiu Mixt Limfocitari (CML)*

S'havia vist que quan es posaven en cultiu limfòcits de diferents individus no relacionats, aquests proliferaven [Hirschorn K, 1963] i que aquesta proliferació no s'observava quan s'utilitzaven en el cultiu limfòcits de germans bessons [Bach, et al., 1967]; així es va fer palès que la proliferació depèn de la identitat o diferència de molècules HLA dels limfòcits que s'estan mesclant en el cultiu. Aquest tipus d'assaig de proliferació que serveix per identificar les especificitats HLA s'anomena Cultiu Mixt Limfocitari (CML), i generalment com a mesura de la proliferació s'utilitza la incorporació de H3-timidina en les cèl·lules que s'estan dividint (s'inactiven les cèl·lules estimuladores irradiant-les o amb mitomicina-c per evitar que siguin aquestes les que proliferin). Gràcies a la utilització d'aquesta tècnica es van poder determinar millor les especificitats de classe II (DR sobretot). Alhora es va veure que donava una informació addicional a l'hora d'aparellar donant i receptor per un trasplantament, ja que persones aparellades per serotipificació a vegades produïen CML [Mempel, et al., 1973]. Existeix una correlació amb l'existència de rebuig en els trasplantats i CML [Morishima, et al., 1995], però tot i això un CML negatiu no indica una tipificació idèntica, ni implica un no rebuig [Eiermann, et al., 1992, Tiercy, et al., 1991]. Tot i la fina especificitat que permet obtenir la utilització de les cèl·lules T en la valoració de la histocompatibilitat, s'ha vist que aquestes també són capaces de donar reactivitats creuades [van der Poel, et al., 1986], i aquest fet juntament amb la laboriositat i temps necessari per a la realització d'aquestes proves fan que les cèl·lules T no siguin els reactius ideals per a la tipificació.

II.II.1.1.3 Tipificació mitjançant anticossos monoclonals

Amb el desenvolupament dels anticossos monoclonals i alhora de les tècniques de citometria de flux, s'han optimitzat metodologies per a la tipificació de determinades especificitats serològiques. Tot i els avantatges en quant a rapidesa respecte als altres assajos de detecció de les molècules HLA unides a membrana, aquestes metodologies mantenen els inconvenients de reactivitat creuada amb altres especificitats HLA del mateix loci, degut al reconeixement d'epítops compartits pels diversos anticossos monoclonals. Un exemple d'aquestes metodologies seria la tipificació de l'especificitat HLA-B27 que s'ha optimitzat d'aquesta manera [Bonnaud, et al., 1999]. Cal dir però que aquesta tècnica no s'utilitza per a la tipificació completa d'un loci, i en el cas de les especificitats en les que s'ha optimitzat (com és B27) s'hi observa un 5% d'errors de tipificació (falsos positius) que no es donen quan s'utilitzen altres metodologies basades en el DNA [Seipp, et al., 2005, Ward, et al., 1995] (*veure apartats següents*).

II.II.1.2 Detecció del polimorfisme en els gens HLA

Avui en dia, les tècniques basades en la detecció del polimorfisme en els gens HLA, s'han convertit en una alternativa als mètodes serològics àmpliament utilitzada en la pràctica clínica. Les metodologies de tipificació per biologia molecular basades en les tècniques de RFLP i clonació van començar a ésser introduïdes [Bidwell, et al., 1987a, Bidwell, 1988, Bidwell, et al., 1988] abans del desenvolupament de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Però les tècniques basades en la biologia molecular no van acabar esdevenint realitats diagnòstiques fins que la metodologia d'amplificació de DNA no es va desenvolupar amb èxit. Des dels inicis de la seva utilització, [Bozon, et al., 1997, Bozon, et al., 1996] es va veure que els mètodes basats en la PCR presenten una sèrie d'avantatges respecte a les tècniques de detecció de les molècules expressades anteriorment descrites; els més destacats són: permetre obtenir una resolució més elevada, evitar les reactivitats creuades dels anticossos, un alt nivell de precisió i reproduïbilitat, i que es poden actualitzar més fàcilment en funció dels nous al·lels que es van descobrir. L'aparició d'aquestes tècniques va comportar definir nivells de resolució a l'hora de donar una tipificació, ja que les tècniques de serologia donaven informació limitada sobre l'especificitat: aquest nivell serològic bàsic es va considerar una baixa resolució, la definició a nivell d'al·lel es va considerar alta, i la

mitja quan es donava informació sobre l'especificitat serològica alhora que s'identificava una discriminació d'al·lels entre tots els possibles, és a dir defineix un grup.

Tot i que s'han desenvolupat moltes variants metodològiques basades en la PCR que han estat descrites com a aplicables a la tipificació dels gens HLA, les més comunament utilitzades pels laboratoris HLA són tres: la PCR amb hibridació amb sondes específiques de seqüència (PCR-SSO), la PCR amb encebadors específics de seqüència (PCR-SSP) i la PCR seguida per la seqüenciació (PCR-SBT). Seguidament passem a comentar les característiques principals d'aquestes metodologies de genotipificació.

II.II.1.2.1 PCR-SSO

Aquesta tècnica consisteix en generar primer una amplificació genèrica del locus a analitzar, unir el producte a una membrana de niló i posteriorment hibridar-ho amb oligonucleòtids específics d'al·lel que es corresponguin a les zones polimòrfiques a analitzar. A través de detectar quines de les sondes s'han hibridat es poden conèixer les seqüències polimòrfiques que conté l'amplímer i per tant donar la tipificació [Saiki, et al., 1986]. Cada sonda que s'utilitza és específica d'una seqüència polimòrfica, però també en aquest cas, aquesta seqüència pot ser compartida per diferents al·lels. Per això a l'hora de donar una tipificació s'han d'analitzar els patrons de sondes unides, que es corresponen amb els patrons de seqüències polimòrfiques que defineixen un al·lel. Com més sondes s'utilitzen, més elevada és la resolució que s'obté per que s'estan valorant més seqüències polimòrfiques. Utilitzar per generar l'amplímer una PCR específica de loci (*veure apartat PCR-SSP*) fa que la interpretació sigui més senzilla i acurada, per que com ja hem comentat, degut a la naturalesa del polimorfisme HLA, hi ha moltes sondes que són compartides amb diferents loci.

Inicialment es treballava amb un marcatge radioactiu de les sondes; posteriorment s'han fet moltes modificacions d'aquesta tècnica i s'han utilitzat marcatges tant diversos com la biotina o la digoxigenina, revelats amb estreptavidina conjugada a peroxidasa o amb un anticòs contra digoxigenina conjugat amb fostatasa alcalina [Chen, et al., 1994a, Chen, et al., 1994b, Cereb, et al., 1995]. Totes les modificacions s'han fet per tal de disminuir els riscos de la utilització de la radioactivitat, i actualment també s'utilitzen marcatges fluorescents [Itoh, et al., 2005, Cesbron-Gautier, et al., 2004, Dunbar, 2006]. Alhora s'han desenvolupat metodologies reverses on s'uneixen a la membrana les sondes i es marca l'amplímer generat a través de la utilització

d'encebadors marcats, o més recentment s'incuba l'amplímer amb microesferes fluorescentes que compten les sondes unides i es resol per citometria de flux sense hibridació amb membrana (*veure més endavant*).

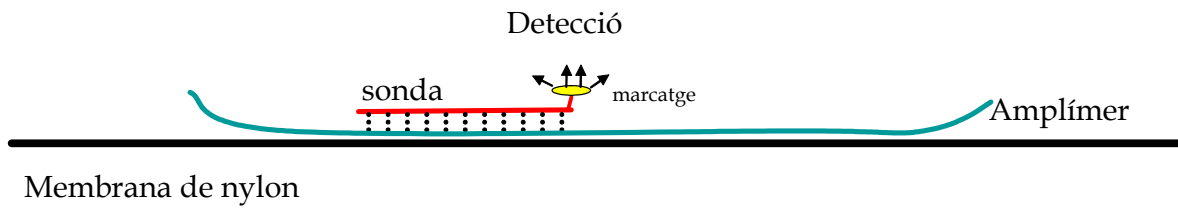


Figura 6. Esquematzació de la descripció de la metodologia original.

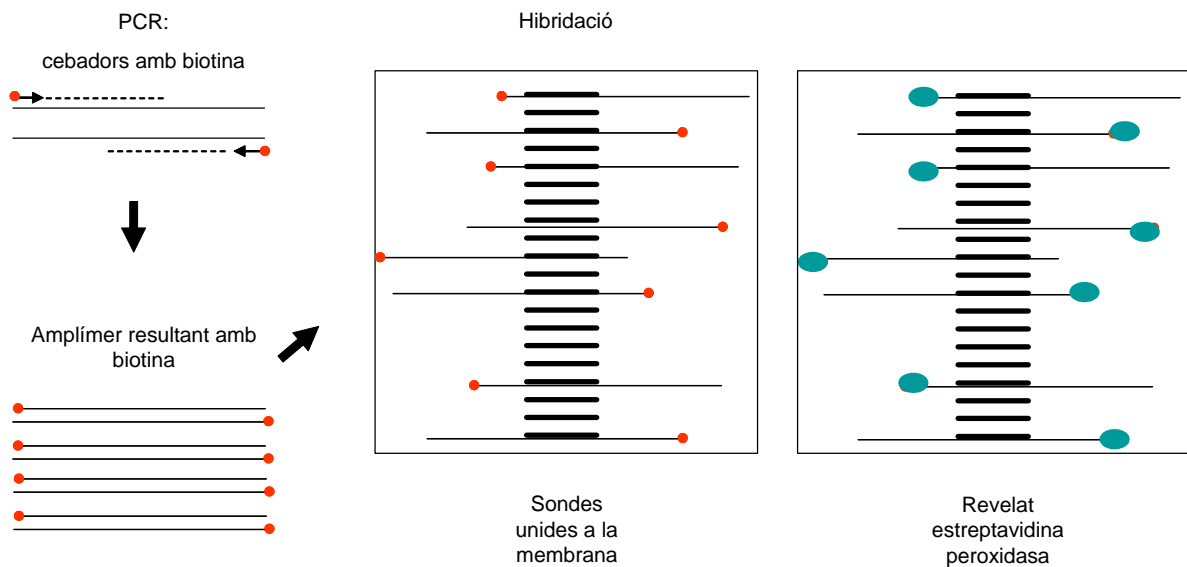


Figura 7. Esquematzació d'una de les múltiples adaptacions possibles de la PCR-SSO, en aquest cas varia el marcatge de l'amplímer.

En els seus inicis es va aplicar la PCR-SSO per a la tipificació dels al·lels de classe II, ja que d'ells es disposava de la seqüència, iniciant-se amb DQ, i després en funció de la informació a l'abast es va anant estenent a DR [Saiki, et al., 1986, Higuchi, et al., 1988, Hill, et al., 1992a, Wordsworth, 1991]. Els bons resultats de la tipificació de classe II mitjançant aquesta tècnica van encoratjar per a que es fessin extensius a classe I, però amb la tardança pel fet de que s'havien de conèixer les seqüències per a saber on dissenyar les sondes específiques. Cal dir que avui en dia degut a l'elevat nombre d'al·lels que es van descobrir encara es dona aquesta situació de redefinició constant de les aproximacions en ús.

Tot i els avantatges que aquesta tècnica representa respecte a la serologia, té una sèrie d'inconvenients específics que cal remarcar. El primer és intrínsec a la tècnica: a l'hora d'hibridar una mostra amb sondes polimòrfiques, s'estan hibridant els seus dos al·lèls, i al no fer amplificacions específiques de grup no es pot discriminar a quin dels dos al·lèls pertany aquesta regió polimòrfica i per tant amb aquesta tècnica no es pot distingir els patrons de la cadena cis i de la cadena trans de DNA. Degut a la naturalesa del polimorfisme dels al·lèls HLA, no és una problemàtica trivial, ja que moltes especificats comparteixen regions similars i es distingeixen en un parell de regions que també són compartides amb altres. En segon lloc, cal dir que una sonda només s'utilitza per a una única variant polimòrfica, i per tant són necessàries moltes sondes a l'hora d'obtenir una elevada resolució. El tercer gran inconvenient és que la hibridació de l'amplímer amb les sondes unides implica unes necessitats específiques de manipulació i espai. Així, tot i que s'utilitzin tires petites de membrana es necessita més espai que per a altres aproximacions (ja que s'hibriden moltes sondes), un aparell per fer les hibridacions a la temperatura adequada i els rentats, alhora que el revelat. Tot el procés en general implica una manipulació encara bastant laboriosa i lenta, tot i que permet el processament d'un elevat nombre de mostres per assaig.

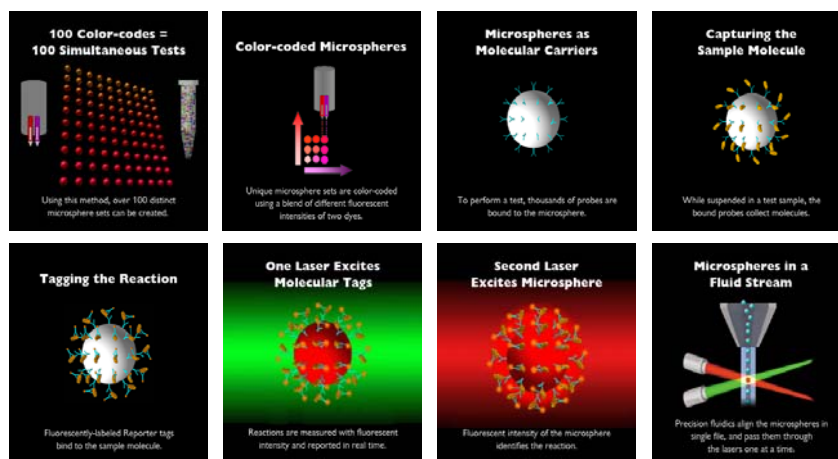


Figura 8. Adaptació de la PCR-SSO, en aquest cas varia el suport on es fa la hibridació, el marcatge de les sondes i el mètode de detecció. (extret de *Luminex_xmap technology*).

En aquest punt, i tal com ja s'ha apuntat anteriorment cal dir que recentment ha aparegut una nova aplicació d'aquesta metodologia, consistent en el desenvolupament d'una PCR-SSO que es resol amb la hibridació a microesferes fluorescentes, que porten

unides les sondes i es detecten en base a una citometria de flux amb un equipament específic. Aquesta metodologia ha permès barrejar fins a 100 sondes en una mateixa hibridació ja que cada microesfera té una mida i fluorescència diferent, però només porta unida un sol tipus de sonda. La tipificació s'obté també en aquest cas per l'anàlisi de patrons d'hibridació. Tot i la gran evolució que ha suposat aquesta tècnica respecte a les tècniques de PCR-SSO clàssiques (ja que no calen les membranes i es redueix a pocs tubs la tècnica), cal dir que no resol els punts dèbils d'utilitzar amplímer i per tant manté el risc de contaminació, alhora que també presenta dificultats en la discriminació de les seqüències polimòrfiques en cis i trans de la cadena de DNA, tal i com s'ha explicat anteriorment.

II.II.1.2.2 PCR-SSP

La PCR amb encebadors específics de seqüència es basa en la tècnica ARMS (sistema d'amplificació refractària de mutació) [Newton, et al., 1989] i consisteix en una amplificació específica d'al·lels que comparteixen una seqüència polimòrfica que n'és distintiva. Els encebadors d'aquesta amplificació (ambdós o només un) se situen en la seqüència gènica de manera que en la seva posició 3' contenen la diferència nucleotídica que els caracteritza, i llavors, utilitzant unes condicions de reacció astringents, s'aconsegueix l'amplificació únicament de les variants amb el polimorfisme. Per tal d'aconseguir les condicions d'amplificació adequades es modifiquen tant la composició de la mescla de reacció com la temperatura d'hibridació en el programa de PCR. Mitjançant aquesta tècnica es pot arribar a obtenir una amplificació específica, fins i tot en situacions en que només hi ha una base diferent. En les diverses aplicacions que s'han fet de la PCR-SSP per a la tipificació HLA, les amplificacions específiques generalment són de grups d'al·lels que es corresponen a una especificitat serològica, però hi ha també amplificacions que són específiques d'un grup d'especificitats o d'un determinat al·lel. Aquesta metodologia ha estat aplicada tant per els al·lels de classe I com de classe II; ara bé, la resolució a la que arriba depèn del nombre de polimorfismes que es detecten i per tant del nombre de reaccions que es duen a terme. Degut a que la falta d'amplificació indica resultat negatiu per aquella especificitat, s'ha d'evitar donar resultats negatius quan ha fallat l'amplificació per manca de DNA, o per la seva mala qualitat. Per això les reaccions que s'utilitzen en la

PCR-SSP consisteixen en co-amplificacions de la regió polimòrfica del loci HLA a tipificar amb un gen control que s'ha d'amplificar sempre simultàniament.

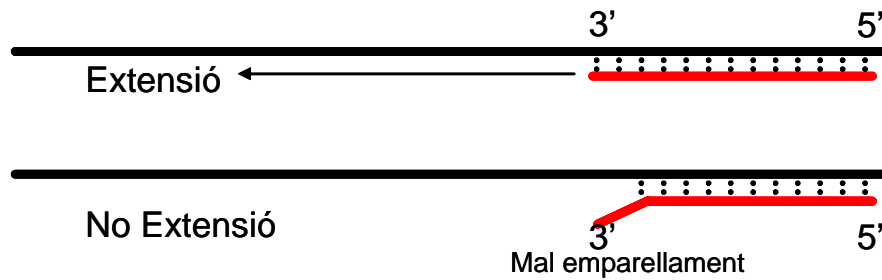


Figura 10. Representació esquemàtica de la base de funcionament de la tècnica.

La interpretació d'aquest tipus de tècniques es basa en l'observació de producte de PCR de la mida específica en els diferents tubs; per tant el resultat depèn dels diferents tubs d'un mateix pannel i un conjunt de positivitats en les diferents reaccions és indicatiu d'una determinada tipificació. Normalment es realitzen les diferents reaccions necessàries per a obtenir una tipificació totes a la vegada i la visualització dels productes de les reaccions de PCR es fa en un mateix gel d'agarosa.

Un dels avantatges d'aquesta tècnica és que es pot utilitzar en una sola mostra, però quan cal utilitzar-la en moltes mostres (a gran escala) és molt més laboriosa, ja que s'han de manipular molts tubs i carregar moltes mostres en un gel d'agarosa. Per exemple per obtenir una tipificació de baixa resolució del locus HLA-B es necessiten (48) tubs. La utilització de la PCR-SSP va ser inicialment descrita per a la tipificació per als al·lels de classe II, a principis dels anys 90 [Olerup, et al., 1991, Olerup, et al., 1992] amb DR i DQ. També es va descriure per als al·lels de classe I a través de les anàlisis dels exons 2 i 3, tot i que alguna de les metodologies també utilitzen els exons 1 i 4 per assolir una tipificació acceptable [Browning, et al., 1993, Bunce, et al., 1994b, Bunce, et al., 1994a, Guttridge, et al., 1994, Krausa, et al., 1994].

Una millora d'aquesta tècnica va ser poder produir diferents productes de diferents mides indicatius de polimorfismes diferents en un mateix tub (*multiplex*); així es redueix una mica el nombre de tubs per cada mostra a processar [Sadler, et al., 1994]. Alhora cal destacar que la introducció d'aquesta tècnica va facilitar la tipificació d'HLA C (com ja hem dit força complicada per serologia); aquest fet va posar de manifest els avantatges de les tècniques basades en el DNA per a la tipificació. Posteriorment a la descripció de l'habilitat d'aquesta tècnica per a la tipificació de tots els loci majors es van combinar tots els treballs per a poder obtenir un mètode únic, amb les mateixes

condicions de ciclat per a tots els loci i realitzar-lo en plaques de 96 pous, per tal d'obtenir el denominat *Phototyping* (Fototipificació)[Bunce, et al., 1995].

II.II.1.2.3 PCR-SBT

La tècnica de la seqüenciació tot i que és la que dóna una resolució més elevada, ha trigat força temps en convertir-se en una pràctica rutinària per als laboratoris de tipificació HLA. Això és degut a que en el seu inici era una tècnica lenta i laboriosa, sobretot per l'elevada dificultat d'anàlisi que comportava. Amb l'arribada de la seqüenciació automàtica, alhora que amb la descripció de metodologies que permetien la seqüenciació d'un amplímer procedent d'encebadors específics de locus (PCR-SBT), i amb el disseny de sistemes informàtics d'interpretació específics per a les seqüències procedents de les molècules HLA, s'ha anat generalitzant el seu ús en la pràctica clínica. Com a resultat de la seva utilització més extensiva en els últims anys l'augment de nous al·lels descrits ha resultat ser gairebé exponencial.

Les primeres aproximacions de SBT per a la tipificació HLA van ser introduïdes per als al·lels de classe II, DRB, DQA i DQB [Santamaria, et al., 1992], posteriorment es van descriure protocols per DP [Rozemuller, et al., 1993] i per als tres loci de classe I [Santamaria, et al., 1993]. Tot i aquestes descripcions inicials posteriorment van anar apareixent variants de les metodologies per facilitar-ne l'execució[Versluis, et al., 1993, Spurkland, et al., 1993].

Les tècniques que es porten a terme avui en dia es basen en la utilització d'encebadors específics d'un locus situats generalment en els introns, o bé en una zona exònica comuna a tots els al·lels a amplificar i posteriorment utilitzen encebadors més interns per a la generació de les seqüències. Per exemple, en el cas d'HLA-B es fa una PCR genèrica amb la que s'amplifiquen els exons 2 i 3 amb encebadors situats en els introns 1 i 3, i posteriorment es fan 4 PCR de seqüenciació (consistents en la incorporació de nucleòtids marcats amb diferents fluorocroms): dues per l'exó 2 (sentit i antisentit) i dues per l'exó 3. En aquest punt cal dir que hi ha altres aproximacions per la tipificació d'HLA-B que amplifiquen i seqüencien l'exó 4.

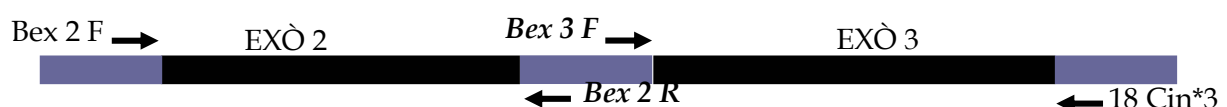


Figura 11. Exemple d'una aproximació per a la seqüenciació d'HLA-B. Només es mostren els encebadors que s'utilitzen per les amplificacions de seqüenciació que es fan a partir de l'amplificat genèric.

La principal dificultat de la seqüenciació ha estat, des del seu inici, la interpretació de les combinacions d'al·lels, ja que es poden generar combinacions ambigües quan la combinació de dos al·lels forma una seqüència heterozigota que és igual a la que resulta per la combinació de dos al·lels diferents.

A través de diferents simulacions informàtiques s'ha obtingut una llista amb totes les combinacions d'al·lels que no es poden resoldre a través de la seqüenciació; aquesta llista es va actualitzant en funció dels nous al·lels que van sortint i està disponible a la base de dades de IMGT/HLA [Robinson, et al., 2003]. D'altra banda, per alguns loci s'ha calculat el nivell d'error en les tipificacions per SBT [Adams, et al., 2004] degut a aquest tipus d'ambigüitats i en quant a HLA-A i HLA-B s'ha posat de manifest que quan només es realitza la seqüenciació dels exons 2 i 3 arriba a percentatges del 41% i el 24 % respectivament en una mostra de poblacions d'origen ètnic barrejat. Per tant en aquests casos la seqüenciació s'ha de complementar amb la utilització d'una PCR específica de grup o bé de la seqüenciació de l'exó 4.

Un altre dels grans problemes que presenta la tipificació per seqüenciació és el fet de que es pugui donar l'amplificació preferencial d'un dels dos al·lels, ja que és només a partir d'una sola reacció de PCR que es produeix l'amplímer que es seqüencia; de fet també és possible que es doni l'amplificació preferencial d'un dels dos al·lels en la PCR de seqüenciació. Sigui per un fenomen o per l'altre si aquesta amplificació preferencial es produeix serà possible que es tipifiqui un individu heterozigot com a homozigot, fent per tant un error en l'assignació al·lèlica.

II.II.1.2.4 Altres aproximacions clàssiques descrites

Una aproximació basada en la PCR que va ser descrita en els inicis del desenvolupament d'aquest tipus de tècniques va ser la PCR-RFLP. Aquesta tècnica es basa en la detecció de la presència d'una seqüència polimòrfica específica d'al·lel en un amplímer a través de la seva digestió amb un enzim de restricció que reconeix concretament aquella seqüència com a diana de restricció. Es va definir el seu ús extensiu per a la tipificació de DQA1 [Maeda, et al., 1989], DRB1 [Uryu, et al., 1990, Yunis, et al., 1991] i DPB1 [Hviid, et al., 1992] però molt aviat es va veure que aquesta metodologia no era prou potent per a poder identificar totes les combinacions homo i heterozigotes d'al·lels [Olerup, 1990, Juan M, et al., 1992] i no s'ha seguit desenvolupant en aquest sentit. Ara bé, sí que se n'han descrit variants per a la

tipificació a nivell al·lèlic d'algunes especificitats serològiques com és el cas de B27 [Nieto, et al., 1997, Ness, et al., 1987, Fraile, et al., 1998].

Cal dir que abans de l'aplicació de les tècniques basades en la PCR i quan es coneixien poques especificitats es va utilitzar àmpliament l'anàlisi de patrons de digestió de genòmic total (RFLP) amb la finalitat de tipificar, però aquesta tècnica útil per a una aproximació de baixa resolució també es va veure que no permetia resoldre el vast polimorfisme dels gens HLA [Bell, et al., 1987, Bidwell, et al., 1987b].

II.II.1.2.5 Limitacions i inconvenients comuns de les metodologies basades en la PCR

Les diferents metodologies basades en la PCR que hem descrit han estat totes aplicades en les pràctiques habituals dels laboratoris de tipificació HLA amb èxit. Alhora malgrat que totes tenen bases tècniques diferents i per tant, com hem descrit, limitacions tècniques diferents, comparteixen una gran limitació en comú: totes requereixen en la seva realització metodològica de passos post-PCR. Aquestes manipulacions post-PCR en tots els casos allarguen la durada de la tècnica i alhora comporten un risc de contaminació amb amplímer de les noves mostres a processar. En aquest sentit tenen un risc intrínsec de poder generar resultats erronis, tot i que s'apliquin les regulacions estrictes en quant a zones pre- i -post-PCR que determina la normativa d'acreditació internacional d'un laboratori de tipificació HLA (per exemple la normativa de l'EFI, Federació Europea per a la Immunogenètica [www.efiweb.org/accreditation.html]).

II.II.1.2.6 Noves metodologies descrites

En els últims anys s'han descrit aplicacions molt diverses per tal de poder millorar les tècniques actuals de tipificació. Són tan diverses com la utilització de xips amb sondes [Guo, et al., 1999, Palmisano, et al., 2005, Consolandi, et al., 2004, Bang-Ce, et al., 2005, Xiao, et al., 2003a, Xiao, et al., 2003b, Haddock, et al., 2001], la piroseqüenciació [Ringquist, et al., 2002, Ringquist, et al., 2004, Entz, et al., 2005], l'anàlisi de la conformació mediat per cadena de referència (RSCA) [Arguello, et al., 1999, Arguello, et al., 1998a, Arguello, et al., 1998b], o l'extensió múltiple d'un sol nucleòtid (SNE) [Imabayashi, et al., 2005, Han, et al., 2003]. Cal dir que totes aquestes metodologies

desenvolupades requereixen de manipulacions post-PCR, i que en general les diferents metodologies milloren només aspectes determinats de la utilització d'altres tècniques. D'altra banda cal dir que s'han desenvolupat metodologies basades en la PCR a temps real, realitzades amb la utilització del fluorocrom d'unió inespecífica a DNA Sybr Green®, o amb la utilització de sondes d'hibridació (com si fos una PCR-SSO) combinades sempre amb amplificacions específiques de loci (com si fos una PCR-SSP).

II.II.2 MHC I ASSOCIACIÓ AMB MALALTIA

Poques molècules han estat tant estudiades com les molècules HLA en quant a la seva relació amb la malaltia. Així, considerant el conjunt la regió del MHC, podem dir que s'ha relacionat amb un centenar de malalties diferents, essent la majoria (però no totes) malalties autoimmunitàries [Price, et al., 1999, Shiina, et al., 2004].

En referència a les associacions gèniques en general cal dir que per valorar el desavantatge que comporta un determinat al·lel "a ajudar" a causar una malaltia s'utilitza el concepte estadístic del risc relatiu (RR), que consisteix en el càlcul de freqüències dels al·lells determinats en la població patològica respecte a les de la població sana. Així el RR és una mesura del risc latent que té una persona que posseeix l'al·lel estudiat a adquirir una determinada patologia, donat en relació al risc propi de les persones que no posseeixen l'al·lel. Tot i l'existència d'aquest concepte que és poblacional i mesurable, a la pràctica normalment s'equipara amb el càlcul de la raó de probabilitat (*Odds ratio*, OR) [Pearce, 1993]. L'OR es determina en estudis de casos vers controls, normalment quan s'ha observat que un al·lel en un grup de pacients és superior al que seria esperable; per calcular-lo s'utilitzen taules 2x2 de la distribució de l'al·lel A (o de la seva absència) en pacients amb la malaltia en qüestió respecte a la presència del al·lel A (o la seva absència) en individus sense la patologia (veure figura 12). El valor d'una OR de 1 significa que hi ha el mateix risc de presentar la malaltia es tingui o no l'al·lel en estudi, una OR menor que 1 apunta cap a un efecte protector de l'al·lel respecte a la patologia, però com més elevada és l'OR per sobre de 1 és més alt risc latent de patir la patologia dels individus que tenen aquell al·lel. Cal remarcar però que, tot i tenir una determinada OR major que 1, la presència de cap al·lel predisposant significa una afirmació de que l'individu patirà la malaltia [Bland, 1995, Bidwell, 2000].

		Al·lel		
		+	-	
Malaltia	+	A	B	RR = $\frac{A \times D}{B \times C}$
	-	C	D	

Figura 12. Càlcul del Risc de probabilitat o OR (odds ratio). A l'esquerra es mostra una taula de 2x2 i a la dreta la fórmula per al seu càlcul.

II.II.2.1 Malalties autoimmunitàries

Com hem dit, s'han fet nombrosos estudis genètics d'associació de malalties autoimmunitàries amb determinats al·lells HLA, i hom ha demostrat que una gran proporció d'aquestes malalties estan relacionades amb al·lells concrets (veure taula 2). Una possible hipòtesi per explicar la relació de les molècules HLA amb l'autoimmunitat podria ser que l'autoimmunitat sigui deguda a que només les cèl·lules T altament autorreactives són eliminades en el timus. En canvi les cèl·lules autorreactives de baixa afinitat podrien escapar a la selecció negativa tímica i es trobarien sota un control exercit per mecanismes de regulació no gaire ben coneguts. Si una d'aquestes cèl·lules reconeix un HLA que presenta pèptids propis (i a més a més han fallat els mecanismes de regulació) pot donar lloc a autoimmunitat. Ara bé, si un individu posseeix un determinat al·lel HLA que no és capaç d'unir pèptids propis, llavors no es podrà donar l'autoimmunitat. A favor d'aquesta hipòtesi juga que s'hagin trobat "fonts" de pèptids propis en algunes d'aquestes malalties com són el col·lagen de tipus II a l'artitis reumatoide o l'àcid glutàmic decarboxilasa (GAD) en la diabetis tipus 1 [Flavell, et al., 1999]. Però en cap cas es coneix de manera directa i inequívoca la relació d'aquestes molècules amb la malaltia autoimmunitària a la qual s'associen. Tot i que sí que s'ha vist que hi ha associacions més fortes que d'altres [Flavell, et al., 1999, Tiwari, et al., 1981, Thorsby, 1997], els estudis genètics demostren moltes vegades que hi ha altres gens, a part dels HLA, que també estan associats amb la malaltia.

A mode de resum genèric (veure taula F) podem dir que les molècules d'HLA de classe II solen estar més relacionades amb malalties autoimmunitàries, sobretot els al·lells del locus HLA-DRB1. Entre els al·lells d'HLA de classe I hi ha menys relacions definides, però trobem en canvi el cas de la família HLA-B27 que es relaciona amb la espondilitis anquilosant amb el risc relatiu més alt de totes les malalties associades a HLA, un 95% [Schlosstein, et al., 1973]. A continuació destaquem les associacions

d'HLA amb patologies autoimmunitàries més rellevants, classificades en funció dels sistemes d'òrgans que afecten.

II.II.2.1.1 HLA i malalties reumatològiques:

II.II.2.1.1.1 Artritis Reumatoide (AR):

Tot i que són diversos els gens que s'han implicat la definició de les característiques pròpies dels pacients amb AR, els polimorfismes del locus DRB1 són els que han mostrat una màxima relació. En aquest cas, més que la presència d'un determinat al·lel HLA, el que es relaciona amb l'AR és la presència del denominat "epítoc compartit" de DRB1 [Nepom, 2001]. Amb aquest nom es coneix aquells al·lells d'HLA-DRB1 que tenen en les posicions aminoacídiques 67 a 74 la seqüència LLEQK/RRAA. Les variants que tenen aquest epítoc compartit (en caucàsics HLA-DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0101, en asiàtics DRB1*0405 o en indis-americanos DRB1*1402) en l'AR es presenten amb una OR que varia entre 2 i 11, mentre que al·lells similars com són DRB1*0402 o 0403 no suposen cap risc incrementat. Cal esmentar que determinades variants semblen definir pitjor pronòstic, així els al·lells de DR4 solen estar presents en les artritis més erosives i no els DR1.

II.II.2.1.1.2 Espondiloartropaties:

La família al·lèlica HLA-B27 forma part del locus HLA B de classe I i compren 40 al·lells englobats en una mateixa especificitat serològica. En quant a la seva freqüència poblacional mitjana, en la població Caucàsica es pot dir que varia entre el 3% i el 8% [Marsh SGE, 2000]. Tot i la seva baixa freqüència, l'interès d'aquesta família al·lèlica recau en la forta associació que manté amb un grup de malalties reumàtiques, les espondiloartropaties, d'entre les quals es pot destacar l'Espondilitis Anquilosant (EA) com a malaltia més fortament associada [Brewerton, et al., 1973] [Bowness, 2002]. Cal dir que l'associació és clara fins al punt que el genotip HLA-B27 es presenta en més del 90% dels pacients i les OR d'aquests al·lells arriben a nivells d'entre 130 i 200 en funció dels estudis consultats. De fet encara no es coneix exactament el mecanisme de la relació EA-B27 però existeixen diferents teories i demostracions més o menys controvertides per explicar-la. Tot i això, treballs recents [Atagunduz, et al., 2005] apunten a la possibilitat d'una presentació preferencial d'un pèptid del colàgen tipus IV a limfòcits T artrítogènics per part de B27.

D'altra banda, en relació als al·lels d'HLA-B27 cal dir que dels 31 subtipus descrits fins el moment [Robinson, et al., 2000] n'hi ha alguns que estan fortament associats amb l'EA mentre que d'altres sembla que poden jugar un paper protector que encara no s'ha entès [Gonzalez, et al., 1999, Ramos, et al., 2002]. Són els al·lels B*2709 i B*2706 els que en determinades poblacions (Sarda i Tailandesa respectivament) no s'associen a la Espondilitis Anquilosant; en canvi no està clara la no associació de B*2703 en un grup poblacional Oest-Africà [Gonzalez, et al., 1999, Gonzalez-Roces, et al., 1997]. D'entre els altres subtipus amb els quals s'han fet estudis d'associació, s'ha conclòs que B*2705, B*2702, B*2707 i B*2704 tenen una associació forta i clara amb la malaltia. En el cas dels nous al·lels descrits no s'ha estudiat la seva associació degut a la seva baixa freqüència. D'entre tots els subtipus, l'únic present en totes les poblacions amb un freqüència elevada (tot i que variable entre les diferents poblacions) és B*2705 [Gonzalez-Roces, et al., 1997, Blanco-Gelaz, et al., 2001].

II.II.2.1.2 HLA i malalties renals:

Són diverses les malalties renals que tenen la base fisiopatogènica en la resposta immunitària, per això no és d'estranyar que si bé els fenòmens humorals (mecanismes d'hipersensibilitat de tipus II i/o III) es troben com a fenòmens directament lligats a les lesions renals, els estudis de relació d'HLA i algunes d'aquestes patologies hagin mostrat també fortes associacions.

Entre les glomerulonefritis, s'ha de destacar l'associació d'HLA-DR15 amb la malaltia de Goodpasture (EG), en la que els anticossos contra el domini NC1 de la cadena alfa3 del colagen de tipus IV [α 3(IV)NC1] de la membrana basal del glomèrul (hipersensibilitat de tipus II) són l'element patogènic que provoca la lesió. Aquesta associació remarca la importància del limfòcit T CD4+ en la regulació de la resposta humoral, alhora que ens recorda que en la base d'aquestes disfuncions ha d'existir algun error en la funció del limfòcit T. Degut a que els al·lels DRB1*1501/02 es presenten en desequilibri de lligament amb els loci DRB5-DQ6, també s'han vinculat aquests amb la patogènia de l'EG, però s'ha vist que són els al·lels de DRB1*15 els que presenten OR majors (entre 6 i 20 segons els estudis). De manera interessant, cal destacar que alguns estudis apunten que determinats al·lels permetrien una presentació preferencial de pèptids amb el motiu (L/I/M/V/F)XX(W/Y/F), que en el cas d'HLA-DR15 es troba fins a 7 vegades més en α 3(IV)NC1. Deixant de costat la relació del HLA amb les nefropaties d'origen lúpic (apartat malalties sistèmiques), cal

dir que també s'han assenyalat associacions d'HLA-DRB1*03 amb la nefropatia membranosa idiopàtica [OR entre 3 i 12 en caucàsics, mentre que en japonesos la relació es presenta amb DRB1*15 (OR 6-9) que sembla protector per a caucàsics, (OR 0,2)]. D'altra banda HLA-DRB1*07 s'ha associat amb la síndrome nefròtica amb canvis mínims sensibles a esteroides (OR 2-9), tot i que en japonesos es relaciona amb DR8 (OR 3-10). En la literatura s'han estudiat i descrit altres associacions d'HLA amb malalties renals (per exemple nefropatia mesangial IgA -DR4), però els resultats mostren relacions més dèbils o s'ha vist una variabilitat amplia entre estudis que fa qüestionable la validesa d'aquestes associacions.

II.II.2.1.3 HLA i malalties neurològiques:

II.II.2.1.3.1 Esclerosi Múltiple:

De les malalties autoimmunitàries neurològiques, l'Esclerosi Múltiple és la més estudiada en quant a la seva associació amb HLA-DRB1*1501 (amb valors de OR entre 1 i 8), doncs també s'ha vist que aquest al·lel mostra un paper patogènic amb determinats pèptids. Es dubtava de si l'associació es donava amb DRB1 o amb altres loci veïns, però recentment s'ha demostrat que la relació és amb DRB1 [Lincoln, et al., 2005]. Tot i això està clar que existeixen altres components genètics associats en la malaltia. D'altra banda cal esmentar que altres malalties neurològiques com són la miastènia gravis o les polineuropaties desmialitzants sensibles (pe. la síndrome de Guillain-Barré) també han estat relacionades amb més o menys potència amb "l'haplotip autoimmunitari" B8-DR3.

II.II.2.1.4 HLA i malalties endocrines:

II.II.2.1.4.1 Diabetis Mellitus tipus I (DM-I):

L'associació de la DM-I amb els loci HLA de classe II ha estat àmpliament referida [Nepom, et al., 1998]. S'ha observat que existeixen diferents al·lells de DQ (locus que hi ha demostrat relació fisiopatogènica) relacionats segons els grups ètnics estudiats, l'al·lel HLA-DRQB1*0302 és el que més predominantment es troba en associació positiva (OR entre 3 i 10) mentre que l'al·lel DQB1*0602 resulta protector per a la DM-I (fins i tot en els casos en que es presenta en heterozigosi amb DQB1*0302). A part d'aquestes associacions s'ha vist que les molècules DR hi poden tenir una influència epistàsica, ja que l'heterozigositat DR3/DR4 incrementa el risc relatiu de patir la malaltia fins a 20 vegades més en relació a altres combinacions de DR.

II.II.2.1.5 Malalties Autoimmunes de la Tiroide (Malaltia de Graves-Basedow, mixedema primària i tiroïditis de Hashimoto):

Tot i tenir clínica oposada, aquestes "tiroïditis autoimmunitàries" mostren una associació mitjana (OR entre 2,5 i 6) amb els diferents al·lels DR3 (DR5 també per Hashimoto). També s'han trobat altres associacions com la de Graves-Basedow i DQA1*0501, però també associacions més específiques (en funció de variants clíniques) com la d'HLA-DPB1*02 amb les formes severes d'oftalmopatia associada a la tiroïditis. Altres malalties endocrines, (com la malaltia d'Addison, la fallida ovàrica prematura, o la hipofisitis limfocítica) han mostrat algunes associacions amb HLA-II especialment DR3, tot i que la baixa freqüència d'aquestes malalties fa difícil establir associacions clares.

II.II.2.1.6 HLA i malalties digestives:

II.II.2.1.6.1 Malaltia celíaca:

Aquesta malaltia "autoimmunitària" desencadenada per culpa i en contra d'un agent extern (la gliadina del gluten) mostra una important associació amb la molècula DQ2, codificada per HLA-DQB1*0201/DQA1*0501, que es defineix en cis pel heterodímer associat a DR3 o en trans per el gen DQB1 associat a DR7 i el DQA1 associat a DR5 quan aquests haplotips es combinen en heterozigosi [Sollid, 2002].

A través d'aquesta molècula es presenten pèptids de la gliadina, prèviament deaminats per la transglutaminasa, i s'inicia una resposta cel·lular lesiva per l'epiteli digestiu. Cal dir que en el context d'aquesta associació, la fisiopatogènia explica per què DQ2 es troba en la major part dels malalts (OR 6-20), i per què no s'hi troba l'al·lel DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) en el seu lloc.

II.II.2.1.6.2 Altres malalties digestives:

En diversos estudis determinats al·lels d'HLA també s'han associat a altres malalties intestinals, (major presència de DR15 (OR 2-4) i protecció per DR4 i DR6 en Colitis Ulcerosa) però mostrant sempre resultats variables o relacions dèbils. Altres associacions descrites serien la de la Colangitis Esclerosant Primària (DRB1*03 amb OR 4-9 i DRB1*1301 OR 2-5, essent DR4 protector), la Cirrosi Biliar Primària (DRB1*08, OR 4-15) o la Hepatitis Autoimmunitària (DR3, OR 4-6 DR4 en Japonesos, OR 12-140).

II.II.2.1.7 HLA i malalties dermatològiques:

La pell com a òrgan diana de la resposta immunitària i de diverses malalties autoimmunitàries és un exemple en que la fisiopatogènia de les malalties troba una relació amb diferents molècules HLA. Així el Pènfing Vulgar s'ha associat a DRB1*0402 en el grup de jueus ashkenazi (OR 14-80) i DQB1*0503 en les altres poblacions (OR 80), ambdues relacions degut a la capacitat de presentar certs pèptids de la desmogleïna-3, autoantigen d'aquesta malaltia [Gazit, et al., 2005]. També la psoriasi s'ha relacionat amb Cw6, la malaltia de Behçet amb B51 (i certs polimorfismes de MICA) i la dermatitis herpetiforme amb DQ2 (en relació a la malaltia celíaca).

II.II.2.1.8 HLA i malalties oculars:

Tot i que el globus ocular té el "privilegi immunològic" alguns fenòmens autoimmunitaris que pot patir s'han associat a diverses molècules HLA. Entre les associacions amb al·lels de classe I, cal destacar la relació d'HLA-A29 amb la retinopatia Birdshot (OR 50-157) i la relació d'HLA-B27 amb les uveïtis anteriors (OR 8) sovint associades amb altres malalties relacionades amb aquest al·lel (Espondilitis anquilopoiètica, malaltia de Reiter, ...). En referència als al·lels de classe II, es descriu l'associació amb l'haplotip HLA-DRB1*0401, DRB4*0101, DQA1*0301 de la malaltia de Vogt-Koyanagi-Harada (OR 10-56), o l'oftalmopatia simpàtico-reflexa (OR 15-19).

II.II.2.1.9 HLA i malalties sistèmiques:

Com a exemple de les malalties autoimmunitàries no específiques d'òrgan (sistèmiques), cal dir que el Lupus Eritematós Sistèmic (LES) s'ha associat amb "l'haplotip autoimmunitari" A1-B8-DR3, definint-se l'al·lel DRB1*0301 com el component principal de l'associació (OR 3-7).

S'ha de tenir present la variabilitat clínica i d'elements analítics del LES, que suggereixen una relació genètica molt àmplia, en la que els al·lels HLA poden aportar-hi la càrrega patogènica que és esperable en els quadres poligènics. Ara bé, fins i tot s'ha vist que es descriuen diferents associacions HLA en base a subaspectes clínics (pe. HLA-DRB4 i antifosfolípids, OR 5).

En general es troba la presència predominant de DRB3*0301 en diverses malalties no específiques d'òrgan (Síndrome de Sjögren primari, OR 4-19). Altres associacions amb malalties sistèmiques són les que es presenten amb la Polimiàlgia reumàtica-Arteritis de cèl·lules gegants i DRB1*04 (OR 2-5), Arteritis de Takayasu-Martorell i B52 (OR 4-8)

sobretot en les formes més severes, Malaltia de Kawasaki amb B54 en Japonesos (OR 10-20) i B51 en caucàsics (OR 15-80).

Com a resum final cal remarcar que si bé determinar la tipificació HLA per a les malalties autoimmunitàries pot ser útil a l'hora de donar suport al diagnòstic, el genotip HLA per sí mateix no determina el desenvolupament o la protecció de cap malaltia. Els factors genètics que defineixen la susceptibilitat a una malaltia són diversos i l'HLA és només un més, tot i que en molts casos pot ser decisiu. En les malalties on el risc relatiu és elevat (OR >10), per bé que la presència d'un determinat al·lel HLA associat no és diagnòstica, la seva absència pot ajudar a excloure el diagnòstic, mentre que en els casos d'associació dèbil, l'estudi HLA pot ajudar en l'avaluació del risc familiar i en alguns casos en la valoració del pronòstic de l'agressivitat. En tot cas, és la integració de dades fisiopatogèniques el que ens ajudarà a entendre millor el paper de les associacions i en darrer terme a millorar les possibilitats terapèutiques i definir més detalladament el pronòstic dels pacients afectats.

Malaltia	Marcador HLA associat*	Risc Relatiu
Espondilitis anquilosant	B27	87,4
Artropaties reactives, incloent la síndrome de Reiter	B27	37,0
Artritis Reumatoide	DR4	4,2
Síndrome de Behçet	B51	3,8
Lupus eritematòs sistèmic	DR3	5,8
Diabetis tipus 1	DR3	3,3
	DQB1*0201	2,4
	DR4	6,4
	DQB1*0302	9,5
	DR2	0,19
	DRB*1501	
	DRB*0101	
	DQB1*0602	0,15
Malaltia d'Addison idiopàtica	DR3	6,3
Malaltia de Graves-Basedow	DR3	3,7
Tiroiditis de Hashimoto	DR11	3,2
Tiroiditis post-part	DR4	5,3

Malaltia	Marcador HLA associat*	Risc Relatiu
Celiaquia	DR3	10,8
	DQB1*0201	
	DQA1*0501	
	DR7, 11	6,0-10,0
	DR7, DQB1*0201	
	DR11, DQA1*0501	
Dermatitis herpetiforme	DR3	15,9
Síndrome Seca (Sjögren)	DR3	9,7
Miastènia gravis	DR3	2,5
	B8	3,4
Glomerulonefritis membranosa idiopàtica	DR3	12,0
Síndrome de Goodpasture	DR2	15,9
Esclerosi múltiple	DR2	4,1
	DRB1*1501	
	DRB5*0101	
	DQB1*0602	
Pènfing vulgar (risc relatiu entre els jueus Ashkenazi)	DR4	14,4
Psoriasi vulgar	Cw6	13,3
Retinocoroidopatia de Birdshot.	A29	109,0

Taula 2. Principals malalties autoimmunitàries associades a determinats al·lels HLA i el seu risc relatiu. Taula adaptada de [Klein, et al., 2000b].

II.II.2.2 Malalties relacionades amb absència de molècules HLA:

Un segon grup de malalties associades a les molècules HLA són les que són degudes a la manca d'expressió de molècules HLA (bé de classe I o de classe II). Aquest és el cas de la síndrome del limfòcit nu (BLS, *bare lymphocyte syndrome*). Normalment aquest tipus d'immunodeficiències són per manca o defecte en la síntesi d'alguna molècula necessària per la presentació antigènica, com seria el cas de manca de TAP en la deficiència de classe I, o bé per manca o defecte en algun dels factors de transcripció de classe II.

II.II.2.3 Malalties no immunitàries relacionades amb gens ubicats dins el MHC però que no afecta les molècules HLA (no molècules presentadores d'antigen)

La majoria de malalties associades amb gens ubicats al MHC no codificants per molècules presentadores d'antigen, tradicionalment han estat difícils de diferenciar de les associades directament amb els gens HLA. Això és degut a que els estudis d'associació de malalties amb el MHC s'han fet tipificant per loci HLA clàssics (A, B, C, DR, DQ, DP) i observant l'augment de freqüència d'un al·lel en un grup de pacients respecte al corresponent grup control. Ara bé, degut al fort desequilibri de lligament que hem vist que hi ha entre els gens d'aquesta regió no sempre es pot assegurar que no sigui un gen situat a la classe III o en les regions esteses del MHC el que confereixen la susceptibilitat o resistència a la malaltia i no el propi al·lel HLA.

En casos com la Narcolèpsia o l'Hemacromatosi s'han acabat descobrint aquests gens com a resultat de molts treballs de clonació i seqüenciació de les zones pròximes als al·lells HLA que s'hi veien associats. En el cas de la Narcolèpsia el responsable és el gen HCRTR2 localitzat entre els al·lells HLADQB1*0602, DQA1*0102 i per això ambdós al·lells presenten una correlació amb la forma més severa de la narcolèpsia. I en el cas de l'Hemacromatosi s'ha identificat un gen paràleg als gens de classe I que ha perdut la capacitat d'unir pèptid, HLA-HFE, que es troba en posició més telomèrica i en desequilibri de lligament amb HLA-A (les mutacions responsables de la malfunció de la malaltia s'associen a l'al·lel HLA-A3).

Avui en dia ja disposem de les eines necessàries per restringir les associacions a zones més concretes. Aquestes eines són el mapa de desequilibri de lligament del MHC i les bases de dades de SNPs d'aquesta regió, ja que coneixent el DL es poden seleccionar marcadors SNPs (TagSNPs) d'un haplotip determinat i més propers; per tant l'associació serà més precisa i restringida a regions més concretes.

II.II.2.4 Malalties infeccioses

Per a poder obtenir una resposta immunitària eficient contra un patogen, les molècules HLA han de ser capaces de presentar pèptids derivats d'aquest a les cèl·lules T. Però això no sempre és possible; depèn en part de a) les seqüències aminoacídiques que

puguin unir en el solc d'unió a pèptid i per tant de com les molècules HLA trobin d'accessible el proteoma del patogen i b) de l'existència a l'hoste d'algun limfòcit T que sigui capaç de reconèixer aquell HLA unit al pèptid. Quan una persona amb una tipificació HLA determinada no és capaç de complir ambdós requisits, esdevé més susceptible a aquella malaltia que una altra amb una tipificació diferent que sí que els compleix. Un exemple d'això, es dona en el cas de determinats al·lels de classe I (HLA B*53, que reduiria el risc un 40%) i II (HLA DRB1*1302/DQB1*0501) amb la protecció a la malària severa a l'Àfrica sub-Shariana [Hill, et al., 1991] [Hill, et al., 1992b].

II.II.3 LA PCR A TEMPS REAL

II.II.3.1 Fonaments i aplicacions

La base de la PCR a temps real és la detecció puntual a cada cicle del nivell de fluorescència que és incorporada en un amplímer que es va generant [Wittwer, et al., 1997, Wittwer, et al., 2001]; per tant, podem dir que, la PCR a temps real consisteix en una reacció d'amplificació que és monitoritzada mentre té lloc. La fluorescència que es detecta es genera a través de l'addició d'un fluorocrom a la mescla de la reacció, bé sigui un fluorocrom d'unió inespecífica a doble cadena de DNA o bé a través de l'addició d'oligonucleòtids marcats amb fluorocroms que s'hibriden amb l'amplímer que s'està generant. La monitorització continuada de tot el procés de PCR, fa possible no només observar la quantitat final d'amplímer, sinó que també s'obté informació de la cinètica del procés i del moment exacte en que es comença a generar l'amplímer (quan comença a augmentar la fluorescència). Donada l'exponencialitat del procés d'amplificació, aquesta cinètica descriu una corba sigmoïdal, que en funció de la quantitat inicial de motlle d'amplificació comença a ser detectada en cicles més primerencs (mostres concentrades) o tardans (mostres diluïdes). Aquest fet permet realitzar una quantificació exacte del producte inicial si es referencia a una recta patró de concentracions conegudes d'estàndards. La introducció de la PCR a temps real ha suposat l'obtenció d'una metodologia de PCR quantitativa molt precisa. Tot i la rellevància d'aquesta aplicació, cal dir que la metodologia de PCR a temps real també es pot utilitzar per a la genotipificació a nivell de SNPs, aquesta aproximació és la que es comentarà detalladament en els pròxims apartats.

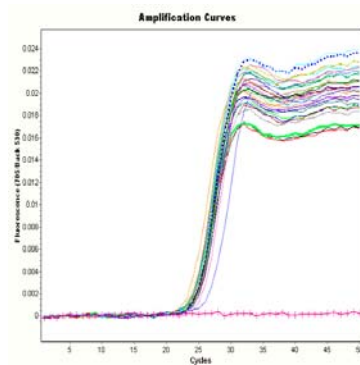


Figura 13. Exemple de la monitorització de l'augment de fluorescència durant l'amplificació en les reaccions de PCR a temps real.

Com hem dit la incorporació del fluorocrom a l'amplímer que es va creant es pot aconseguir utilitzant dos mètodes diferents: el primer és l'addició de Sybr Green I, i el segon és la utilització de sondes d'hibridació.

II.II.3.2 Detecció de fluorescència mitjançant la incorporació del fluorocrom Sybr Green I.

El fluorocrom Sybr Green I és un intercalant de DNA similar al Bromur d'Etidi però menys mutagènic [Singer, et al., 1999] i més sensible en la valoració fluorimètrica. Quan es troba unit al DNA la seva fluorescència augmenta uns 100 cops respecte a la que presenta la seva forma lliure. En la seva utilització a la PCR a temps real, cal tenir present que com a intercalant de DNA que és, el Sybr Green s'incorpora en tot el DNA de doble cadena que es va sintetitzant, incloent també els dímers d'encebadors que es generen i les amplificacions inespecífiques si existeixen. El seu espectre d'excitació de fluorescència té el màxim a 497 nm i el d'emissió es troba a 520 nm (es llegeix en el canal amb el filtre 530 dels equips Light Cycler™).

La utilització de Sybr Green I és la forma més senzilla de realització d'amplificacions en la PCR a temps real i el seu ús ha estat molt generalitzat per a la quantificació de transcrits. Cal dir però, que també es pot utilitzar per a la genotipificació, tot i que no a nivell de SNP, sinó de productes de composició diferents (longitud i composició de les bases).

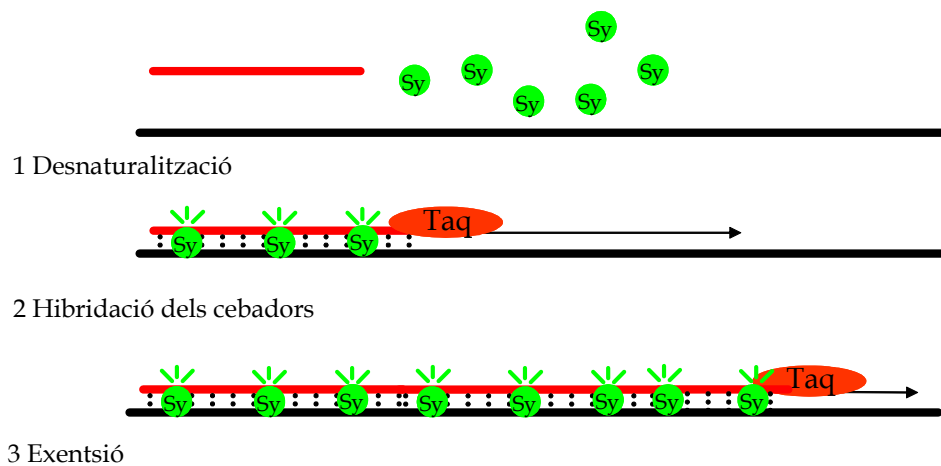


Figura 14. Esquematzació del funcionament de l'intercalant de DNA Sybr Green I. En el pas d'extensió és quan es veu més fluorescència.

II.II.3.3 Detecció de fluorescència mitjançant sondes d'hibridació

Les sondes d'hibridació emprades en les tècniques de PCR a temps real són oligonucleòtids específics d'amplímer (tenen una seqüència complementària a alguna zona de l'amplímer) marcats amb un (o diversos) fluorocrom(s). La fluorescència en aquest cas es detecta quan estan hibridats amb l'amplímer que es genera. Existeixen diferents formats de sondes d'hibridació que es poden aplicar a la PCR en temps real [Wittwer, et al., 1997], però en tots els casos aquestes permeten la monitorització exclusiva de l'amplímer específic que conté la seqüència complementària.

II.II.3.3.1 Sondes d'hibridació i hidròlisi

Les sondes Taqman® són oligonucleòtids de 18-22 pb que estan marcats amb fluorocroms en els seus dos extrems; normalment en 5' porten un fluorocrom *reporter* (reportador) i en el seu 3' porten un fluorocrom *quencher* (apagador), tot i que existeixen *quenchers* no fluorescents com els MGB (*Minor binding groove*) [Kutyavin, et al., 2000]. El funcionament de les sondes d'hidròlisi es basa en que la sonda sigui complementària a una de les dues cadenes de DNA que s'estan generant a la PCR i, quan els dos fluorocroms que porta estan propers (de 3 a 30 bases), no emeten fluorescència ja que el *quencher* apaga l'emissor. Però durant l'elongació del producte, la sonda està hibridada a la cadena de DNA que va generant la polimerasa i gràcies a l'activitat 5' exonucleasa de la Taq- polimerasa s'hidrolitza la sonda; llavors els

fluorocroms *reporter* i *quencher* ja no estan un al costat de l'altre i es comença a detectar la fluorescència emesa pel *reporter*.

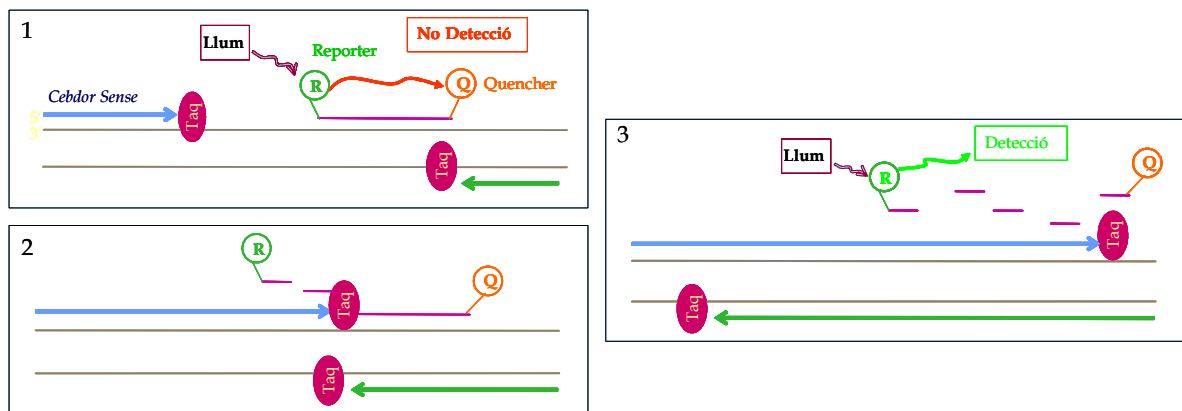


Figura 15. Esquema del funcionament de les sondes d'hibridació-hidròlisi.

Aquest tipus de sondes són molt utilitzades per a la quantificació, per que permeten la detecció específica de la seqüència de l'amplímer que s'està generant. A l'hora de genotipificar també es poden utilitzar, però només permeten detectar presència de la variant polimòrfica a la qual són totalment complementàries, ja que en el cas de presentar-se un canvi de base només es veu no-unió de la sonda i per tant manca de fluorescència. Així doncs és necessària una sonda Taqman per a cada polimorfisme a detectar. En funció dels canals de detecció dels quals disposi l'equip a utilitzar es poden combinar un nombre diferent de sondes TaqMan en cada tub (en aquest cas cal dir que per a diferenciar els polimorfismes cada sonda ha de portar un fluorocrom diferent).

II.II.3.3.2 Sondes d'hibridació

Una altra tipologia de sondes aplicades a la PCR a temps real és la de les sondes d'hibridació Light Cyler FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) [Wittwer, et al., 2001]. Consisteixen en dos oligonucleòtids adjacents (separats d'una a cinc bases), cadascun marcat amb un fluorocrom, on un dels dos fluorocroms actuarà com a donador de fluorescència i l'altre serà l'acceptor. Quan el donador és excitat per una font de llum es genera el fenomen de FRET i transfereix energia al fluorocrom acceptor que allibera llum en una determinada longitud d'ona, que es correspon amb un dels

canals de lectura de l'aparell de PCR en temps real [F1(530)-F2(640)-F3(705)]. En aquesta tipologia de sondes la fluorescència només es detecta quan ambdós oligonucleòtids estan units a la cadena de DNA complementària. Per a la genotipificació utilitzant la PCR a temps real amb aquestes sondes habitualment es requereix un pas addicional al de ciclat: és la generació de les corbes de fusió o pas denominat “*melting*”.

La generació de les corbes de fusió consisteix en la hibridació completa del producte generat i la seva posterior monitorització constant durant un procés lent i llarg de desnaturalització de l'híbrid creat (té lloc a una velocitat de 0,1 o 0,05 °C/s). Aquest procés permet conèixer de manera exacta la temperatura de fusió de l'amplímer (en unes condicions de reacció donades). Mitjançant Sybr Green també es poden obtenir corbes de fusió, però la genotipificació que s'obté és menys precisa que quan s'empren sondes FRET, tot i que també permet determinar diferències en quant a temperatura de fusió dels diferents amplímers [Marziliano, et al., 2000, Pirulli, et al., 2000].

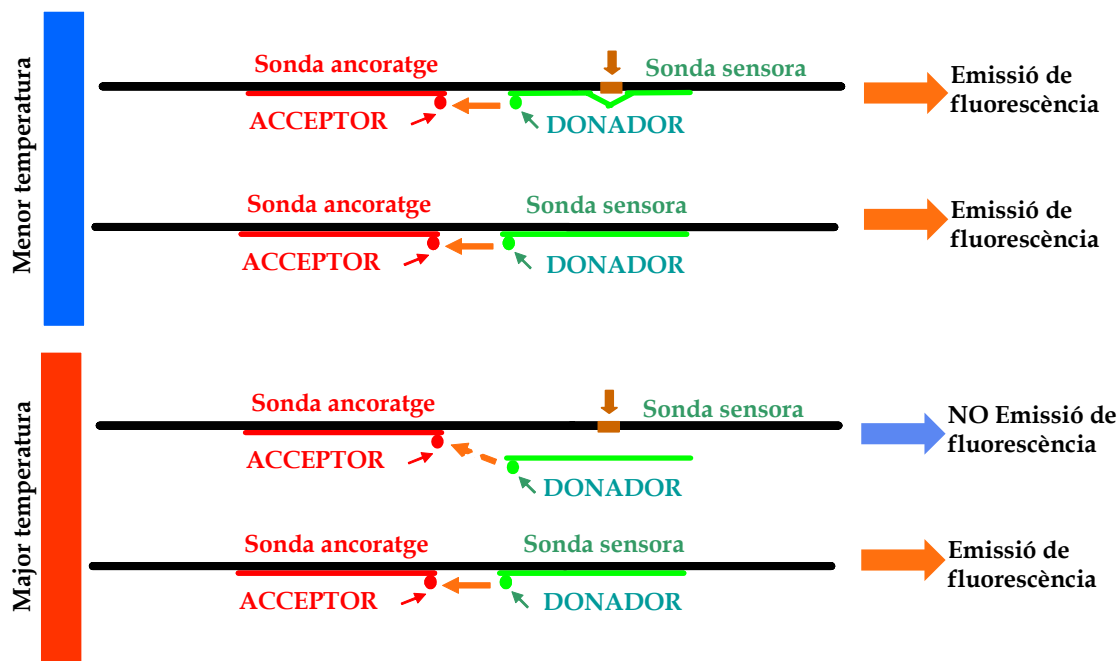


Figura 16. Esquema del funcionament de les sondes d'hibridació Light Cycler FRET.

Com ja hem dit amb les sondes d'hibridació s'obté una genotipificació molt més fina que amb Sybr Green, detectant diferències d'una sola base. Per detectar aquestes diferències a nivell de SNPs les sondes Light Cycler FRET funcionen de la següent manera: quan la cadena de DNA amplificada conté un canvi de base respecte a la seqüència de l'oligonucleòtid que fa funció de sonda sensora, en el procés

d'escalfament progressiu que és porta a terme en la generació de corbes de fusió, aquest oligonucleòtid és desenganxa abans de la cadena on està hibridat (per que no és totalment complementari). Això fa que s'observi una disminució de fluorescència més primerenca en el procés de fusió, i per tant s'observa una temperatura de fusió més baixa que la que s'observa per la cadena totalment complementària a la sonda. Mitjançant aquesta temperatura obtindrem informació de la seqüència dels amplimers i d'aquesta manera és possible definir els diferents polimorfismes.

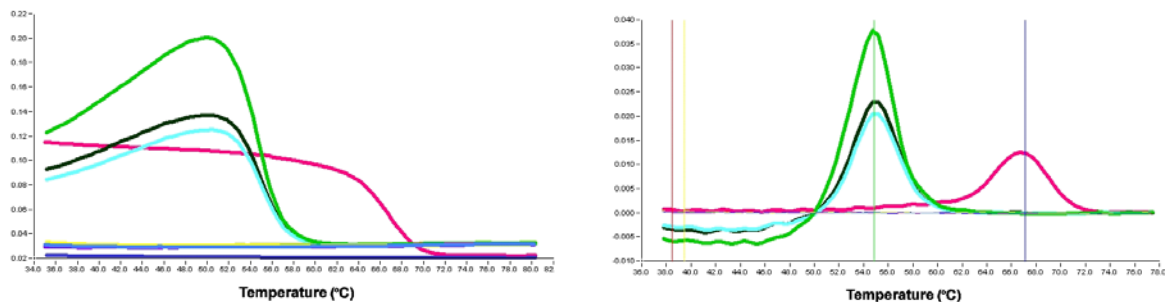


Figura 17. Exemple de la visualització de les corbes de fusió a la PCR a temps real amb sondes d'hibridació Light Cycler FRET.

II.III ESTRUCTURA I FUNCIO DE LES MOLÈCULES HLA

Tot i que les molècules HLA van ésser descobertes pel seu paper en el rebuig dels trasplantaments, la funció natural de les molècules HLA és la d'actuar com a molècules presentadores de pèptids antigènics als limfòcits T. Aquesta funció assegura l'avaluació de l'estat de les cèl·lules permetent conèixer si estan patint processos d'infecció tant vírics com bacterians o bé processos de transformació tumoral.

II.III.1.1 Molècules classe I

Les molècules d'HLA de classe I són les responsables de presentar pèptids provinents de patògens intracel·lulars als limfòcits-T CD8+, per tant d'informar de l'estat de la pròpia cèl·lula, per això s'expressen a gairebé totes les cèl·lules somàtiques. Estructuralment aquestes molècules són heterodímers, formats per una cadena peptídica pesada, d'uns 45 kDa, anomenada cadena α , codificada pel MHC, que a la superfície cel·lular es troba unida de forma no covalent a la β -2 microglobulina (un polipèptid de 11 kDa no codificat al MHC). La cadena α de les molècules de classe I està formada per cinc dominis: dos dominis d'unió a pèptid (α 1 i α 2), un domini de la

superfamília de les immunoglobulines ($\alpha 3$), una regió transmembrana i una cua citoplasmàtica. Els dominis d'unió a pèptid $\alpha 1$ i $\alpha 2$ són els més polimòrfics i a nivell gènic estan codificats pels exons 2 i 3; el domini $\alpha 3$ s'ha vist que és el que es veu involucrat amb la interacció amb el CD8 (molècula accessòria dels limfòcits T citotòxics).

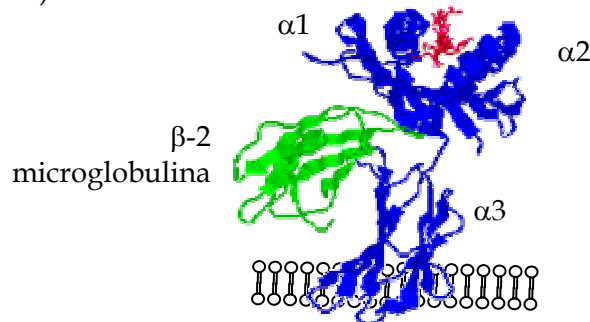


Figura 18. Esquema de les molècules MHC de classe I [extret de www.square.umin.ac.jp, amb modificacions].

En les cèl·lules, la presentació d'antígens via classe I depèn del procés de producció de residus cel·lulars. Aquestes molècules presenten pèptids citosòlics que provenen de la degradació de proteïnes que es troben a dins de la cèl·lula majoritàriament provinents de la via del proteosoma. Els pèptids generats al citosol són translocats al reticle endoplasmàtic, per transportadors específics com TAP, on són carregats a les molècules de classe I. Aquestes, un cop associades amb el pèptid, són transportades a la superfície cel·lular. Una gran proporció dels pèptids que presenten les molècules de classe I provenen de proteïnes pròpies de la cèl·lula i, quan les cèl·lules són infectades per algun patògen i les seves proteïnes són processades i degradades en la cèl·lula, només llavors una petita part dels pèptids encabits en el MHC-I passa a provenir del patògen. El complex MHC de classe I-pèptid (pMHC) és reconegut a la superfície cel·lular per limfòcits T CD8+, que en el cas de ser específics per un pèptid provinent d'un patògen poden arribar a produir la lisi de la cèl·lula infectada (citotoxicitat).

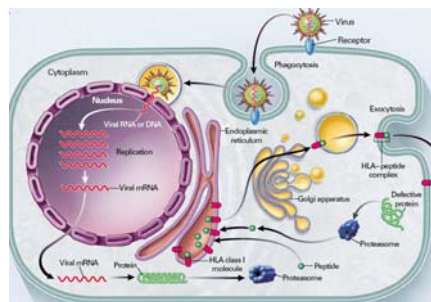


Figura 19. Representació esquemàtica del processament i presentació d'antígens via classe I. Esquema extret de [Klein, et al., 2000a].

II.III.1.2 Les molècules d'HLA de classe II:

Les molècules HLA de classe II són les responsables de presentar pèptids derivats de patògens extracel·lulars als limfòcits T que presenten el co-receptor CD4+. L'expressió de les molècules de classe II és restringida i es dona en les cèl·lules considerades com presentadores d'antigen (APC's) que principalment són: macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules B. També s'expressen en les cèl·lules epitelials tímiques per a que es pugui portar a terme la selecció tímica. En humans, els limfòcits T poden presentar-les després de la seva activació.

Estructuralment les molècules de classe II són heterodímers formats per dues cadenes (la α i la β) que són codificades al MHC, potencialment polimòrfiques ambdues i que s'associen entre sí de forma no covalent. En les dues cadenes trobem dos dominis extracel·lulars (α 1- α 2) i (β 1- β 2), una zona transmembrana i una cua citoplasmàtica; per tant ambdues cadenes s'uneixen a la membrana cel·lular. El domini amino-terminal de cada cadena forma part de la zona d'unió a pèptid α 1 - β 1 i la zona d'interacció amb el CD4 és la β 2. La cadena α pesa uns 33 kDa i en general està més conservada evolutivament, per tant és menys polimòrfica i de fet en alguns locus com és el cas del DRA pot ser pràcticament monomòrfica. La cadena β és més petita (28 kDa) i és la que és més polimòrfica, sobretot en el seu domini β 1 (que ve codificat a nivell gènic a l'exó 2).

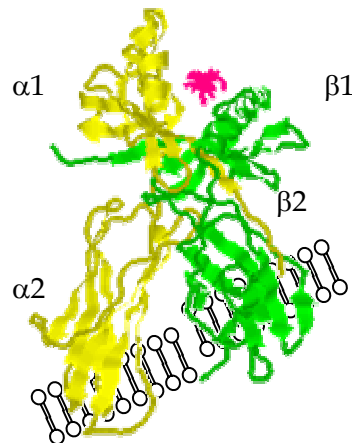


Figura 20. Molècules HLA de classe II [extret de www.square.umin.ac.jp, amb modificacions].

La presentació d'antígens via classe II depèn del procés de captació de proteïnes extracel·lulars i per tant de la degradació de substàncies incorporades a la cèl·lula per la via endocítica [Chicz, et al., 1992].

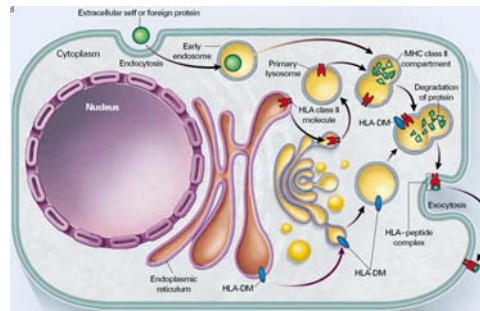


Figura 21. Representació esquemàtica del processament i presentació d'antígens via classe II. Esquema extret de [Klein, et al., 2000a].

II.III.1.3 La zona d'unió a pèptid

La zona d'unió a pèptid de les molècules HLA consisteix en una cavitat o solc on s'ubica el pèptid, situada a la part superior d'aquestes molècules. En les molècules de classe I està format només per la cadena α , però a les de classe II hi participen tant cadena α com la cadena β . L'estructura d'aquest solc és similar als dos tipus de molècules, tot i que hi ha algunes diferències concretes, que fan que, més enllà del distint origen, els pèptids que s'uneixen per classe I o classe II siguin diferents.

De manera genèrica el solc està format per un sol més o menys pla que consisteix en vuit cadenes de làmines-beta plegades antiparalel·les, i dues parets d'hèlix alfa també antiparalel·les. En el cas de classe I, les dues hèlix alfa acaben convergint en els extrems i formant un solc més tancat que comporta que els pèptids que són presentats per classe I siguin de mida restringida (8-10 aminoàcids) [Bjorkman, et al., 1987, Bjorkman, et al., 2005]. A les molècules de classe II aquest solc queda més obert, [Brown, et al., 1993] perquè no convergeixen les dues cadenes alfa, comportant que els pèptids encabits siguin més llargs (12-24), i de mides diferents, ja que poden penjar pels costats quan no hi caben a dins de la zona d'unió a pèptid [Rudensky, et al., 1991, Chicz, et al., 1992].

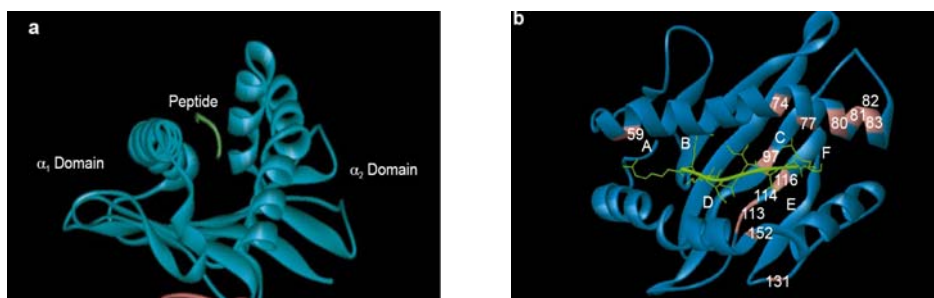


Figura 22. Esquema del solc d'unió a pèptid a les molècules HLA de classe I en concret d'HLA-B27. [extret de [Lopez-Larrea, et al., 1998]].

El solc d'unió està constituït per diferents subcavitats (*pockets*) que serveixen com a punts d'ancoratge pels pèptids que s'hi associen. Dins el solc, els pèptids adopten una conformació estesa, de manera que les cadenes laterals d'alguns residus queden encarades cap al solvent per a poder ser reconegudes pel TCR, mentre que d'altres queden cap al solc d'unió. Per aconseguir l'estabilització del pèptid, es formen ponts d'hidrogen entre residus conservats del solc de les molècules MHC i la cadena principal o els grups terminals del pèptid [Madden, 1995].

En el cas de les molècules de classe I, cada molècula té sis butxaques o cavitats (A-F), de les quals les involucrades en l'estabilització del pèptid són les que encabeixen residus situats en els extrems del solc (cavitats A i F); també intervénen en l'estabilització els grups N- i C- terminals lliures dels pèptids. Les butxaques B i F són les que determinen principalment quins pèptids es poden unir per un determinat al·lel de classe I. La variació dels aminoàcids que formen aquestes cavitats en diferents MHCs és el que confereix la seva especificitat d'unió.

D'altra banda, en les molècules de classe II les interaccions que permeten l'establiment de ponts d'hidrogen no es localitzen als costats, sinó al llarg de tota la cadena del pèptid. Les posicions que uneixen residus laterals dels pèptids units en el cas de classe II són: P1, P4, P6, P9, [en la figura 23 per DR1 es mostren els residus de les cadenes α i β que s'uneixen amb un pèptid de l'Hemaglutinina]. Els pèptids que pot encabir una determinada molècula HLA són molts i diferents en la seva seqüència, però tots entre ells han de compartir les posicions que ancoren el pèptid a dins del solc, és a dir han de compartir un motiu d'unió. Realitzant substitucions d'un en un de tots els aminoàcids d'un pèptid per alanina, s'ha analitzat quines són les posicions importants per a la unió en diferents al·lells tant de classe I com de classe II, i amb aquesta informació s'han descrit les matrius d'unió de pèptid de les diferents molècules HLA.

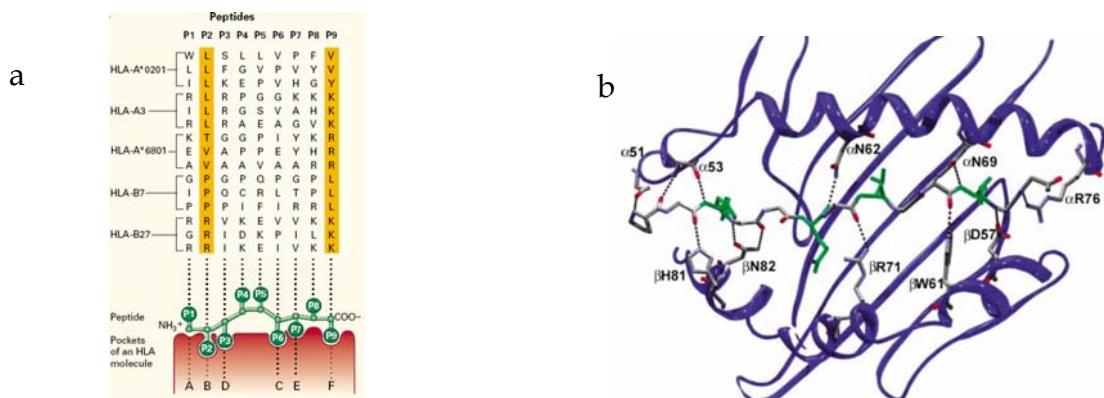


Figura 23. A) Cavitats d'unió de pèptid en les molècules de classe I. B) Solc d'unió de DR1 unit a un pèptid de l'hemaglutinina [extret de [Klein, et al., 2000a]].

II.III.2 MULTÍMERS D'MHC

Les molècules MHC (I i II) carregades amb un pèptid concret són reconegudes per un TCR específic, corresponent a un determinat limfòcit T. Així per conèixer l'especificitat de les cèl·lules T citotòxiques o bé les autorreactives, cal saber quin pèptid són capaces de reconèixer, però alhora s'ha de saber en quin context d'MHC determinat ho fan. No cal dir que conèixer aquestes dues informacions pot ser de vital importància, per exemple, per a la resolució dels mecanismes que causen algunes malalties autoimmunitàries o bé les respostes defectives a tumors. D'altra banda queda clar que per a poder desvetllar aquesta doble especificitat pèptid-MHC-TCR és fonamental tenir les eines adequades. En aquest sentit els multímers d'MHC han demostrat ser-ho ja que permeten elucidar l'especificitat d'un limfòcit T.

Tradicionalment la presència de limfòcits T específics d'antigen s'ha detectat indirectament, a través de la realització d'assajos funcionals on es valora si hi ha activació cel·lular que hagi estat produïda per un determinat antigen. Cal destacar d'entre aquests assajos com els que són més sensibles els d'anàlisi de la funció T basats en la detecció de síntesi de citocines (normalment interferó- γ), que es fan a través de la tinció intracel·lular o bé per captura en superfície (ELISpot). Les evidències que s'obtenen d'aquests assajos com ja hem dit són indirectes, però també cal destacar que estan sotmeses a una elevada variabilitat experimental. És comprensible doncs, que en aquest sentit, el desenvolupament de molècules MHC recombinants solubles que poden ser carregades amb pèptids coneguts hagi estat considerada tota una revolució, perquè permet la detecció directa dels limfòcits T específics.

Les primeres molècules MHC recombinants solubles van ésser desenvolupades a principis dels noranta [Garboczi, et al., 1992], i eren molècules de classe I expressades en *Escherichia coli* juntament amb el pèptid i la β 2-microglobulina. Ara bé, l'èxit d'aquestes primeres aproximacions va ser limitat, ja que es va veure que una sola molècula d'MHC carregada amb pèptid no era suficient per l'estabilització de la seva unió amb un TCR i no permetia la detecció específica de CTLs (Altman 1996). Aquest va ser el motiu per a començar a treballar amb molècules d'MHC-pèptid multimèriques, que s'obtenien a través d'addició de biotina a la molècula d'MHC I recombinant soluble, que combinada amb la multivalència de l'estreptavidina permetia la unió de diverses molècules MHC-pèptid formant un multímer (Altman 1996). D'aquesta combinació MHC-biotina-estreptavidina va aparèixer el nom de "tetràmers"

degut a que una estreptavidina és capaç de combinar 4 biotines de promig. Posteriorment s'ha vist que depenent de l'estreptavidina que s'utilitzi no només es dóna aquesta relació 1-4, sinó que es poden arribar a unir 13 biotines (Cameron 2002) amb una sola estreptavidina. Així la paraula més correcte per definir aquestes unions de diverses molècules d'MHC-pèptid seria la de multímers o bé oligòmers d'MHC-pèptid.

Tot i que com hem dit, els primers tetràmers que es van desenvolupar van ser els de classe I, avui en dia ja s'han desenvolupat també els de classe II. En els propers apartats explicarem les principals característiques de síntesi d'ambdues formes de tetràmers. De manera genèrica podem dir que aquestes noves eines sobretot han aportat una nova i eficient manera de fenotipar, quantificar i separar els limfòcits T específics d'antigen (tant CTL com CD4+) directament des de mostres biològiques, cosa que ha permès ampliar en gran mesura el coneixement que es tenia d'aquestes cèl·lules.

II.III.2.1 Tetràmers de classe I

La metodologia d'obtenció de tetràmers de classe I descrita per Altman et al. 96 és la que ha estat més àmpliament utilitzada i estandarditzada. Es basa en la producció de la cadena α del MHC recombinant en bacteries *Escherichia coli* i un posteriorment plegament *in vitro* conjuntament amb la β 2-microglobulina i el pèptid a avaluar. De manera breu, els passos a seguir són: a) la transformació de bacteries *Escherichia coli* amb un plasmidi que conté el cDNA codificant de la cadena alfa de la molècula de classe I (de l'al·lel que es vulgui obtenir el multímer), sense regió transmembrana però amb una seqüència en l'extrem carboxiterminal específica per a la biotinització enzimàtica, b) posteriorment es purifica el MHC sense pèptid dels cossos d'inclusió d'una clona d'*Escherichia coli* transformada i s'indueix el plegament *in vitro* de la molècula purificada en presència de β 2-microglobulina i del pèptid per a obtenir el pMHC-I soluble. Els passos finals consisteixen en incorporar a l'extrem carboxiterminal del pMHC-I soluble una biotina de manera covalent (a través de la utilització de l'enzim BirA) i multimeritzar els pMHC-I solubles amb la unió d'estreptavidina marcada amb un fluorocrom.

La principal aplicació dels tetràmers de classe I ha estat la detecció per citometria de flux dels limfòcits T CD8+ CTL específics en resposta a un antigen determinat, ahora

que han permès quantificar el nombre de limfòcits citotòxics existents per a un determinat antigen. Aquesta monitorització directa de la resposta T CD8⁺ ha estat possible gràcies a que quan hi ha resposta específica el nombre de cèl·lules T CD8⁺ circulants en sang s'incrementa, i en la situació més òptima es troba 1 limfòcit específic entre 10-100 limfòcits circulants. Aquest nivell extraordinàriament elevat ha permès utilitzar aquesta metodologia directament en mostres de sang per a valorar la magnitud de la resposta citotòxica enfront a un antigen. Un exemple d'aquesta aplicació és la valoració de la resposta T CD8⁺ en les malalties en que l'element citotòxic és l'element principal (com pot ser l'estudi d'antígens tumorals, per a la monitorització, fenotipat i correlació clínica dels pacients amb melanoma o en intents de desenvolupament de vacunes per tractament del càncer [Monsurro, et al., 2002]).

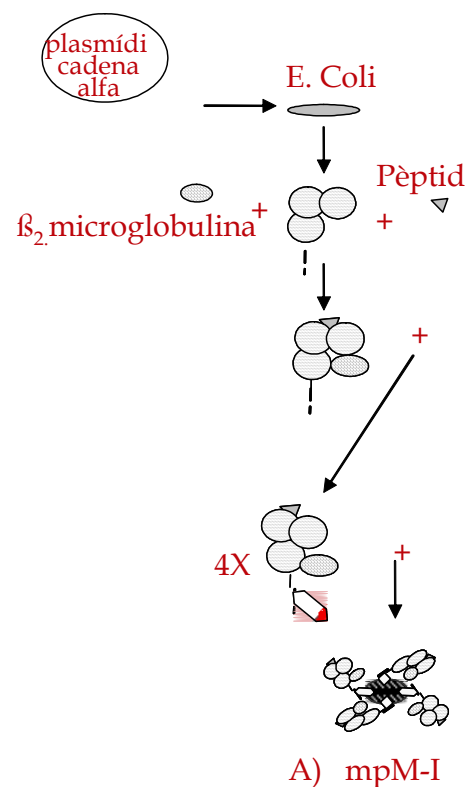


Figura 24. Esquema del procés de producció de tetràmers classe I.

II.III.2.2 Tetràmers de classe II

La metodologia per a la producció de tetràmers de classe II no és tant senzilla com la dels de classe I, això és degut en part a que són més difícils de plegar i d'estabilitzar *in vitro* les dues cadenes α i β, degut a que ambdues formen el solc d'unió a pèptid. Com

a conseqüència s'han descrit diverses aproximacions per a la síntesi de tetràmers de classe II, però totes han acabat utilitzant una mateixa aproximació per estabilitzar la unió de les cadenes α i β , l'ús de cremalleres de leucines complementàries.

Els primers tetràmers de classe II que es van descriure pel grup de la Dra P Marrak-eren murins. En aquesta primera aproximació el pèptid d'interès estava unit de manera covalent a la cadena β del MHC murí, per tal d'assegurar la seva col·locació en el solc peptídic durant el procés de síntesi [Kozono, et al., 1994, Crawford, et al., 1998]. Cal dir que els tetràmers resultants van ser utilitzats per a la detecció de limfòcits T específics en un ratolí que era transgènic pel TcR que reconeixia el MHC-pèptid produït, i com a conseqüència en aquest model de TcR transgènic la majoria de limfòcits T es tenien amb el tetràmer. En canvi en les respostes T CD4⁺ en humans, el nivell de limfòcits T específics circulants en sang pot ser molt baix (1:60000 1:100000) i per poder-les detectar es necessita un sistema molt més "fi", que sovint necessita d'una amplificació prèvia d'aquests precursors.

El protocol de síntesi de tetràmers de classe II d'MHC humans (i que ara és el més emprat) el va descriure el grup de WW Kwok (Novak et al 99), amb la diferència de que es sintetitzaven MHC-II buits i que posteriorment s'hi carregava el pèptid. Això va suposar un gran avantatge, ja que no s'ha de sintetitzar cada cop una molècula nova per a poder provar un pèptid antigènic. En aquesta metodologia (que és la que més tetràmers funcionals ha generat), s'aconsegueix l'estabilització de les cadenes α i β del MHC a través de la introducció (en els extrems carboxiterminals de les dues) de cremalleres de leucines complementàries, ubicades al lloc on anirien els dominis transmembrana i citòsolic del MHC. En una situació anterior i posterior a les cremalleres de leucines, hi ha seqüències espaiadores flexibles que donen elasticitat estructural a la molècula per tal de permetre la conglomeració dels TCR quan es dona l'activació. La producció d'aquestes molècules s'aconsegueix per transfecció estable de les cadenes α i β en cèl·lules de *Drosophila melanogaster*. A partir del sobrenedant d'aquest cultiu es purifiquen les molècules solubles a través de la utilització d'una columna d'afinitat amb anticòs específic (anti DR). La cadena beta del MHC incorpora una zona de biotinització (15 aminoàcids que són reconeguts per l'enzim biotinitzador BirA), ubicada després de la seqüència de cremallera de leucines i el corresponent espaiador. Es pot utilitzar la biotinització *in vivo* de les molècules (i així el producte purificat per la columna d'afinitat ja està biotinat) o bé es pot fer una biotinització *in vitro* posterior a la purificació. Cal dir que el monòmer produït pot ser

guardat buit per carregar-lo posteriorment amb el pèptid d'interès. Un cop carregat amb el pèptid, el pMHC biotinat es combina amb l'estreptavidina (marcada amb un fluorocrom, normalment ficoeritrina per la seva intensitat) i ja es pot utilitzar per a la detecció de limfòcits T CD4+ específics.

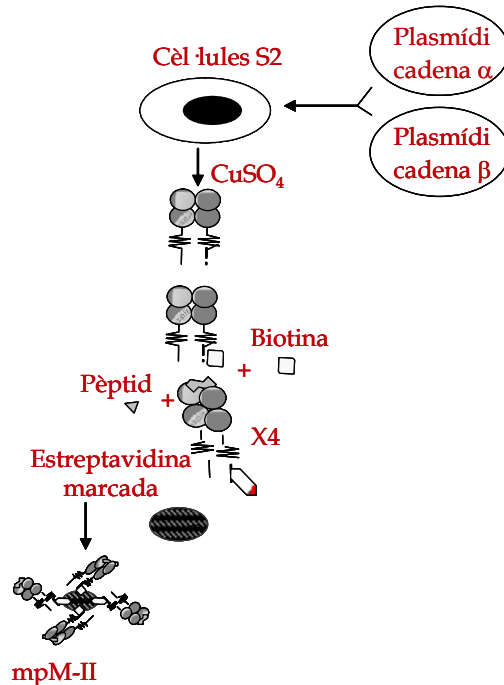


Figura 25. Esquema del procés de producció de tetràmers classe II.

Tot i que aquesta és la metodologia més àmpliament utilitzada, s'han descrit altres aproximacions per a la producció de tetràmers de classe II en cèl·lules d'*Escherichia coli*, [Cameron, et al., 2002] o en cèl·lules d'insecte no drosofiliques.

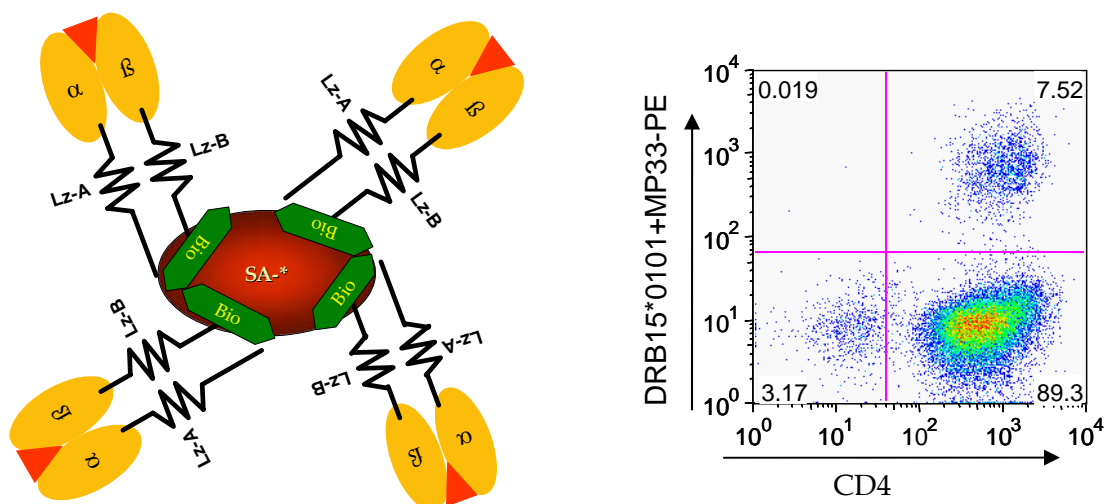


Figura 26. A) Esquema d'un tetràmer de classe II. B) Exemple de detecció mitjançant citometria de flux de limfòcits T específics.

II.III.2.3 Utilitats dels tetràmers

Les aplicacions dels tetràmers tant de classe I com de classe II són variades, però sempre limitades a l'anàlisi de la resposta immunitària i dels limfòcits T. Aquests reactius, com hem dit es poden utilitzar per identificar i quantificar els limfòcits T implicats en la resposta a un pèptid en el context d'un MHC determinat i per tant són eines potencialment útils per identificar els antigens implicats en una patologia determinada. També, gràcies a que és un marcatge de superfície, permet arribar a aïllar els limfòcits T específics i estudiar-ne la seva funcionalitat, bé sigui a través de posteriors assajos d'estimulació, proliferació o d'inducció d'apoptosi. En aquest sentit, una de les aplicacions més àmpliament utilitzada alhora que "bàsica" per a l'estudi d'una resposta T específica, és el TGEM (*Tetramer-Guided Epitope Mapping*). Consisteix en descobrir quin és el pèptid antigènic en la seqüència aminoàcida d'un determinat antigen pel qual es coneix que hi ha una resposta cel·lular T. Per això s'han de sintetitzar pèptids que cobreixin la seva seqüència sencera i estimular amb aquests pèptids cèl·lules de l'individu (per amplificar la població T específica); alhora es carreguen amb els grups de pèptids els tetràmers i s'analitza per a quin grup de pèptids es dona la resposta. Quan s'obté informació a nivell d'un grup es proven els pèptids individuals carregats al tetràmer que conformen aquell grup.

En aquest punt, cal dir que una limitació per a l'aplicació general dels tetràmers és que són específics d'al·lel HLA, per tant són uns reactius que s'han de fer "a la carta" del pacient per a poder mesurar en ell el nivell de resposta a un antigen. Això és una limitació de moment, per que tot i la gran diversitat d'al·lells HLA que existeixen, no tots tenen la mateixa freqüència i s'ha calculat que amb uns 100 tetràmers es podria monitoritzar la resposta T utilitzant tetràmers per un 98% de la població caucàsica.

D'altra banda, una de les aplicacions que actualment no és factible però que és potencialment intrínseca a aquesta tècnica, és fer possible la inducció de respostes immunitàries modificades, induint tolerància (deguda a la potencial provocació d'anèrgia o apoptosi limfocitària) dels limfòcits T reactius a través d'utilitzar la interacció específica entre MHC/pèptid i TCR. Això suposaria aconseguir la deleció selectiva de cèl·lules al·loreactives tant per malalties autoimmunitàries com per a poder prevenir el rebuig en els trasplantaments d'òrgans. Tot i que en alguns models experimentals de trasplantament s'han utilitzat molècules d'MHC solubles per suprimir els limfòcits al·loreactius, la seva eficàcia està limitada degut a la baixa

afinitat de la unió d'un únic MHC-pèptid al TCR (Wang et al 96). En aquest sentit serien les interaccions pMHC multimèriques amb un grau més elevat d'afinitat pel TCR els candidats ideals per a portar a terme la selecció. De fet, aquesta aproximació s'ha provat en models animals utilitzant complexos dimèrics/trimèrics per induir una tolerància antígen-específica en cèl·lules T *in vivo* [O'Herrin, et al., 2001, Maile, et al., 2001]. Tot i que encara estem en etapes inicials del desenvolupament dels tetràmers com a eines terapèutiques, la potencialitat d'aquests reactius és clara i molt elevada. Per tant en conjunt podem dir que els tetràmers ofereixen grans expectatives per al futur del tractament de les malalties associades amb una disfunció en la resposta dels limfòcits T.

III HIPÒTESI DE TREBALL

III.I HIPÒTESI DE TREBALL

Les metodologies que s'utilitzen avui en dia en els laboratoris HLA per a la tipificació-anàlisi d'aquestes molècules, tant a nivell gènic com a nivell de la seva funcionalitat, són diverses. Tot i l'eficaç implantació que han tingut algunes d'aquestes tècniques en la pràctica diagnòstica, totes les metodologies descrites presenten aspectes tècnics amb limitacions i problemes associats. Per tant, tot i ser emprades i per tant òbviament útils, totes aquestes tècniques són al menys potencialment millorables.

La hipòtesi d'aquesta tesi justament es deriva d'aquesta evidència: **Metodològicament és possible aprofundir en tècniques que resolguin les limitacions de les genotipificacions HLA actuals i també en eines que permetin una millor definició funcional del reconeixement dels limfòcits T CD4+ envers aquestes molècules HLA.** D'una manera més precisa, en funció de la utilitat que tenen les tècniques que es volen aplicar a l'estudi de les molècules HLA, la nostra hipòtesi es pot precisar en forma de dues **hipòtesis concretes**:

- A. En relació a les tècniques de tipificació, es planteja que la monitorització directa de l'amplificació que facilita **la metodologia de "PCR a temps real"** combinada amb sondes d'hibridació (que permeten definir diferències a nivell de seqüència nucleotídica), **és una eina capaç de resoldre l'elevat polimorfisme de les molècules HLA**, alhora que permet superar determinades limitacions (nombre alt de reaccions per tipificació, temps de processat llarg, risc de contaminació creuada post-PCR, ...) de les tècniques de genotipificació HLA actualment en ús.

- B. En relació a les metodologies utilitzades per a l'estudi de la funcionalitat de les molècules HLA, es postula que **la utilització de tetràmers de classe II dels "loci secundaris" de DRB (específicament DRB3) és una aproximació que ha de permetre estudiar la resposta T CD4+ en un major nombre d'individus o mostres donat el seu menor polimorfisme i a la seva presència en diversos haplotips de DRB1, alhora que possibilita que es defineixi específicament el seu paper (fins ara considerat secundari) en la presentació de pèptids antigènics als limfòcits T CD4+.**

IV.I OBJECTIU

Tot i que, partint de la hipòtesi postulada anteriorment, es pot dir que l'objectiu general de la tesi és el **desenvolupament de metodologies que permetin una millor tipificació HLA i una més àmplia definició funcional del reconeixement TCR-HLA DR** (OBJECTIU GENERAL comú), cal dividir els objectius de treball al menys a dos nivells:

IV.I.1 Tipificació HLA (OBJECTIU GENERAL 1)

En referència a la millora de les metodologies de tipificació HLA, l'objectiu d'aquest treball és dissenyar un sistema de tipificació, basat en l'ús de la PCR en temps real amb sondes d'hibridació, com a metodologia per a l'estudi HLA-malaltia (HLA-B27) i per a la definició genèrica del polimorfisme HLA en loci tant de classe I (HLA-B) com de classe II (HLA-DRB).

De manera més concreta plantegem els següents **OBJECTIUS ESPECÍFICS**:

1 Genotipificació per a determinar de manera concreta una especificitat HLA (estudi HLA i malaltia).

Resoldre el polimorfisme HLA en una especificitat serològica d'elevada rellevància clínica, com és la família al·lèlica HLA-B27.

2 Genotipificació i definició del polimorfisme en un locus HLA de classe I.

Establir un protocol per a la genotipificació del locus HLA-B amb sondes d'hibridació de tipus FRET, que permeti obtenir una elevada resolució i alhora reduir algunes de les limitacions (temps de realització, nombre de tubs i sondes utilitzats) de les metodologies convencionals de tipificació.

3 Genotipificació i definició del polimorfisme en un locus HLA de classe II.

Establir un protocol per a la tipificació del locus HLA-DR amb sondes d'hidròlisi tipus Taqman®, que permeti obtenir una elevada resolució, així com reduir algunes de les limitacions (nombre de tubs i sondes utilitzats, passos a realitzar...) de les metodologies de tipificació convencionals.

4 Establir criteris d'avaluació de les metodologies emprades.

- Valorar la utilitat d'aquesta metodologia en la tipificació dels loci HLA en general, en relació als avantatges que aporten respecte a altres metodologies convencionals.
- Avaluar les dues variants de sondes d'hibridació utilitzades (sondes d'hibridació FRET i Taqman®) i establir quina opció és més adient en base als resultats obtinguts amb les dues metodologies de sondes per a la resolució del polimorfisme HLA.

IV.I.2 Anàlisi de la funcionalitat de les molècules DRB3: Tetràmers d'HLA-DRB3 (OBJECTIU GENERAL 2)

En referència a la millora de les metodologies per a l'anàlisi de la funcionalitat de les molècules HLA, l'objectiu del present treball és generar tetràmers de DRB3, per a valorar la participació del locus DRB3 en la presentació d'antígens als limfòcits T CD4+, avaluant per tant la magnitud d'aquesta resposta en relació amb la que es dona per a les molècules de DRB1 de l'haplotip corresponent. De manera més concreta plantegem els següents **OBJECTIUS ESPECÍFICS**:

1 **Produir tetràmers** dels dos al·lels més freqüents en la població caucàsica de DRB3 (*0101, *0202), mitjançant l'ús de la metodologia descrita inicialment (Novak et al ;1999) amb algunes adaptacions.

2 **Utilitzar els tetràmers generats per a analitzar si hi ha pèptids antigènics que són presentats en el context de DRB3** i reconeguts per limfòcits T CD4+.

3 En el context de la resposta a un antígen determinat, **valorar la presència de limfòcits T CD4+ específics que el reconeguin en DRB3, comparant-la amb el nombre de limfòcits T CD4+ específics que reconeixen en el DRB1 corresponent a l'haplotip.**

V.I.1 1 Consideracions inicials al capítol I: Tipificació HLA-B27

Tal i com s'ha comentat en l'apartat d'hipòtesi, la introducció de la tècnica de la PCR a temps real combinada amb les sondes d'hibridació FRET, és una eina capaç de resoldre algunes de les limitacions de les tècniques de genotipificació d'HLA-B27 actualment en ús. De forma concreta, l'aplicació d'aquesta metodologia hauria de permetre:

1. Aconseguir una major resolució de tipificació utilitzant el mínim nombre de reaccions d'amplificació:
 - Mitjançant la combinació de diferents sondes en un mateix tub.
 - Mitjançant la utilització d'una mateixa sonda per a resoldre més d'una variant polimòrfica (sempre que el polimorfisme estigui situat en la zona on hibrida la sonda sensora).
2. Disminuir el temps de processament de la tècnica, tant per una disminució del temps de ciclat i d'anàlisi, com per a l'eliminació de les manipulacions post-PCR.
3. Eliminar el risc de contaminació per producte de PCR (ja que l'amplímer queda tancat en el tub).

V.I.1.1 Per tant s'ha pretès dissenyar un sistema de tipificació d'HLA B27 basat en l'ús de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació Light Cycler FRET, centrant-se en la resolució dels següents punts:

1. Dissenyar encebadors que permetin diferenciar la família HLA-B27 de la resta d'al·lels HLA, i que siguin aplicables a la PCR a temps real. Aquests encebadors s'han de coamplificar amb un gen control (per tal d'assegurar a cada tub la presència de DNA).
2. Aplicar sondes de tipologia Light Cycler FRET per hibridar amb els amplímers específics d'HLA-B27. Aquestes sondes es dirigiran a les seqüències polimòrfiques per tal de permetre:
 - Identificar els al·lels HLA-B27 més freqüents en la població caucàsica.
 - Discriminar els al·lels associats a la malaltia autoimmunitària Espondilitis Anquilosant (EA) dels no associats (B*2706, B*2709) i del suposadament no associats (B*2703)

- Aconseguir una discriminació dels al·lels HLA B27 que sigui poblacionalment significativa, alhora que comporti el mínim esforç de realització i optimitzant també el cost econòmic.
3. Conèixer les ambigüitats de tipificació que genera el sistema en possibles mostres heterozigotes (dos al·lels HLA B27 simultanis, iguals o diferents).
 4. Validar el sistema en mostres normals enviades a tipificar amb finalitat diagnòstica (comparant-les amb altres mètodes convencionals de tipificació).

V.I.2 Resum (traducció adaptada del resum de l'article)

Són diversos els sistemes de genotipificació HLA basats en la PCR que s'utilitzen actualment, però no n'hi ha cap que sigui completament satisfactori. La introducció de la PCR a temps real (rt-PCR) amb sondes FRET aporta una eina molt potent per superar alguns dels inconvenients de les metodologies actuals, com són els temps de processament llargs i la necessitat de passos post-PCR. Aquí presentem evidències de que el principi de la fluorotipificació-FRET permet resoldre les variants d'HLA-B27, donant una major resolució en menys temps que les tècniques que són actualment utilitzades. El protocol utilitza d'una a tres reaccions d'amplificació consecutives en funció de la resolució requerida. La primera reacció, dirigida a detectar les mostres HLA-B27-positives, utilitza com a control la coamplificació amb la beta-globina. La segona reacció, dirigida a resoldre els al·lels més freqüents de B27, utilitza dues sondes d'hibridació, les corbes de temperatures de fusió de les quals, permeten la classificació dels al·lels HLA-B27 en vuit grups. Afegint una tercera reacció fins i tot els rars al·lels associats o no associats a l'Espondilitis anquilosant poden ser discriminats. La tècnica va ser avaluada a cegues en 60 mostres de individus prèviament tipificats per tècniques de PCR-SSO i reconfirmades per PCR-SBT (30 B27+, 30 no-B27). Hi va haver una concordància total, confirmant la potencialitat d'aquesta nova aproximació per a la tipificació clínica d'HLA-B27 i per la tipificació HLA en general.

V.I.3 Article HLA-B27 (Human Immunology 65: 826-838)



HLA-B27 Genotyping by Fluorescent Resonance Emission Transfer (FRET) Probes in Real-Time PCR

Rosa Faner, Natàlia Casamitjana, Roger Colobran, Anna Ribera, Ricardo Pujol-Borrell, Eduard Palou, and Manel Juan

ABSTRACT: Several polymerase chain reaction (PCR)-based human leukocyte antigen (HLA) genotyping methods are in use, but none is fully satisfactory. The introduction of real-time PCR (rt-PCR) with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes provides a powerful tool to overcome the drawbacks of current methods such as the long processing time and the requirement for post-PCR manual procedures. Here we present evidence that the FRET-fluorotyping principle may resolve HLA-B27 variants, providing a higher resolution in less time than the techniques currently in use. The protocol uses between one and three consecutive amplification reactions depending on the resolution required. The first reaction, aimed at detecting HLA-B27-positive samples, uses β -globin coamplification as control. The second reaction, aimed at resolving most frequent B27 alleles, uses two hybridization probes whose

melting temperatures curves allow the classification of HLA-B27 alleles into eight groups. By adding a third reaction, even the rarest alleles associated and not associated to ankylosing spondylitis (AS) may be discriminated. The technique was blindly tested on 60 samples from individuals previously typed and confirmed by standard PCR sequence-specific oligoprobes-PCR sequence and PCR-based typing PCR-SBT (30 B27+, 30 non-B27). There was a complete concordance rate, thus confirming the potential of this new technique for clinical HLA-B27 typing and for HLA typing in general. *Human Immunology* 65, 826-838 (2004). © American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2004. Published by Elsevier Inc.

KEYWORDS: Fluorotyping; HLA-B27; real-time PCR; donor-acceptor; melting

ABBREVIATIONS

AFLP amplified fragment length polymorphism
AS ankylosing spondylitis
FRET fluorescence resonance energy transfer
HLA human leukocyte antigen
PCR polymerase chain reaction
PCR-SBT polymerase chain reaction-sequence-based typing

PCR-SSO polymerase chain reaction-sequence-specific oligoprobes
PCR-SSP polymerase chain reaction-sequence-specific primers
rt-PCR real time-polymerase chain reaction
TM melting temperature

INTRODUCTION

Human leukocyte antigen (HLA) typing by polymerase

chain reaction (PCR)-based methods has become a widely used alternative to serologic methods in clinical practice. The most common PCR-based HLA typing methods in-

From the Laboratory of Immunobiology Research and Applications to Diagnosis (LIRAD), Serveis Sanitaris de Referència-Centre de Transfusió i Banc de Teixits (SSR-CTBT), Badalona, Barcelona (R.F., N.C., R.C., A.R., R.P.-B., E.P., M.J.), and Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Barcelona, Spain (R.F., R.C., R.P.-B., M.J.), Institut d'Investigació en ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona (R.F., R.C., R.P.-B., M.J.).

Address reprint requests to: Dr. Manel Juan, Immunologia (LIRAD)/SSR-CTBT, Hospital Universitari Germans Trias Pujol, Ctra de Canyet s/n, 08916 Badalona (Barcelona), Spain; Tel: 34-93-497-88-92; Fax: 34-93-497-89-78; E-mail: Manuel.Juan@uab.es

Supported by a grant from the "Fundació La Marató de TV3," (project

number 00/4830), and by the Institut de Salut Carlos Tercero RC03/03. R.F. is a recipient of a fellowship from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2002 FI/00765) by the Department of Universities, Research and Society of Information. R.C. is the recipient of a fellowship from the Spanish Ministry for Science and Technology (SAF2000-0050). This work is in process of a patent (application number 2004000009).

Received March 1, 2004; revised May 10, 2004; accepted May 19, 2004.

Human Immunology 65, 826-838 (2004)
© American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2004
Published by Elsevier Inc.

0198-8859/04/\$-see front matter
doi:10.1016/j.humimm.2004.05.009

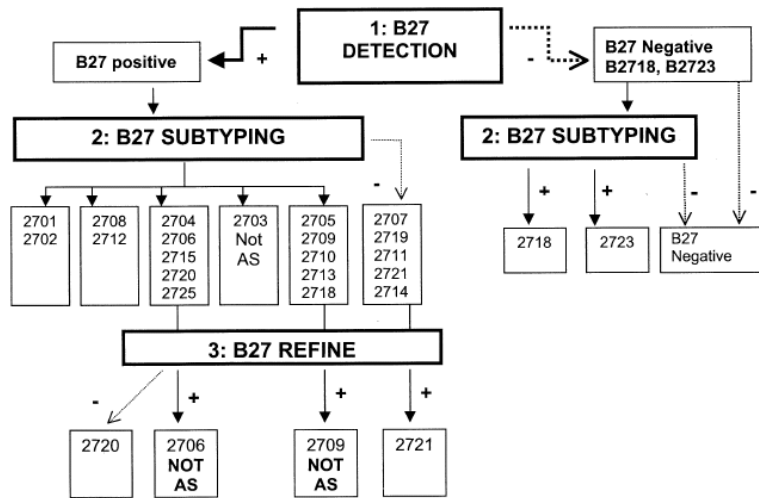


FIGURE 1 Conceptual diagram from human leukocyte antigen (HLA)-B27 genotyping based on our one-, two-, or three-tubes approach (B27-detection, B27-subtyping, B27-refine). HLA-B27 discriminated alleles are defined in the squares. Their lack of association with ankylosing spondylitis is also indicated in the corresponding square. Dotted arrows are used for negative discrimination (lack of signal in the B27 analysis).

clude PCR with sequence-specific primers (SSP) [1–3], PCR with sequence-specific oligonucleotide hybridization (SSO) [4], and PCR–sequence-based typing (SBT) (sequencing of amplified product). Although successfully applied to HLA-typing laboratory practice, these techniques require time-consuming post-PCR steps and are at risk of post-PCR contamination. The introduction of the real-time (rt) PCR technique combined with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes provided a potentially powerful tool to overcome these limitations. In this study, we analyzed the effectiveness of FRET fluorotyping for HLA-B27 variant typing.

Usually, HLA-B27 typing is carried out by PCR-SSP, and subtyping requires several additional PCR-SSP [5], PCR-SSO, or amplified fragment length polymorphism (AFLP) procedures [6]. PCR-SBT is also used to resolve ambiguities. All these situations require post-PCR manipulation of the samples, which entails a significant risk of contamination. Several protocols for typing HLA-B27 by rt-PCR with SYBR green I have been developed to avoid gel electrophoresis and to shorten processing time [7, 8]. These protocols do not allow subtyping or allele-specific analysis to avoid ambiguous results [9].

The prevalence of HLA-B27 alleles in the Caucasian population ranges from 3% to 8% [10]. The great clin-

ical interest for these alleles arises from their strong association with a group of rheumatic diseases, the spondyloarthropathies [11], among which ankylosing spondylitis (AS) is associated with B27 with a relative risk of 95%, the highest risk of all HLA-disease associations [12, 13] and one of the few in which an HLA class I allele increases susceptibility. To date, 24 subtypes of the HLA-B27 allelic group [14] have been described; some of them are strongly associated to AS, whereas others are not associated or may even provide protection. There is no satisfactory explanation for these associations [13], but HLA-B27 has become the best marker for the diagnosis of these groups of diseases for which there is no alternative autoantibody or biologic marker. Case-control studies established that subtypes B*2705, B*2702, B*2707, and B*2704 have a clear and strong association with the disease [15]. B*2705 is the only one of these alleles that is widely distributed among the population [16, 17]. In some populations (*i.e.*, Sardinian and Thai), subtypes B*2709 and B*2706 are not associated with AS, whereas the association between B*2703 and AS remains unclear among West Africans [13, 16] the Fula group of Gambia. Our FRET-rt-PCR protocol resolves the most frequent B27 alleles in our population by using only two reactions. An even higher clinically relevant discrimination level may be obtained by the inclusion of a third PCR reaction (Figure 1).

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

Nine HLA-B27+ lymphoblastoid Epstein-Barr virus-transformed cell lines homozygous and heterozygous (Ta-

TABLE 1 Genotyping (locus B) of tested cell lines

Cell line	Allele 1	Allele 2
LH	B*2701	B*08
R34	B*2702	B*18
CH	B*2703	B*18
WE-WAK1	B*2704	B*15
HOM2	B*2705	B*2705
LG2	B*2705	B*2705
PAR	B*2706	B*48
RQ	B*2708	B*08
CI	B*2709	B*38

ble 1) for the HLA-B*2701 to B*2709 alleles (LH, R34, CH, WE-1, HOM-2, LG-2, PAR, RQ, and CI kindly provided by Dr. Lopez de Castro, Madrid, Spain) were used as positive controls. The cells were grown in RPMI 1640 tissue culture medium (Whittaker, Walkersville, MD) containing 10% fetal calf serum (FCS, Gibco BRL Products, Cheshire, UK), 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Merelbeke, Belgium), 100 UI/ml penicillin (Normon Laboratories, Madrid, Spain), and 0.1 mg/ml streptomycin (CEPA, Madrid, Spain). Additionally, 60 clinical samples from bone marrow, solid organ transplant donors, or healthy individuals, half of them known to be HLA-B27-positive by PCR-SSP and SBT, were analyzed using this new technique.

Genomic DNA was obtained using a standard salting-out procedure [18] and was usually diluted (up to 0.05 µg/ml) with TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). All the samples (cell lines and donor cells) had previously been typed for HLA-B27 by PCR-SSP and reanalyzed by PCR-SBT.

rt-PCR Reactions

All rt-PCR reactions were performed in a LightCycler Instrument (Roche, Mannheim, Germany) by combining amplification with specific primers (sequences specified in Table 2) and detection with fluorochrome. The following three steps are proposed for complete B27 genotyping.

B27 detection. Two different protocols were successfully applied to detect B27 alleles: one using detection probes (called "B27 detection") and another using SYBR green I dye (called "B27-Sybr detection").

The first approach (B27 detection) consisted of a PCR-SSP-based reaction for HLA-B27 monitored by FRET probes (B27 detection anchor LC-Red640-labeled probe and B27-detection fluorescein-labeled sensor probe). As DNA amplification control, we used primers specific for the β-globin gene (β-globin S and β-globin AS), generating a 248-bp product also monitored with FRET probes (CTW FL LC-Red705-labeled anchor

TABLE 2 Primers and probes used in the reactions

Primer	Sequence	Orientation	Temperature
149c*	5' TACGTGGACGACACGCT 3'	Sense	61°C
273c*	5' TGTGCCTTGGCCTTGC 3'	Antisense	62°C
273c2*	5' GTGCCTTGGCCTTGC 3'	Antisense	61°C
273c3	5' AGTCTGTGTGTTGGTCTTGC 3'	Antisense	60°C
β-globin S	5' TACGGCTGTCATCACTTAGAC 3'	Sense	59°C
β-globin AS	5' CTTTCATCCACGTTACCT 3'	Antisense	62°C
127c	5' GCCCGCTTCATCACC 3'	Sense	64°C
362c	5' CACGTCGCAGCCATACATAT 3'	Antisense	63°C
204	5' GCCCGCGGCTCCTCT 3'	Antisense	69°C
344c	5' TCCAGGGTCTCACACCC 3'	Sense	62°C
462	5' CGGCGGTCCAGGAGCT 3'	Antisense	68°C
462d	5' CCGCGGTCCAGGAGCT 3'	Antisense	60°C

FRET probes	Sequence	Labeling	Temperature
B27-Det_anchor	5' TGAGGTTTCGACAGCGACGCC 3'	LC-Red 640	72.3°C
B27-Det_sensor	5' CGAGTCCGAGAGAGGAGCC 3'	Fluorescein	67.5°C
S1 sensor	5' AGAGGACCTGCCGACCTTGC 3'	Fluorescein	69°C
S1 anchor	5' GCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGG 3'	LC-Red 640	72°C
S2 sensor	5' GGAGCATTGGGACCGGGAG 3'	LC-Red 705	69°C
S2 anchor	5' CGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGG 3'	Fluorescein	72°C
S3 sensor	5' GTACCACAGCACGCCT 3'	Fluorescein	68°C
S3 anchor	5' CGACGGCAAGGATTACATCGCCCT 3'	LC-Red 640	72°C
CTW FL	5' CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA 3'	Fluorescein	75°C
CTW LC	5' AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA 3'	LC-Red 705	74°C

* Positions of primers previously described by Olerup [26] with differences in length.

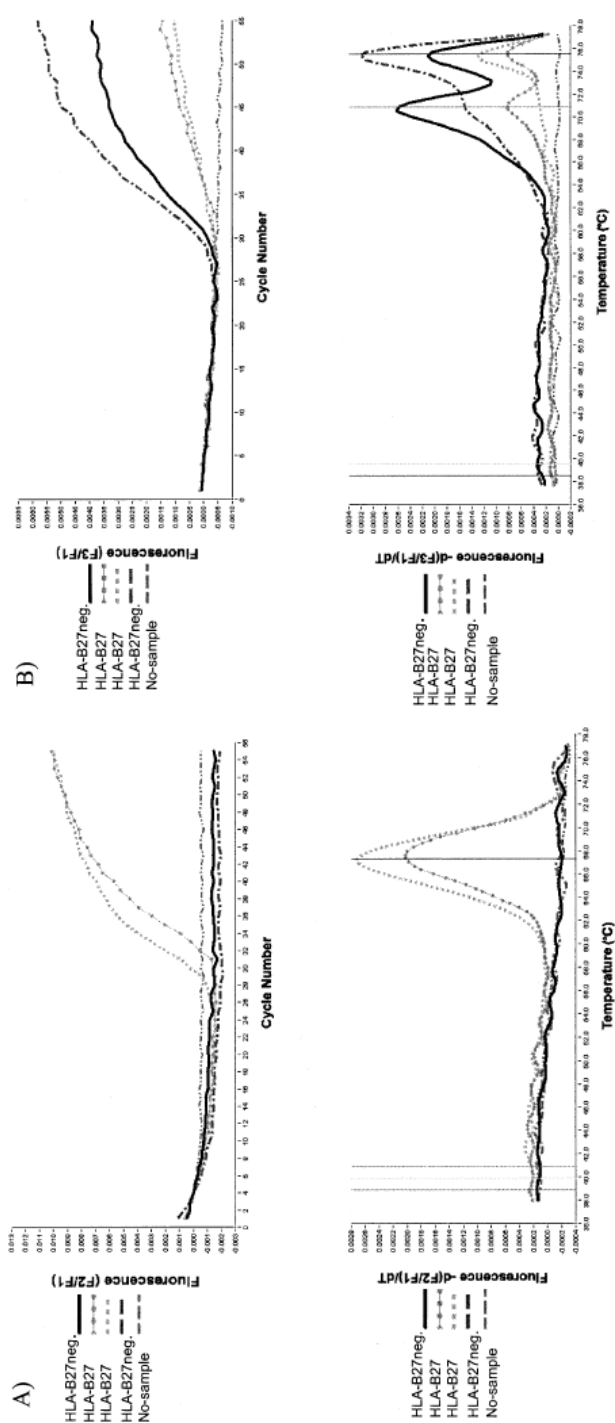


FIGURE 2 Examples for illustrating the B27 detection results: (A) PCR signals detected in F2 channel for B27 alleles during B27 detection and by melting profiles. (B) PCR signals detected in F3 channel for β -globin coamplification during B27 detection and by melting profiles.

probe and CTW FL fluorescein-labeled sensor probe, as described elsewhere [19]). For the B27 detection, the primers used produced a 140 bp HLA-B27-specific amplification product, missing only the unusual B*2718 and B*2723 alleles (only three HLA-B*2723 and one HLA-B*2718 families have been reported to date [20, 21]). We used 149c as sense primer and a mixture of 273c and 273c3 as antisense primer.

PCR reaction was performed in a total volume of 10 μ l; the reaction mixture contained 0.2 μ M of 149c, 0.6 μ M of 273c, 0.2 μ M of 273c3, 0.2 μ M of β -globin S, and 1 μ M of β -globin AS primers, respectively; 0.2 μ M of each hybridization probe, 1 μ l of Light Cycler Fast Start Master Hybridization probes, 2 μ l of template DNA, and $MgCl_2$ at a final concentration of 4 mM.

The rT amplification protocol for this reaction was: 10 minutes of initial denaturation and activation of the Fast Start enzyme at 95°C, followed by 55 amplification cycles (15 seconds of denaturation at 95°C, 5 seconds of annealing at 67°C and 20 seconds of extension at 72°C). Melting curves were generated following these steps: 95°C for 0 seconds, 72°C for 20 seconds, 65°C for 120 seconds, 35°C for 0 seconds (all at a ramp rate of 20°C/second) and 80°C for 0 seconds (ramp rate of 0.1°C/second; acquisition mode: continuous), followed by a cooling step of 30 seconds at 40°C.

As an alternative to FRET probes for monitoring the B27 detection reaction, the amplification was also optimized with a second approach based on the use of the SYBR Green I dye (B27-Sybr-detection). In this case, PCR reaction was performed in a total volume of 10 μ l and the mixture contained 0.15 μ M of 149c and 273c-mix (273c2+273c3), 0.3 μ M of each β -globin specific primer (used also as an internal control of DNA amplification), 1 μ l of LightCycler Fast Start SYBR green I, 2 μ l of sample DNA (usually up to 100 ng), and a final concentration of 2 mM $MgCl_2$. Alternatively, the use of LightCycler Fast Start SYBR green I may be replaced by: 0.5 mg/ml bovine serum albumin (BSA) molecular biology grade (Roche), 1X Fast Star Taq reaction Buffer, 200 μ M of each DNTP (Ecogen, Barcelona, Spain), 1 U Fast Start Taq (Roche), a final concentration of 1:20,000 diluted in water, and SYBR Green I gel stain (Roche) [22] plus 1.5 mM $MgCl_2$ (2.5 mM in PCR reaction).

The rt-PCR amplification protocol for this B27-Sybr detection reaction was the same as before but followed by a different melting step. In this case, the melting curves were generated at 95°C for 0 seconds and 75°C for 15 seconds at a ramp rate of 20°C/s, and 99°C at a ramp rate of 0.05°C/s (acquisition mode: continuous).

B27 subtyping. The second step used FRET probes to define the allelic variants of B27. This FRET-PCR amplification reaction (B27 subtyping) used the 127c and

362c primers, and produced a 494-bp fragment for all HLA-B27 alleles, with the exception of the B*2707, B*2711, B*2714, B*2719, B*2721, and B*2724 variants, all of which are low-frequency alleles. For the discrimination of alleles, two sets of FRET hybridization probes were used: the most discriminating set was called S1; the other was called S2. For S1, the anchor probe was labeled with LC-Red640 and the sensor probe with fluorescein, whereas for S2 probes the anchor probe was labeled with fluorescein and the sensor probe with LC-Red705. The PCR reaction was performed in a total volume of 10 μ l, the reaction mixture contained 0.2 μ M of 127c primer, 1 μ M of 362c primer, 0.2 μ M of each hybridization probe, 1 μ l of Light Cycler Fast Start Master Hybridization probes, 2% DMSO PCR grade (SIGMA-ALDRICH Corporation, St. Louis, MO), 2 μ l of template DNA, and $MgCl_2$ at a final concentration of 3.5 mM. The RT amplification protocol for this second reaction was the same as for B27 detection: 10 minutes of initial denaturation and activation of the Fast Start enzyme at 95°C, followed by 55 amplification cycles (15 seconds of denaturation at 95°C, 5 seconds of annealing at 67°C and 20 seconds of extension at 72°C). The melting curves were generated following these steps: 95°C for 0 seconds, 72°C for 20 seconds, 65°C for 120 seconds, 35°C for 0 seconds (all at a ramp rate of 20°C/second) and 80°C for 0 seconds (at a ramp rate of 0.1°C/second; acquisition mode: continuous), followed by a cooling step of 30 seconds at 40°C.

B27 refine. In the B27-subtyping reaction, HLA-B27 alleles may be divided into eight allelic groups. To obtain a higher level of resolution and separate non-AS-associated alleles from AS-associated alleles, a third rt-PCR protocol was designed. In this protocol (B27-refine), 344c and a mixture of 462d and 462 primers were used to generate a 140-bp amplicon for most HLA-B27 alleles except for low-frequency alleles B*2707, B*2711, B*2714, B*2719, B*2720, and B*2724 and for some non-HLA-B27 alleles (B*1517, B*3702, B*4701, B*4702, B*4703, B*4704).

Other alleles amplified during the PCR reaction did not give a fluorescent signal because of the high number of mismatches with the sensor probe; therefore, for practical purposes, they were considered to be nonamplified alleles. For the discrimination of alleles, another set of FRET hybridization probes was used: S3 fluorescein-labeled anchor and S3 LC-Red640-labeled sensor probe. The PCR reaction was performed in a total volume of 10 μ l, the reaction mixture contained 0.2 μ M of 344c primer, 0.6 μ M of a mix of 462 antisense primers, 0.2 μ M of each hybridization probe, 1 μ l of Light Cycler Fast Start Master Hybridization probes, 2 μ l of template DNA, and $MgCl_2$ at a final concentration of 3 mM. The

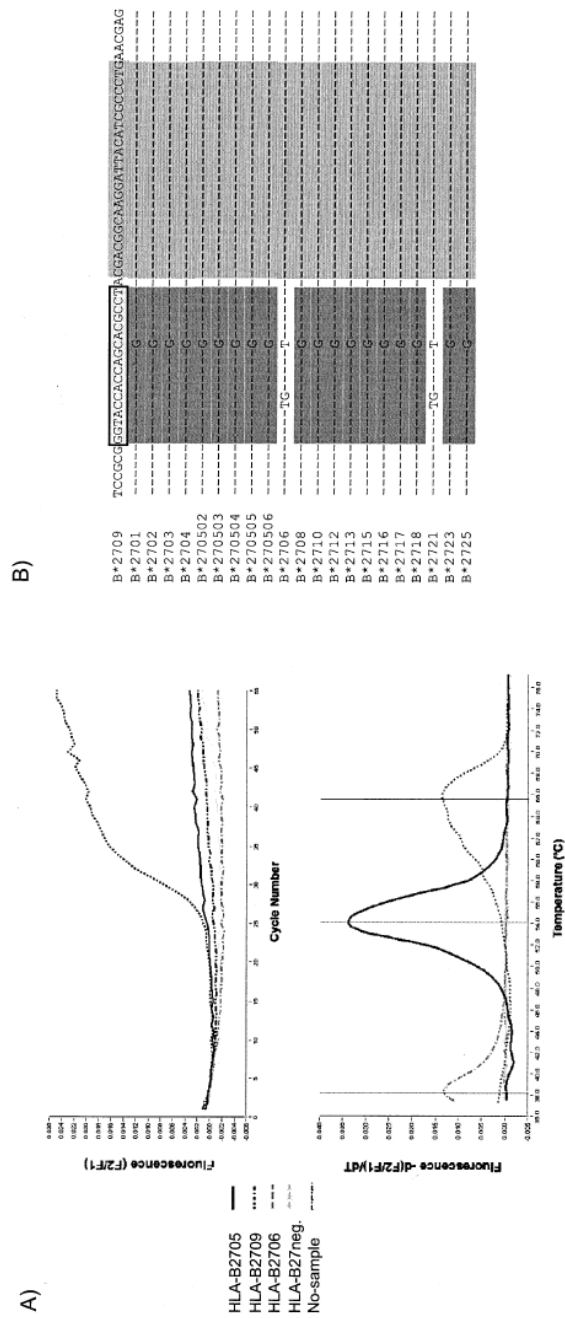


FIGURE 5 Examples for illustrating the B27-refine results in F2 channel: (A) PCR signals detected for B27 alleles during B27-refine and definition of B27 allelic group by melting profiles. (B) Sequence of S3 probes set and mismatched alleles.

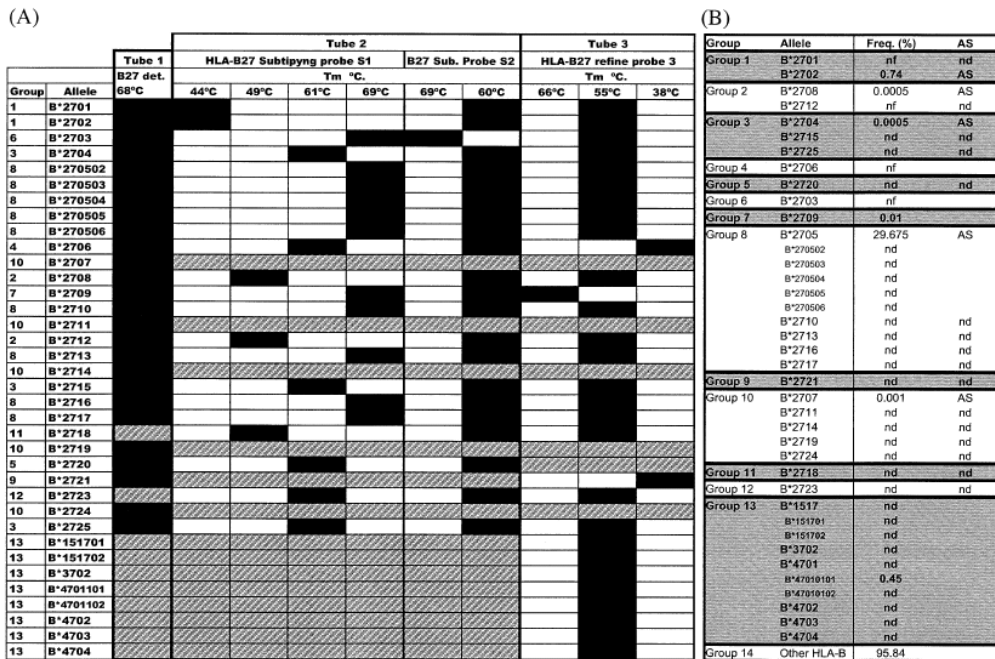


FIGURE 6 Pattern for the interpretation of real time polymerase chain reaction (PCR) results: (A) Specificities of the reactions and probes used in the three reactions HLA-B27 genotyping. Black squares indicate specific signals. Dashed gray squares indicate no amplifications. White squares indicate no signal. (B) The Spanish population frequency of B27 allelic groups defined by our rt-PCR approach; values are reported according to available data (nd = no data in relation to allele frequencies, nf = data not found in Spanish population).

RT amplification protocol for this reaction was the same as for the B27 subtyping reaction: 10 minutes of initial denaturation and activation of the Fast Start enzyme at 95°C, followed by 55 amplification cycles (15 seconds of denaturation at 95°C, 5 seconds of annealing at 67°C and 20 seconds of extension at 72°C). The melting curves were generated following these steps: 95°C for 0 seconds, 72°C for 20 seconds, 65°C for 120 seconds, 35°C for 0 seconds (all at a ramp rate of 20°C/second), and 80°C for 0 seconds (at a ramp rate of 0.1°C/second acquisition mode: continuous), followed by a cooling step of 30 seconds at 40°C. Alternatively, the use of LightCycler Fast Start Master Hybridization probes may be reliably replaced by: 0.5 mg/ml BSA molecular biology grade (Roche), 1X Fast Star Taq reaction Buffer, 3 mM MgCl₂, 200 μM of each DNTP (Ecogen), and 1 U/μl of Fast Start Taq (Roche).

All primers were purchased from Sigma-Genosys (London, UK) except for primers 127c and 362c, which were purchased from TIB MOLBIOL (Berlin, Germany). In all cases, the concentrations of the primers were re-evaluated at our laboratory using a spectrophotometer

(LKB Ultraspec III Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). All the hybridization probes were purchased from TIB MOLBIOL.

PCR-SBT

To fully validate the rt-PCR typing assay, all the samples were retyped by PCR-SBT. This analysis was performed as previously described [23] using FastStart polymerase (Roche) and BigDye Terminator Cycle Sequencing 2.0 (AbiPrism, PE Biosystems, Foster City, CA). In this approach we used PBX1 (sense) and BINT3 (antisense) as amplification primers for all locus B alleles with the exception of HLA-B*73. To detect this B*73 allele, an additional amplification was performed using 18CIN3* as an antisense primer. The sequences of these primers are shown in [23].

Software Analysis

Because of the limitations of the LightCycler Probes Design software 1.0 (Roche) and the need to direct the primers and probes to the polymorphic sequences of HLA-B27, we used the allele alignment tools from the

TABLE 3 Concordance of results from genotyping with other typing methodologies

PCR-SSP & PCR-SBT (<i>n</i>)	FRET-rt-PCR (<i>n</i>)	Concordance
28 (HLA-B2705/13)	28 Group 8 (HLA-B2705/10/13/16/17)	100%
2 (HLA-B2702)	2 Group 1 (HLA-B2702/01)	100%
30 (Non-B27)	30 Group 14 (Non-B27)	100%

Abbreviations: (*n* = number of samples) PCR-SSP = polymerase chain reaction-sequence-specific primers; SBT = sequence-based typing; FRET = fluorescence resonance energy transfer; rt = real time.

IMGT/HLA web [14] and a manual analysis of sequences. Oligo 4 software was used to calculate temperature and to predict their tendency to generate artifacts from primers and probes.

To predict the results obtained in heterozygous samples for HLA-B27 alleles, we adapted "Hetero," a free software application previously developed by one of us (M.J.), originally created to analyze HLA class II alleles [9]. This software compares all possible pairs of predicted typing results for the known alleles of HLA-B27 and determines which alleles will generate ambiguous results when coexisting in an heterozygous sample.

RESULTS

"B27 Detection" Resolves B27+ from non-B27 Samples

By acquiring B27 detection through the F2 fluorescence channel, HLA-B27 alleles could be mainly assigned during the amplification and then more specifically through the definition of melting curves because of the characteristic single peak at 67.5°C (Figure 2A). Therefore, HLA-B27+ and non-HLA-B27 samples were distin-

TABLE 4 Relevant unsolved combination in heterozygosis (frequency of combination was calculated according to the allele frequencies shown in Figure 6)

Combination	Frequency per million
Group 7 Group 8	0.59
Group 7 Group 13	0.09
Group 7 Group 10	0.002
Group 7 Group 7	0.002
Group 2 Group 13	0.045
Group 2 Group 2	0.001
Group 8 Group 10	0.59
Group 8 Group 13	267
Group 8 Group 8	1760
Group 1 Group 10	0.148
Group 1 Group 13	66.6
Group 1 Group 1	110

guished during the two steps of the reaction by simply analyzing these F2 signals. However, there were two nontested and theoretically nonamplified exceptions, the rare B*2718 and B*2723 alleles, although these could be defined in the subsequent "B27 subtyping" reaction (see the following section). By monitoring the CTW probes through the F3 channel, the amplification of β -globin was followed in all samples and it was later confirmed by the melting curves, which showed one or two profiles (71°C and 75°C) depending on the presence or absence of a described polymorphism of the β -globin gene (GenBank accession no. AF117710) (Figure 2B). In any case, this polymorphism did not interfere with the analysis of HLA-B27 alleles. The samples containing no DNA were distinguished by simply analyzing the F3 signals.

In our experience, the minimal amount of sample required for this reaction was 10 ng genomic DNA. The interassay variation for the reactions was always below 1°C (a maximum of 3°C is usually accepted). In addition, the melting step should be avoided if a faster technique is needed just for screening the presence of B27.

However, when the alternative B27-Sybr detection was used, the analysis of the melting curves was mandatory to safely separate HLA-B27+ alleles from non-HLA-B27 alleles. Hence, non-B27 samples showed a single temperature curve, corresponding to β -globin (peak at 88°C), whereas B27+ samples showed two peaks at 88°C and 91°C (Figure 2C). The use of the described alternative mixture to Light Cycler Fast Start SYBR green I (Roche) generated melting profiles at 89°C (β -globin) and at 92°C (HLA-B27) because of differences in their components (data not shown).

"B27 Subtyping" Reaction Allows Allelic Discrimination of Eight B27 Allelic Groups

By acquiring the S1 melting curve through the F2 fluorescence channel, four temperatures were defined at 69°C, 62°C, 50°C, and 44°C (Figure 3A). As has been established, the reduction of temperature was proportional to the number of mismatches (0, 2, 3, and 4 in our case) between the amplimer and the sensor probe (Figure 3B). By monitoring the S2 probe melting curves through the F3 channel, two melting profiles were defined: most B27 alleles were detected as a peak at 60°C, whereas the B*2703 allele was detected as a peak at 69°C (Figure 4a). HLA-B*2717 and B*2723 subtypes had a second mismatch for the sensor probe that should theoretically generate two more melting profiles. Nevertheless, because of the low frequency of these alleles in our population, we were unable to test this prediction (Figure 4b). Although most HLA-B27 alleles were detected with the B27-subtyping reaction, some low-frequency subtypes (2707, 2711, 2714, 2719, 2721, and 2724; Figure 1) are not amplifiable. Note that with this system fluorescence

during the amplification reaction is only acquired during the annealing step at 67°C, and therefore the acquired signal is restricted to fully matching probes (temperature = 69°C). Hence, only those alleles that fully matched the probes generated fluorescence at that stage. Therefore, and different from other rt-PCR assays, the most informative step in our B27-subtyping assay was the analysis of the temperature melting curve, whereas the profiles generated during amplification just served as a control of the reaction.

The Addition of "B27 Refine" Reaction Allows the Allelic Discrimination of 12 B27 Allelic Groups

The first two reactions resolved HLA-B27 into eight groups in what was an acceptable level of definition for most purposes. A third rt-PCR reaction was designed to gain a higher level of resolution and to detect the remaining non-AS-associated alleles. In this assay, the S3 melting curves acquired through F2 fluorescence channel defined temperature at 38°C for B*2706 and B*2721, at 66°C for B2709, and at 55°C for the remaining B27 subtypes (except for the nonamplified alleles B*2707, B*2711, B*2714, B*2719, B*2720, and B*2724) (Figure 5A). In each, the reduction in the temperature was proportional to the number of mismatches (0, 1, 3) of the target sequence compared with the S3 sensor probe (Figure 5B). As in the B27 subtyping reaction, the fluorescence recorded during amplification corresponded only to alleles that fully matched the probes (temperature = 69°C). Combining these results with the B27-subtyping reaction, we resolved B27 into 12 allelic groups (Figure 6).

Fast and Reliable Subtyping of HLA-B27 on the Basis of 12 Patterns

By combining the results from the three rt-PCR assays, 12 patterns of fluorescence were defined that allowed the determination of an almost allelic B27 genotype (Figure 6). Eight of the groups led to the direct assignment of given HLA-B27 alleles. Thus group 6 corresponded to B*2703, group 4 to B*2706, group 7 to B*2709, group 11 to B*2718, group 5 to B*2720, group 9 to B*2721, and group 12 to B*2723). Taking into account the allelic frequencies of HLA-B27 subtypes in our population, alleles may be assigned for the other five groups (groups 1, 2, 3, 8, and 10) with an almost complete certainty (discarded alleles from these groups have not been found in our Spanish population). For example, in our Spanish population, a group 1-positive sample may be typed as B*2702 because B2701 is an extremely rare allele. The same applies to the assignment of group 2 to B*2708, group 3 to B*2704, group 8 to B*2705, and group 10 primarily to B*2707.

Once established, our three-tube approach allowed a fairly accurate HLA-B27 genotyping in 90 minutes, including the time for interpretation.

VALIDATION OF THE APPROACH ON A PANEL OF SAMPLES GENOTYPED BY DIRECT SEQUENCING

After the protocol provided satisfactory results on control cell lines, it was tested in 60 real laboratory samples that had been typed by SBT. Although the group was selected to contain the same number of B27+ and non-B27 samples, the tests were carried out blindly until analysis. The results from sequence typing and from our three-tube RT-PCR approach were concordant in all the 60 samples tested (Table 3). Unfortunately, no samples from some B27 subtypes uncommon in our population were available for this last validation.

Heterozygous Indeterminations

It is very rare to find two B27 alleles in the same individual and could lead to misleading results. Therefore, we have tried to analyze this problem by using computer simulation, adapting the "Hetero" application [9] to determine whether the coexistence of different HLA-B27 alleles in heterozygosis would produce typing indetermination. When the computer simulation predictions were combined with the allelic frequencies in our population, we could conclude that only five combinations might be considered important indeterminations (Table 4) (*i.e.*, the combination of group 7 with group 8, named 7-8, that might be misinterpreted as 7-13 [the combination of group 7 with group 13]; 7-10 with 7-7; 2-10 with 2-2, 8-10 with 8-13 or 8-8, and 1-10 with 1-13 or 1-1). Obviously, these indeterminations complicate the final assignation of alleles, but because of their low frequencies as detailed in Table 4 (expressed as frequencies per million), it affects only a very small minority of the results.

DISCUSSION

HLA-B27 genotyping is one of the methods used to detect this allele in patients suspected to have AS and related diseases. Genotyping is much more accurate than flow-cytometry with monoclonal antibodies to HLA-B27 [24], which gives about a 5% ambiguous result. In addition, positive samples should be confirmed by genotyping. However, available one-reaction protocols for B27 PCR genotyping have some important disadvantages, especially when the resolution of B27 alleles is desired, because complex and time-consuming procedures would be needed. Moreover, usual PCR-based genotyping frequently requires post-PCR manipulations that increase the risk of cross-contamination between samples. Our new three-tube rt-PCR approach allows the

identification of main HLA-B27 alleles by distributing them into eight or 12 groups, bringing the test to practical high-resolution genotyping, especially when HLA-B27 subtype frequencies in the population are taken into account. Most importantly, this assay permits one to distinguish those subtypes associated with AS (B*2705, B*2702, B*2704, and B*2707) from those for which association has not been demonstrated (B*2709, B*2706, and B*2703).

The approach described in this article has the potential of becoming the method of choice for diagnostic HLA-B27 typing:

1. It is faster than any other PCR-based assay previously described (90 minutes, including interpretation) and achieves a higher resolution than other conventional HLA-B27 PCR-SSP genotyping assays.
2. Two reactions may be enough for obtaining a good level of typing resolution, whereas three reactions provide a strikingly high degree of allelic definition. Because each reaction only uses one tube, the genotype may be determined using one, two, or three reaction tubes depending on the resolution required.
3. No post-PCR steps are needed, thus avoiding manual handling of the PCR amplicon which is the main source of contamination.

Our three-tube protocol proved robust when tested in real laboratory samples, not just control cell lines. It showed the reproducibility, precision and simplicity required for clinical diagnostic purposes: (1) temperature values showed an interassay variation below 1°C and an intra-assay variation below 0.5°C and (2) all PCR reactions (B27 detection) and (B27 subtyping and B27 refine) were run for 55 cycles in the same conditions. If required, the amplification reaction could be shortened reducing the number of cycles, because the amplicon could be readily detected at cycles 25 to 35. The reaction was run for up to 55 cycles to generate a strong fluorescence signal for the melting step.

The main relative shortcoming of our approach was the low fluorescence intensity produced during the melting step as the number of mismatches increased (*e.g.*, in group 1). This could become a problem if the purpose of the test was to measure the amount of template, but not in our study, in which only the signal was needed to identify the melting peaks. Fluorescence in F3 melting had a high background level, although a clear differentiation of B*2703 alleles was also achieved by analyzing amplification curves or by adding more cycles at the end of the process.

Concerning the possible misinterpretation of some allele combinations present in certain heterozygous samples (Table 4), software simulation has shown that our approach resulted in an acceptably low proportion of

indetermination that was similar to that obtained with other assays. In most cases, rare B27 allelic combinations (some of them detected only in one case or one family) could be resolved by considering their extremely low frequency in the study population.

Our approach confirmed that the use of asymmetric primers increases the intensity of fluorescence during the melting step, as described elsewhere [25], which is helpful for interpretation. Although labeling probes with LC-Red 640 seems to generate a higher level of fluorescence than LC-Red 705, in practice both fluorochromes may be used indistinctly. Although assay run times are shorter in the Light Cycler than with other thermocyclers, we may presume that our FRET-rt-PCR HLA-B27 protocol could be easily adapted to other RT-PCR machines.

Our typing method compares favorably with other rt-PCR-based methods previously described [1–6], because it substantially reduces the labor-intensive steps and the total processing time. With preloaded tubes, skipping post-PCR steps makes it possible to have typing results in less than 90 minutes, whereas the risk of sample contamination is reduced because amplified products always remain inside a lid-lock tube. Furthermore, the use of allele-specific probes and of more than one probe per reaction allows the reduction of the number of rt-PCR reactions. This may result in a further simplification of the rt-PCR typing procedure and a significant reduction in the cost per test.

In conclusion, we show here a new robust and reliable rt-PCR-based method for HLA-B27 genotyping using FRET probes. This approach overcomes some of the limitations of ordinary DNA-based typing techniques, and has the main advantages of simplicity (very short processing times, few bench steps, and feasibility of automation) and reproducibility. Our two- to three-tube method is a practical and efficient method for resolution of HLA-B27 typing at almost high level, and it seems feasibly to apply this principle to HLA genotyping.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Justí Gil, Pepi Caro, and Lidia Sabater, all from the Laboratory of Immunobiology Research and Applications to Diagnosis (LIRAD), Serveis Sanitaris de Referència—Centre de Transfusió i Banc de Teixits (SSR-CTBT), for providing some SBT-PCR typed DNA samples of an average Spanish population and for technical support, respectively.

REFERENCES

1. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17:2503, 1989.

2. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39:225, 1992.
3. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI: Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 46:355, 1995.
4. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324:163, 1986.
5. Garcia-Fernandez S, Gonzalez S, Mina Blanco A, Martinez-Borra J, Blanco-Gelaz M, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C: New insights regarding HLA-B27 diversity in the Asian population. *Tissue Antigens* 58:259, 2001.
6. Fraile A, Martin J, Lopez-Nevot MA, Mataran L, Nieto A: HLA-B*27 subtyping by PCR-RFLP in Spanish patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 52:492, 1998.
7. Tiemann C, Vogel A, Dufaux B, Zimmer M, Krone JR, Hagedorn HJ: Rapid DNA typing of HLA-B27 allele by real-time PCR using light cycler technology. *Clin Lab* 47:131, 2001.
8. Bon MA, van Oeveren-Dybciz A, van den Bergh FA: Genotyping of HLA-B27 by real-time PCR without hybridization probes. *Clin Chem* 46:1000, 2000.
9. Juan M, Coll J, Martínez-Cáceres E, de la Fuente MA, Vives J, Yagüe J, Gayá A: Análisis informático de las técnicas de genotipificación de los antígenos HLA de clase II: HETERO V2.0. *Inmunología* 11:14, 1992.
10. Marsh SGE, Parham P, Barber LD: The HLA Facts Book. Facts Books series. San Diego: Academic Press; 2000.
11. Brewerton DA, Hart FD, Nichols A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD: Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1:904, 1973.
12. Gonzalez S, Martinez-Borra J, Lopez-Larrea C: Immunogenetics, HLA-B27 and spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 11:257, 1999.
13. Ramos M, De Castro JA: HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 60:191, 2002.
14. Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, Stoehr P, Marsh SGE: IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* 31:311, 2003.
15. Gonzalez-Roces S, Alvarez MV, Gonzalez S, et al: HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 49:116, 1997.
16. Khan MA: HLA-B27 polymorphism and association with disease. *J Rheumatol* 27:1110, 2000.
17. Khan MA, Ball EJ: Genetic aspects of ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16:675, 2002.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215, 1988.
19. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130, 1997.
20. Feldman D, Kearns J, Wu J, Bassinger S, Montoya GD, McKeen M, Birkos S, Williams TM, Kamoun M: Identification and sequencing of HLA-B*0714 and B*2718 alleles and novel exon 1 sequences of B*0709 and B*2714 alleles in potential bone marrow donors. *Tissue Antigens* 59:426, 2002.
21. Darke C, Street J, Hammond L, Downing J, Thompson J: Immunogenetic study of a new HLA allele, B*2723. *Tissue Antigens* 60:400, 2002.
22. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS: Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25:430, 2001.
23. Pozzi S, Longo A, Ferrara GB: HLA-B locus sequence-based typing. *Tissue Antigens* 53:275, 1999.
24. Levering WHBM, Van den Beemd R, Te Marvelde JG, Van Beers WAM, Hooijkaas H, Sintnicolaas K, Gratama JW: External quality assessment of flow cytometric HLA-B27 atyping. *Cytometry* 42:95, 2000.
25. Barrat K, Mackay JF: Improving real-time PCR genotyping assays by asymmetric amplification. *J Clin Microbiol* 40:1571, 2002.
26. Olerup O: HLA-B27 typing by a group-specific PCR amplification. *Tissue Antigens* 43:253, 1994.

V.II.1 Consideracions inicials al capítol II: Tipificació HLA-B

Amb els resultats anteriors (capítol I) hem vist que la tècnica de la PCR a temps real, combinada amb les sondes d'hibridació FRET, és una eina capaç de resoldre la genotipificació d'HLA-B27 aportant diversos avantatges enfront a les altres metodologies convencionalment utilitzades. Ara bé, tal i com s'ha comentat a l'apartat d'hipòtesis, la introducció de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació també hauria de permetre genotipar tot un locus HLA de classe I i no només una família gènica. En aquest sentit, els resultats concrets obtinguts amb la família al·lèlica HLA-B27 ens van donar arguments per a considerar possible afrontar un objectiu més general: resoldre el polimorfisme del locus HLA B (el més polimòrfic de tots) amb la tècnica de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació FRET, permetent obtenir una aproximació que aportés els mateixos avantatges descrits per HLA-B27 al locus HLA-B. De forma concreta, l'aplicació de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació per a la tipificació del locus HLA B es va plantejar que hauria de permetre:

1. Aconseguir una major resolució de tipificació utilitzant el mínim nombre de reaccions d'amplificació:
 - A través de combinar diferents sondes en un mateix tub.
 - A través d'utilitzar una mateixa sonda per a resoldre més d'una variant polimòrfica sempre que el polimorfisme estigui situat en la zona on hibrida la sonda sensora.
2. Disminuir el temps de processament de la tècnica, tant per una disminució del temps de ciclat i d'anàlisi com per l'eliminació de les manipulacions post-PCR.
3. Eliminar el risc de contaminació per producte de PCR (ja que l'amplímer queda tancat en el tub).

V.II.1.1 Per tant en aquest capítol s'ha pretès dissenyar un sistema de tipificació de baixa-mitja resolució del locus HLA B basat en l'ús de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació FRET, centrant-se en la resolució dels següents punts:

1. Analitzar informàticament les seqüències de la regió, intró 1- exó 2 - intró 2 - exó 3 - intró 3, dels al·lèls dels loci HLA-A, B, C (dels quals hi hagi informació disponible) per tal de:

- A) Trobar les zones polimòrfiques del locus HLA B que són característiques de les seves especificitats (o famílies al·lèliques) per a determinar les posicions de les sondes d'hibridació FRET.
 - B) Trobar els llocs específics d'HLA B on situar encebadors genèrics pels exons 2 i 3 (per diferents grups d'especificitats serològiques del locus HLA-B). Aquestes amplificacions hauran de contenir les zones polimòrfiques on s'han de situar les sondes.
2. Un cop obtinguda una definició inicial teòrica de les amplificacions a desenvolupar, que sigui satisfactòria en quant a ambigüitats de tipificació generades, es passarà al seu desenvolupament pràctic. És a dir, s'iniciarà l'avaluació dels encebadors de reacció i l'establiment de les temperatures de fusió experimentals de les sondes, emprant mostres homozigotes en la seva tipificació HLA-B.
 3. Dissenyar uns encebadors per un gen control que es co-amplificarà amb el locus HLA-B. Aquesta co-amplificació permetrà assegurar que en els tubs on hi ha manca d'amplificació del locus HLA-B, aquesta no-amplificació no és deguda a l'absència de DNA, sinó que és per la manca de l'al·lel específic.
 4. Un cop establerta la definició real en homozigots, es passarà a conèixer les ambigüitats reals de tipificació que genera el sistema en totes les possibles mostres heterozigotes per al·lèls d'HLA B.
 5. Minimitzar el nombre de reaccions i sondes d'hibridació a utilitzar per tal d'aconseguir una discriminació suficientment significativa que comporti el mínim esforç de realització i cost econòmic.
 6. Validar el sistema en mostres normals enviades a tipificar amb finalitat diagnòstica (comparant-les amb altres mètodes convencionals de tipificació).
 7. Comparar les limitacions de la tècnica descrita amb les limitacions de les tècniques basades en la PCR convencional que s'utilitzen en la tipificació del locus HLA-B.

V.II.2 Resum (traducció adaptada del resum de l'article)

La genotipificació HLA per PCR té algunes limitacions inherents que són laborioses i requereixen un elevat esforç. Per superar-les, hem desenvolupat una aproximació de PCR a temps real amb sondes d'hibridació capaç d'obtenir una mitja-baixa resolució de genotipificació del locus HLA-B que utilitza menys tubs, sondes i un temps curt de processat. La nostra estratègia utilitza 18 reaccions simultànies que amplifiquen els al·lels HLA-B alhora que un control intern. La monitorització de les dues amplificacions en cada tub es fa per l'aplicació simultània de dues sondes d'hibridació Transmissió d'Emissió de Fluorescència Ressonant (*Fluorescent Resonance Emission Transfer*, FRET): la primera sonda, diferent a cada tub és específica per el locus HLA-B, mentre que la segona sonda detecta el gen control. Analitzant els perfils de corbes de fusió de les sondes per HLA-B s'obté per a cada mostra una resolució de tipificació mitja-baixa (300 HLA-B grups al·lèlics). Degut a que alguns al·lels poden ser determinats sense utilitzar tot el grup de reaccions complet, presentem una estratègia alternativa: una primera ronda de set reaccions i, en funció del resultat, una segona (o tercera) ronda de PCRs per resoldre les ambigüitats. Aquest mètode va ser validat en mostres clíniques pre-tipificades i els resultats van ser completament concordants en tots els casos. D'altra banda, es van generar menys resultats ambigus. En resum, presentem una nova metodologia, més ràpida i acurada que les tècniques basades en la PCR que actualment s'utilitzen per a la tipificació d HLA-B.

V.II.2.1 Carta d'acceptació de l'article HLA-B

Date: Feb 15, 2006
To: "Manel Juan" Manuel.Juan@uab.es
From: "Human Immunology" js1040@columbia.edu
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: HIM-D-05-00154R1
Title: Real-time PCR using Fluorescent Resonance Emission Transfer (FRET) probes for HLA-B typing.
Human Immunology

Dear Manel Juan, PhD, MD,

I am pleased to confirm that your paper "Real-time PCR using Fluorescent Resonance Emission Transfer (FRET) probes for HLA-B typing." has been accepted for publication in Human Immunology.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Nicole Suciú-Foca, PhD
Receiving Office/Editor-in-Chief
Human Immunology

V.II.3 Article HLA-B (Human Immunology, en premsa)

FRET real-time PCR HLA-B typing

Faner et al.

Real-time PCR using Fluorescent Resonance Emission Transfer (FRET) probes for HLA-B typing.

Rosa Faner^{1,2}, Natàlia Casamitjana¹, Jordi Coll^{1,3}, Pepi Caro¹, Ricardo Pujol-Borrell^{1,2},
Eduard Palou¹, Manel Juan^{1,2}.

¹Laboratory of Immunobiology Research and Applications to Diagnosis (LIRAD). Banc de Sang i Teixits. ²Department of Cell Biology, Physiology and Immunology. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Badalona. ³ I.E.S. Joan Miró, l'Hospitalet de Llobregat. Barcelona, Spain.

Corresponding Author:

Manel Juan

Immunologia (LIRAD) / BST

Hospital Universitari Germans Trias Pujol

Ctra de Canyet s/n

08916 Badalona (Barcelona)

SPAIN

Phone 34-93.497.86.66

Fax 34-93.497.86.68

e-mail: Manuel.Juan@uab.es

Keywords: Fluorotyping, HLA-B, Real-time PCR, Donor-acceptor, Melting curve

Running Title: FRET real-time PCR HLA-B typing.

Abstract

HLA-genotyping by PCR has some inherent labor-intensive and effort-demanding limitations. To overcome them, we have developed a real-time PCR with hybridization probes approach able to obtain a medium-low resolution HLA-B genotyping with fewer tubes and probes and in a short time-consuming procedure. Our strategy used 18 simultaneous reactions amplifying HLA-B alleles and an internal control. Monitorization of both amplifications in each tube is performed by the simultaneous application of two Fluorescent Resonance Emission Transfer (FRET) probes: the first probe, different for each tube, is specific for the HLA-B locus, while the second probe detects the control gene. A medium-low resolution (300 HLA-B allelic groups) typing is obtained for each sample by analyzing the melting curve patterns. Since some alleles may be determined without using the complete set of reactions, we present an alternative strategy: a first round of seven reactions and, according to the result, a second (or third) round of PCRs to solve the ambiguities.

This method was validated in pre-typed clinical samples and the results were completely concordant. Moreover, fewer ambiguous results were obtained. In summary we present a new faster and more accurate method than currently used PCR-techniques to type HLA-B alleles.

Abbreviations

HLA: Human Leukocyte Antigens

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR-SSP: Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers

PCR-SSO: Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligoprobes

PCR-SBT: Polymerase Chain Reaction – Sequence Based Typing

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

Introduction

HLA genes of the MHC encode for surface glycoproteins involved in the immune response, specifically in the presentation of peptides to T-lymphocytes. HLA molecules are key factors in regulating graft rejection and graft-versus-host disease; it has been extensively demonstrated that HLA matching of patient and unrelated donor significantly reduces graft rejection, graft-versus-host disease and, consequently, transplant-related mortality [1-3].

HLA glycoproteins are highly polymorphic and, in the case of HLA-B locus, the polymorphism is mainly located in exons 2 and 3. To date, 728 allelic variants grouped in 35 serological specificities have been described in this locus, thus, making it the most polymorphic of all HLA loci. In clinical practice, HLA typing by PCR-based techniques has become a widely used alternative to serological methods [4-6]. The most commonly used PCR-based HLA typing methods are PCR with sequence-specific primers (PCR-SSP) [7-9] and PCR with sequence-specific oligonucleotide hybridization (PCR-SSO) [10]. Although effective and widely used, these methods require time-consuming post-PCR processing and are at risk of post-PCR contamination. Moreover, PCR-SSP requires many PCR reactions and it is a difficult approach to automate, limiting its throughput capabilities. Similarly, although PCR-SSO is capable of a higher throughput, processing times are longer and the technique is not able to differentiate motifs present on cis-trans strands of the DNA template, although there are PCR-SSO methods that take advantage of group-specific amplifications to partially overcome this limitation.

Several alternatives have been proposed in the last three years in order to overcome these limitations: Microarray technology [11-14], Pyrosequencing [15-17], Single nucleotide extension [18, 19] and Real-Time PCR [20-24]. Out of these, real-time PCR is the only assay that does not require handling of the PCR amplicon, and uses equipment available to more HLA laboratories. Several authors have described real-time PCR applications to HLA-B27 [20] [21, 22] [23]; and HLA-DRB typing [24-26] demonstrating that these approaches may overcome some of the cumbersome limitations of other procedures (post PCR-steps, long processing times). Moreover, the higher resolution that may be obtained with this new method, using fewer reaction tubes and probes, is also relevant because it merges the advantages of combining both PCR-SSP and PCR-SSO techniques.

Two types of fluorescent probes are mainly used in real-time PCR assays: Taqman ® and LightCycler FRET ® probes [27, 28]. Both have been used for HLA typing, but

FRET probes have proven more effective with such a high level of polymorphism (a single FRET probe allows more than one single sequence discrimination [28]).

Our use of the real-time PCR with FRET probes for HLA-B locus typing resulted in an assay that may achieve at least a medium-low resolution, distinguishing cis-trans DNA motifs, based on 18 PCR reactions and 12 different FRET probes distributed among exons -2 and -3 of the locus.

Materials and Methods

Samples

450 blood samples were used in this study: 250 (from bone marrow or solid organ transplant patients and healthy donors were selected from our repository of DNA samples) for the set up of the assay and 200 more (from cord blood banking) for the final validation of the approach. Samples for the setting up were selected to represent all HLA-B serological specificities both in homo and heterozygous combinations, as well as more frequent subtypes. In all cases, genomic DNA was obtained from samples using QIAamp DNA blood mini kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany). All samples were also typed in our laboratory using a standard typing method: PCR-SSO, PCR-SSP or sequence-based typing (SBT).

Primers and Probes

Due to the limitations of the LightCycler Probes Design software 1.0 (Roche, Mannheim, Germany) and the need to direct the primers and probes to the polymorphic sequences of HLA-B, to define oligonucleotides (primers and probes), we performed manual analysis of the HLA-A, -B and -C allele sequences from the alignment tools of the IMGT/HLA web [29]. The Oligo[®] v4 software (Molecular Biology Insights, Inc. Colorado Springs, U.S) was used to predict any possible artifacts from primers and probes. The Meltcalc99free.xlm[®] [30] application was used to calculate the T_m of primers and probes, and the theoretical melting temperatures of the different mismatched hybridizations. All primers (sequences specified in Table 1) were designed to have a T_m of 60-62°C, and all anchor and sensor probes (Table 2) to have a complete matched T_m of 70-75°C and 60-68°C, respectively (nevertheless, P20s probe required a higher T_m to include all possibilities in that region).

Real-Time PCR reactions

Real-time PCR reactions were performed in a LightCycler™ 1.0 or LightCycler 2.0™ Instrument (Roche, Mannheim, Germany) by combining amplification with specific primers (sequences specified in Table 1) and detection with fluorochrome-labeled specific probes (Table 2). Eighteen reaction tubes per sample were used to define all HLA-B alleles. Thirty-one primers were used to conduct the afore-mentioned reactions: 4 for the two different sample control genes (beta-globin and CCL4, GenBank accession no. **AF117710** and **NM_002984** respectively), and the remaining 27 for the 18 HLA-B **NM_005514** specific reactions (some of them were used in different combinations to develop different amplifications).

Each reaction included two pairs of sets of primers and probes: one set with primers and LC-Red640™ labeled FRET probes for B locus, and a second set with primers and LC-Red705™ labeled FRET probes for the control gene. Therefore, in each tube, the signal arisen in F2(640)/back F1(530) corresponded to the specific HLA-B locus reaction, whereas the signal in F3(705)/back F1(530) corresponded to the control gene.

Specifically, control primers (4o1-442as) and probes (C2a C2s) for the CCL4 gene (SCYA4) were used in a single reaction (tube 5) in which complementarities between ordinary beta-globin primers (Pc03-Pc04) and probes (CTWLC-CTWFL) with the specific HLA-B primers (Pbx1-R1as), and probes (P18s-P1a) dramatically decreased fluorescence signals.

PCR reactions were conducted in a final volume of 10 µl. Details from each reaction mixture (primers and probes used, and their specific reagent concentrations) and reactions are listed in Table 3. In all PCR reactions, Taq polymerase, dNTPs and reaction buffer were added by using 1 µl of LightCycler Fast Start Master Hybridization probes™ (x10) (Roche, Mannheim, Germany). 1 µl of DNA (usually at 0.1 µg/µl), was used as amplification template and added to the 9 µl of each reaction mixture.

The real-time amplification protocol for the reactions was as follows: 10 min of initial denaturation and activation of the Fast Start™ polymerase (Roche, Mannheim, Germany) at 95°C, followed by 50 amplification cycles (5 seconds of denaturation at 95°C, 6 seconds of annealing at 62°C, and 10 seconds of extension at 72°C). Melting curves were generated at 95°C for 0 seconds, 72°C for 20 seconds, 65°C for 15 seconds, 42°C for 270 seconds, 39°C for 0 seconds (all at a ramp rate of 20°C/s), and 80°C for 0 seconds (at a ramp rate of 0.05°C/s; acquisition mode: continuous), followed by a cooling step of 30 seconds at 40°C.

FRET real-time PCR HLA-B typing

Faner et al.

Primers were purchased from Sigma-Genosys™ (London, UK) and hybridization probes from Tib MolBiol™ (Mannheim, Germany).

Data analysis and interpretation

PCR amplification of one sample was performed in parallel with all 18 primers and probes mixes for the HLA-B fluorogenic typing. Through the analysis of the presence of melting curves in the F2/back F1 channel, we observed specific HLA-B locus PCR products. Analysis of F3/back F1 channel during the amplification process allowed the detection of control PCR product. The interpretation of the HLA typing results obtained by real-time PCR was carried out using a probe hit table including the homozygous hybridization patterns of each HLA-B allele. To easily define ambiguities, Polygene 2.0, software developed by ourselves (see below), was also used when it was necessary. Polygene 2.0 can also be used for the interpretation of samples; for this purpose the T_m result of the samples has to be converted into binary code (specified in the following section).

Software analysis

In order to predict the ambiguous typing results obtained in heterozygous samples for HLA-B alleles, we developed the free software Polygene 2.0 [31] (Faner et al, in preparation). Briefly, this software combines binary codes of theoretical assignments of T_m (where 1 means a positive, and 0 a negative signal for each potential T_m) for each HLA-B allele, creating a library of heterozygous combinations that includes allele and combinatorial frequencies calculated from the mean values of the available data of each allele in several Caucasoid populations [32]: Brazil Belo Horizonte, Cuban White, Ireland Northern, Bulgaria, Italy Bergamo, Croatia, Italy North pop 1, Scotland Orkney, Belguim, USA San Antonio Caucasians, Pakistan Burusho, Czech Republic, Pakistan Brahui, Pakistan Kalash, USA Caucasian pop2, Morocco Nador Metalsa Class I, France South East, Romanian, Azores Terceira Island, USA Caucasian Bethesda, Macedonia pop 4, Wales, Australia New South Wales, Italy North Pavia, Georgia Svaneti Svans, Portugal Centre, Portugal South, Portugal North. By using this “theoretical library”, it is possible to give a typing to each sample by codifying the different experimental T_m results (also by 1 and 0 for positive and negative signals respectively). In order to identify the alleles present in each sample, this “experimental code” has to be compared

with the previously generated “theoretical library”. Hence, the result of amplified alleles for each sample is presented in a table with all possible allele combinations and their frequency.

PCR-SSO (sequence specific oligoprobes) and PCR-SBT (sequence base typing)

The samples used in the validation and setting up of our method were typed using conventional PCR-SSO (Dynal Rely SSO HLA-B typing kit, Dynal Biotech, Bromborough, UK).

When a higher resolution was obtained with our method compared to previous typing method (PCR-SSO), we re-typed the high-resolved real-time PCR samples by PCR-SBT using FastStart™ polymerase (Roche, Mannheim, Germany) and BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v2.0 (AbiPrism – PE Biosystems, Foster City, California), as previously described [33].

Results

Set up of the reactions

A total of 250 samples from bone marrow or solid organ transplant patients, or from healthy donors, included in our DNA repository were used to set up our 18 tubes for the FRET real-time PCR approach (figure 1). These samples were selected to represent all serologically defined HLA-B alleles which were available in the Spanish population (both homozygous and heterozygous). Samples were also selected to represent all heterozygous situations involving closer T_m profiles in the same reaction; these heterozygous T_m s were experimentally defined, allowing the accurate assignation in ambiguous heterozygote results.

For each reaction, different concentrations of both sets of primers (locus B and control gene primers) and $MgCl_2$ were experimentally tested in order to find the best combination for obtaining the greatest specific melting signal for the amplified HLA-B alleles in each case, according to the fact that asymmetric PCR amplification generates a higher melting signal ([34]) and to general guidelines for setting up of real time PCR assays[35]. If necessary, DMSO for molecular biology (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) was added to the final reaction following the experimentally concentration titration. When the designed primers or probes did not perform as

expected, we designed new oligonucleotides that included mismatches with the original sequence.

Since the melting step was the main parameter to be analyzed in our assay, we designed the probes in order to work in the same melting conditions. However, several probes had a higher fluorescence level than others; in fact, this variability indicated different PCR efficiencies for individual primer mixes and probes. To overcome this problem, we measured both the maximum and the minimum fluorescence achieved with each reaction (Table 3), establishing the acceptable fluorescence range. Several DNA concentrations (range 10-200 ng) were tested as template for the reactions “data not shown”: variations in DNA concentration were always within the previously established fluorescence range. In general, the minimum fluorescence corresponded to 10 ng of DNA (the minimum amount of sample tested per reaction). If lower fluorescence signals were observed, they were considered to be PCR artifacts.

HLA-B typing by patterns of 18 real time-PCR T_m results

When using a single round step of our methodology, the results of all eighteen reactions were considered (Figure 2 and Figure 3). A total of 61 T_ms were experimentally defined, but another 47 theoretical T_ms were not due to their correspondence to uncommon HLA-B specificities in our population.

In two reactions (tubes 2 and 4), the HLA-B probes provided no fluorescent signal with some of the amplified alleles due to the high number of mismatches with the sensor probe. For practical purposes, these situations were considered to be non-amplified alleles. Similarly, some of the samples in tube 4 (where a T_m of 50°C was detected) provided a low fluorescent signal while others gave no signal. Once again, these T_m results were not taken into account when giving a final allele for any tested sample (indicated with * in Figure 2).

When using these 18 reactions, 108 different melting profiles were defined, allowing the classification of HLA-B allele specificities into 300 groups: 207 unique allele determinations, 54 groups of two alleles, and 39 groups that included three or more alleles per group.

HLA-B typing in three consecutive PCR rounds.

Results of all reactions are not always necessary to obtain a particular typing; and thus to optimize the work in this real time PCR typing procedure we designed a flow-chart

(Figure 4) that made it possible to carry out the typing in several rounds, using the fewest reactions for each typing case: In a first round (Round 1), seven reactions (tubes 1-7) are used for all samples; then depending on the results, next sets of reactions (Round 2 and/or Round 3) can be required to solve ambiguities.

Round 1: The first seven reactions allow the classification of HLA-B alleles into 188 groups: five of these reactions (tubes 1 to 5) amplify exon 2 in all HLA-B alleles, except for B*7301; the two additional reactions (tubes 6 and 7) are designed to amplify many alleles in exon 3. Therefore, the seven initial reactions allow allele characterization by analyzing 26 different experimentally defined melting curves (in theory, these reactions may define 47 Tms, being 21 additional melting curves not tested in this study because they corresponded to uncommon alleles).

Rounds 2 and Round 3: The eleven subsequent amplifications are designed to reach the proposed level of low-medium resolution of our approach. Some of these amplifications are quite restricted, while other ones amplify a broader group of alleles. We differentiated reactions needed to solve homozygous ambiguities (Round 2) from those needed to solve heterozygous ambiguities (Round 3). While some amplifications define directly the allelic group (as tubes 8 and 12), some other reactions (i.e., tubes 16, 17 and 18) are aimed to solve typing ambiguities in heterozygosity (see Figure 5). Obviously, in each genotyping assay, reactions for rounds 2 and 3 can be run simultaneously in the "same second PCR" step.

Analysis of 200 samples

After obtaining satisfactory results on control samples, this protocol was tested blindly in 200 real laboratory samples (randomly selected) from cord blood donors, which were also genotyped by PCR-SSO.

In this study we analyzed the 200 samples consecutively for each reaction. Samples were distributed into 7 sets of Lightcycler runs, including a negative sample (reaction mix with no template) and a positive sample. As a positive sample (usually with two positive melting profiles) we selected a sample for each reaction from the 250 that were used for the set up. These selected samples were used in the seven runs of each reaction, to allow calculating the inter-assay variation of the T_m and the reproducibility of the technique, the arithmetic mean of all the standard deviations observed in the T_m of the positive samples was 0.155°C. In spite of the low variability observed in all positive controls, T_m intervals were established for the assignment of the typing for the samples,

allowing a variability of $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for a specific T_m to consider the sample belonging to this melting group. In one reaction only (tube 2), the T_m of 54°C showed an intra- and an inter-assay T_m variability of $\pm 0.75^{\circ}\text{C}$ (this variation was not observed when assessing other T_m values in this reaction); in contrast, T_m variability was always lower than $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ in the other 17 reactions.

In all cases, the typing obtained with this real-time procedure was 100% concordant with the one obtained with previous methods. Figure 6 shows an example of HLA-B typing of one DNA sample using our method.

Unfortunately, samples from some uncommon HLA-B specificities in our population were unavailable for this last validation.

Interpreting HLA real-time genotyping data and defining indeterminations in the approach

The interpretation of the HLA typing results obtained using real-time PCR was carried out with a probe hit table that included homozygous hybridization patterns for each HLA-B allele, and with the Polygene 2.0 software. From this software analysis, four pairs of not resolvable alleles were found (relative frequencies of each allele are shown inside parenthesis): B*3537 (0.0010443%) versus B*7804 (0.0041772%); B*5401 (0.65895%) versus B*5507 (0.0020886%); B*4047 (0%) versus B*4431 (0%); B*5104 (0.0062658%) versus B*5306 (0%). All these indeterminations involve at least one infrequent allele and moreover B*7804 and B*5507 alleles have been considered in the HLA-Dictionary 2004 [36] by experts as members of the other confused serology group (B*35 and B*54 respectively).

Polygene 2.0 also allowed us to determine whether the coexistence of different HLA-B alleles could lead to typing indeterminations. Finally, Polygene 2.0 demonstrated that in our population only rare alleles lead to misleading HLA assignments (Figure 5). To achieve a more realistic result in the frequency of the alleles, it was obtained by two ways: the first one was obtained as the number of cases of each allele in the samples tested in NMDP [36]; although this study cannot be considered as exact population allele frequencies, this information was selected because it is a realistic example of which level of ambiguity could lead our assay when used for large numbers of samples. A more confident way of obtaining the frequency for an HLA allele was from a mean of all data submitted to Allele Project (AP, from www.allelefrequencies.net) [32]. We selected from AP, data from all Caucasoid population with allele level information.

Figure 5 includes only the indeterminations with values from NMDP of frequency of combination higher than 0.0005 % ($5E^{-6}$) and with a percentage inside the group higher than 1% or values from AP that have submitted frequency. As frequency data from NMDP is now available only for the alleles described during the year 2004 our software analysis only included these alleles.

Discussion

In this report we describe a real-time based assay that avoids some of the major drawbacks of currently available protocols for HLA-B PCR genotyping [8, 9, 12, 13, 15, 37].

When we matricially analyzed all 18 reactions defining 108 different melting profiles, this real-time PCR approach allowed the classification of HLA-B allele specificities into 300 groups (207 unique alleles determinations, 54 groups of two alleles, and 39 groups that included three or more alleles per group). From these 300 groups, based on the frequency obtained from NMDP, there are 166 groups with data. Therefore, our 18-tube approach achieves at least a medium-low resolution genotyping of HLA-B.

A high throughput processing may be achieved using the method in three rounds: although processing time is longer for samples requiring all rounds, this approach allows economizing reagents and personnel efforts. The first round (tubes 1 to 7) defines 188 groups. In some samples (where homozygous ambiguities are found), a second round can resolve these indeterminations. As shown in figure 4, few and restricted indeterminations in homozygous pattern are defined. The third round solves indeterminations in heterozygous combination and in some cases it is required after the first round.

Applying the three round typing procedure, in our validation step from 200 clinical samples, 51 were perfectly typed only with the 7 first reactions, 85 could have been assigned taking into account the frequency of the ambiguities that the result involved, and only for 64 samples further reactions were need to assign a particular typing.

From results of this validation process, we could assume that this new assay has the necessary features to be used for optimal medium-low typing in cord blood banking and in any other clinical genotyping.

Additionally, our global approach did not result in typing indeterminations among frequent alleles (Figure 5), hence providing a higher resolution than several currently available protocols. In fact, in our approach all the indeterminations caused by allele assignment were assessed (a feature that most assays do not consider) and solved by analyzing their frequencies in our population.

The described protocol proved robust when tested in real laboratory samples. It showed the reproducibility, accuracy and simplicity required for clinical diagnosis purposes: i) in most cases, T_m values showed an inter-assay and an intra-assay variation below $\pm 0.5^\circ\text{C}$ (as mentioned above). ii) All PCR-reactions were run for 50 cycles using the same conditions. Furthermore, the amplification reaction could be shortened by reducing the number of cycles, because the amplicon could be readily detected at cycles 25-35. The reaction was run for up to 50 cycles to increase fluorescence signal for the melting step. LightCycler running times are shorter than other thermal cyclers, and 50 cycles can be accomplished in 55 minutes.

Polygene 2.0 software allows the rapid allele assignment, although it requires the manual binary codification of T_m results. An update version of this software, capable to directly convert T_m results to binary code, will be required to fully automate and optimize the real time genotyping analysis method.

Our typing method may be favorably compared with other previously described PCR-based methods [8, 9, 12, 13, 15, 37], since it can substantially reduce some labor-intensive steps and the total processing time. By skipping post-PCR steps, we can obtain typing results in less than 65 minutes and reduce the risk of sample contamination, since the amplified products are always inside a lid-lock tube. Although assay-run times are shorter in LightCycler™ than in other thermocyclers, we may assume that our FRET real-time PCR HLA-B protocol could be easily adapted to other real-time PCR machines. Furthermore, the use of allele-specific probes and more than one probe per reaction allows reducing the number of real-time PCR reactions. As our method uses different MgCl_2 concentrations in the reactions, we have prepared PCR mixes containing all components in batches of several samples. Mixes were kept frozen until use. As no difference was observed from using fresh made premix or frozen premix (data not shown), we can conclude that the difference in MgCl_2 concentration is not a handicap to easily apply the method to conventional lab typing.

Otherwise, as we started the setting up in a LightCycler 1.0, we designed the assay for just two FRET probes per tube; however, if we used a LightCycler 2.0 we could introduce a third FRET probe per tube. Therefore, this addition of a second HLA-B specific probe could allow reducing the number of reactions. Furthermore, this approach could be even more reduced by combining amplifications, but this change would probably require a revision of PCR conditions. In any case, these modifications may result in a further simplification of the real-time PCR typing procedure and a significant reduction in the total cost per test.

In conclusion, in this paper we describe a new robust and reliable real-time PCR-based method using FRET probes for HLA-B genotyping. Our method overcomes some of the limitations of currently used DNA-based typing methods, and it has the main advantages of simplicity (requires very short processing times, few bench steps, and feasibility of automation) and reproducibility. We thus believe that this approach may become the method of choice for HLA-B genotyping in most diagnostic situations.

Acknowledgements

We thank Justí Gil, Roger Colobran, Maria Pilar Armengol for providing some SSO-PCR typed DNA samples from an average Spanish population and for their general support in the laboratory, respectively. We also thank Francesc Borrás for critical reading of the manuscript. This study was supported by a grant from the “Fundació La Marató de TV3”, (project number 00/4830), and by the *Instituto de Salud Carlos Tercero (RC03/03)*. R.F. is recipient of a fellowship from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2002FI/00765) by the Department of Universities, Research and Society of Information. This work is in process of a patent (*Application number pending*).

References:

1. Schaffer M, Aldener-Cannava A, Remberger M, Ringden O, Olerup O: Roles of HLA-B, HLA-C and HLA-DPA1 incompatibilities in the outcome of unrelated stem-cell transplantation. *Tissue Antigens* 62(3):243, 2003.
2. Leung WH, Turner V, Richardson SL, Benaim E, Hale G, Horwitz EM, Woodard P, Bowman LC: Effect of HLA class I or class II incompatibility in

- pediatric marrow transplantation from unrelated and related donors. *Hum Immunol* 62(4):399, 2001.
3. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D: Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 104(7):1923, 2004.
 4. Scott I, O'Shea J, Bunce M, Tiercy JM, Arguello JR, Firman H, Goldman J, Prentice HG, Little AM, Madrigal JA: Molecular typing shows a high level of HLA class I incompatibility in serologically well matched donor/patient pairs: implications for unrelated bone marrow donor selection. *Blood* 92(12):4864, 1998.
 5. Bozon MV, Delgado JC, Selvakumar A, Clavijo OP, Salazar M, Ohashi M, Alosco SM, Russell J, Yu N, Dupont B, Yunis EJ: Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods. *Tissue Antigens* 50(4):387, 1997.
 6. Bozon MV, Delgado JC, Turbay D, Salazar M, Granja CB, Alosco SM, Dupont B, Yunis EJ: Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing. *Tissue Antigens* 47(6):512, 1996.
 7. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17(7):2503, 1989.
 8. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39(5):225, 1992.
 9. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI: Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 46(5):355, 1995.
 10. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324(6093):163, 1986.
 11. Consolandi C, Busti E, Pera C, Delfino L, Ferrara GB, Bordoni R, Castiglioni B, Bernardi LR, Battaglia C, De Bellis G: Detection of HLA polymorphisms by ligase detection reaction and a universal array format: a pilot study for low resolution genotyping. *Hum Immunol* 64(1):168, 2003.
 12. Consolandi C, Frosini A, Pera C, Ferrara GB, Bordoni R, Castiglioni B, Rizzi E, Mezzelani A, Bernardi LR, De Bellis G, Battaglia C: Polymorphism analysis within the HLA-A locus by universal oligonucleotide array. *Hum Mutat* 24(5):428, 2004.
 13. Guo Z, Gatterman MS, Hood L, Hansen JA, Petersdorf EW: Oligonucleotide arrays for high-throughput SNPs detection in the MHC class I genes: HLA-B as a model system. *Genome Res* 12(3):447, 2002.

14. Xiao JQ, Tan JM, Li CT, Kang MH, Fang YH, Li Y, Shen J, Ding YD: [Genotyping of HLA-DRB by oligonucleotide arrays in Han populations in southern China]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83(5):417, 2003.
15. Ringquist S, Alexander AM, Rudert WA, Styche A, Trucco M: Pyrosequence-based typing of alleles of the HLA-DQB1 gene. *Biotechniques* 33(1):166, 2002.
16. Ramon D, Braden M, Adams S, Marincola FM, Wang L: Pyrosequencing trade mark : A one-step method for high resolution HLA typing. *J Transl Med* 1(1):9, 2003.
17. Ringquist S, Alexander AM, Styche A, Pecoraro C, Rudert WA, Trucco M: HLA class II DRB high resolution genotyping by pyrosequencing: comparison of group specific PCR and pyrosequencing primers. *Hum Immunol* 65(2):163, 2004.
18. Han M, Tan YQ, Zhang Y, Tsai J, Vorhaben R, Moraes JR, Moraes ME, Stastny P: Multiplex single nucleotide extension: a robust and high throughput method for HLA-A locus typing. *Hum Immunol* 64(12):1111, 2003.
19. Zhang Y, Han M, Vorhaben R, Giang C, Lavingia B, Stastny P: Study of MICA alleles in 201 African Americans by multiplexed single nucleotide extension (MSNE) typing. *Hum Immunol* 64(1):130, 2003.
20. Bon MA, van Oeveren-Dybiczyk A, van den Bergh FA: Genotyping of HLA-B27 by real-time PCR without hybridization probes. *Clin Chem* 46(7):1000, 2000.
21. Faner R, Casamitjana N, Colobran R, Ribera A, Pujol-Borrell R, Palou E, Juan M: HLA-B27 genotyping by fluorescent resonance emission transfer (FRET) probes in real-time PCR. *Hum Immunol* 65(8):826, 2004.
22. Sylvain K, Aurelie H, Marc M, Christophe R: Rapid screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR assay using sequence-specific primers and a minor groove binder probe, a novel type of TaqMan trade mark probe. *J Immunol Methods* 287(1-2):179, 2004.
23. Tiemann C, Vogel A, Dufaux B, Zimmer M, Krone JR, Hagedorn HJ: Rapid DNA typing of HLA-B27 allele by real-time PCR using lightcycler technology. *Clin Lab* 47(3-4):131, 2001.
24. Casamitjana N, Faner R, Santamaria A, Colobran R, Ribera A, Pujol-Borrell R, Juan M, Palou E: Development of a new HLA-DRB real-time PCR typing method. *Hum Immunol* 66(1):85, 2005.
25. Albis-Camps M, Blasczyk R: Fluorotyping of HLA-DRB by sequence-specific priming and fluorogenic probing. *Tissue Antigens* 53(3):301, 1999.
26. Slateva K, Elsner HA, Albis-Camps M, Blasczyk R: HLA-DRB fluorotyping by dark quenching and automated analysis. *Tissue Antigens* 58(4):250, 2001.
27. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1):130, 1997.
28. Lay MJ, Wittwer CT: Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem* 43(12):2262, 1997.
29. Robinson J, Marsh SG: The IMGT/HLA sequence database. *Rev Immunogenet* 2(4):518, 2000.
30. Schutz E, von Ahlsen N: Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 27(6):1218, 1999.
31. Juan M CJ, Martínez-Cáceres E, de la Fuente MA, Vives J YJ, Gayá A.: Análisis informático de las técnicas de genotipificación de los antígenos HLA de clase II: HETERO V2.0. *Immunologia* 11:14, 1992.

FRET real-time PCR HLA-B typing

Faner et al.

32. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R: New allele frequency database: <http://www.allelefrequencys.net>. *Tissue Antigens* 61(5):403, 2003.
33. Pozzi S, Longo A, Ferrara GB: HLA-B locus sequence-based typing. *Tissue Antigens* 53(3):275, 1999.
34. Barratt K, Mackay JF: Improving real-time PCR genotyping assays by asymmetric amplification. *J Clin Microbiol* 40(4):1571, 2002.
35. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS: Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25(4):430, 2001.
36. Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Fernandez-Vina MA, Noreen HJ, Setterholm M, Maiers M: HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Hum Immunol* 66(2):170, 2005.
37. Jaakkola E, Herzberg I, Crane AM, Pointon JJ, Laiho K, Kauppi M, Kaarela K, Wordsworth BP, Tuomilehto J, Brown MA: A novel human leucocyte antigen-DRB1 genotyping method based on multiplex primer extension reactions. *Tissue Antigens* 64(1):88, 2004.

Table 1. Primers for HLA-B real-time PCR typing.

	Primer	Sequence	Position ^a
1	Pbx1	5' GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG 3'	138
2	R1 as	5' TMCGTGGGGGATGGGGA 3'	515
3	R6s	5' CGCCTCCTCCGCGGGC 3'	781
4	Pbint 3	5' GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT 3'	1037
5	R7s	5' CCCTGAACGAGGACCTGA 3'	846
6	R8s	5' GCCAGGGTCTCACACCC 3'	737
7	^b R8as1	5' CGGCGGTCCAGGAGCT 3'	846
8	^b R8as2	5' CCGCGGTCCAGGAGCT 3'	846
9	R10s	5' GTCCAGGGTCTCACACTTG 3'	729
10	^b R10as1	5' AGCCACTCCACGCACAG 3'	941
11	^b R10as2	5' GCCCCTCCACGCACAG 3'	941
12	R11s	5' GTCTCACACCCTCCAGAGC 3'	745
13	R11as	5' GCGCGCTCCAGCTTG 3'	985
14	R12s	5' AGGTATTTCTACACCGCCA 3'	243
15	R12as	5' CGGTAAGTCTGCGCGGA 3'	416
16	R13s	5' GGAGCCCCGCTTCATCT 3'	279
17	^b R13as1	5' GGTCACTGTGTGTGGT 3'	414
18	^b R13as2	5' CGGTAAGTCTGTGTGTGGT 3'	414
19	^b R13as3	5' GGTAAGTCCGTGTGTGGT 3'	414
20	R14s	5' CCGGGTCTCACACTTGG 3'	729
21	R14as	5' AGCCACTCCACGCACGT 3'	941
22	R15s	5' GGAGCCCCGCTTCATCA 3'	279
23	R15as	5' CTGTGCCTTGGCCTTGC 3'	409
24	R16s	5' CACACAGACTTACCGAGAGAA 3'	419
25	R16as	5' GCCATACATCGTCTGCCAA 3'	729
26	R17s	5' GGCTACGTGGACGACACC 3'	292
27	Bw4as	5' GCTCTGGTTGTAGTAGCGGA 3'	454
28	Pc03	5' ACACAACCTGTGTTCCTACTAGC 3'	199
29	Pc04	5' CAACTTCATCCACGTTACC 3'	270
30	4o1	5' GCAGAGGAAGATGCCTACCAC 3'	1335
31	442 as	5' GGCAGAGGAAGATGCAAAG 3'	1548

^a Positions are on reference to genomic sequence.

^b Primers used mixed in the reaction, see table 3 (MR8as, MR10as, MR13as).

FRET real-time PCR HLA-B typing

Faner et al.

Table 2. Probes for HLA-B real-time PCR typing

	Probe	Sequence	Labeling	Position ^a
1	P 6s	5'CGGGTATAACCAGTTCGCCT 3'	3' Fluos	777-806
2	P 6a	5'CGACGGCAAGGATTACATCGCCCT 3'	5' LC-Red 640	810-821
3	P 9s	5'GCCGGAATATTGGGACC 3'	5' Fam	377-395
4	P 9a	5'GCCGTGGATAGAGCAGGAGG 3'	3' LC-Red 640	357-375
5	P 1a	5'TGAGGTTTCACAGCGACGCC 3'	3' LC-Red 640	310-329
6	P 1s	5'GAGTCCGAGGATGGCGC 3'	5' Fam	332-347
7	P 8s	5'CAGAGGATGTACGGCTGCG 3'	3' Fluos	740-758
8	P 8a	5'CGTGGGGCCGGACGG 3'	5' LC-Red 640	760-755
9	P 14s	5'CCGGTGAGGCGGAGCAGCT 3'	3' Fluos	903-921
10	P 14a	5'AGAGCCTACCTGGAGGGCCTGTG 3'	5' LC-Red 640	923-935
11	P 73s	5'GCTACGTGGACGACCCAGT 3'	3' Fluos	286-306
12	P 73a	5'CGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCG 3'	5' LC-Red 640	308-330
13	P 2s	5'CACTGCGATGAAGCGGGG 3'	5' Fam	267-284
14	P 2a	5'GCAACTGGGTGTCGTCCACGTAGC 3'	5' LC-Red 640	286-309
15	P 20s	5'GGAACCTGCGCGGCTACTACAACCA 3'	3' Fluos	435-459
16	P 20a	5'AGCGAGGCCGGTGAGTGACCCCGG 3'	5' LC-Red 640	471-494
17	P 19s	5'GTGTGTTGGTCTTGAAGATCT 3'	3' Fluos	403-421
18	P 19a	5'GTGTTCCGGTCCCAATACTCC 3'	5' LC-Red 640	380-400
19	P 18s	5'CGAGTCCGAGAGAGGAGCC 3'	5' Fam	331-347
20	P 5s	5'GGGCATGACCAGTACGCCT 3'	3' Fluos	778-806
21	CTW LC	5'AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA 3'	5' LC-Red 705	205-239
22	CTW FL	5'CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA 3'	3' Fluos	241-269
23	C2a	5'TCAGCACAGACTTGCTTGCTTCTTTT 3'	3' Fluos	1409-1430
24	C2s	5'TTTGGAATCTGTAGAACAAGGAG 3'	5' LC-Red 705	1386-1406

^a Positions are on reference to genomic sequence.

Table 3. PCR reagents and Fluorescence level observed for each reaction.

Tube	Sense Primer	Sense μ M	Antisense Primer	AS μ M	Anchor probe	Anchor μ M	Sensor Probe	Sensor μ M	DMSO	Mg ²⁺ mM	Fast Start Master H.P	Minimum fluorescence	Maximum fluorescence
1	Pbx1	0.2	R1 as	1.4	P20A	0.2	P20S	0.2	2%	5 mM	1X	0.002	0.01
	PC 03	0.2	PC 04	0.6	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
2	Pbx1	0.5	R1 as	0.5	P19a	0.2	P19s	0.4	2%	5 mM	1X	0.002	0.013
	PC 03	0.2	PC 04	0.6	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
3	Pbx1	0.2	R1 as	1.4	P73a	0.2	P73s	0.2	2%	4 mM	1X	0.003	0.012
	PC 03	0.2	PC 04	0.6	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
4	Pbx1	0.5	R1 as	0.5	P2a	0.2	P2s	0.2	2%	5 mM	1X	0.002	0.007
	PC 03	0.2	PC 04	0.6	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
5	Pbx1	0.2	R1 as	1.6	P1a	0.2	P18s	0.2	2%	5 mM	1X	0.002	0.007
	4a1s	0.6	442as	0.2	C2a	0.2	C2s	0.2					
6	R6s	0.2	Pbint 3	0.6	P14a	0.2	P14s	0.2	-	3 mM	1X	0.002	0.011
	PC 03	0.2	PC 04	1.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
7	R7s	0.1	Pbint 3	0.5	P14s	0.2	P14a	0.2	-	3 mM	1X	0.002	0.007
	PC 03	0.2	PC 04	1.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
8	R8s	0.2	^M R8as	0.6	P6a	0.2	P6s	0.2	-	3 mM	1X	0.0045	0.03
	PC 03	0.4	PC 04	2.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
9	R8s	0.2	^M R8as	0.8	P8a	0.4	P8s	0.2	-	3.75 mM	1X	0.002	0.011
	PC 03	0.2	PC 04	2.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
10	R10s	0.2	^M R10as	1.0	P14a	0.2	P14s	0.2	-	3 mM	1X	0.0045	0.01
	PC 03	0.2	PC 04	1.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
11	R11s	0.4	R11as	1.0	P6a	0.2	P6s	0.2	-	5 mM	1X	0.0045	0.017
	PC 03	0.2	PC 04	1.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
12	R12s	0.2	R12as	1.0	P1a	0.2	P1s	0.2	-	4 mM	1X	0.001	0.006
	PC 03	0.2	PC 04	1.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
13	R13s	0.2	^M R13as	1.4	P9a	0.2	P9s	0.2	-	3 mM	1X	0.017	0.021
	PC 03	0.2	PC 04	1.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
14	R14s	0.2	R14as	1.0	P6a	0.2	P5s	0.2	-	5 mM	1X	0.003	0.09
	PC 03	0.2	PC 04	0.6	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
15	R15s	0.1	R15as	1.4	P73a	0.2	P73s	0.2	-	4.5 mM	1X	0.0045	0.023
	PC 03	0.2	PC 04	1.0	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
16	R16s	0.5	R16as	1.5	P20A	0.2	P20S	0.2	-	3 mM	1X	0.005	0.012
	PC 03	0.2	PC 04	0.5	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
17	R17s	0.2	Bw4as	0.5	P1a	0.2	P1s	0.2	-	5 mM	1X	0.03	0.07
	PC 03	0.2	PC 04	1.2	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					
18	Pbx1	0.2	Bw4as	1.0	P1a	0.2	P18s	0.2	-	4 mM	1X	0.02	0.07
	PC 03	0.2	PC 04	0.6	CTW LC	0.2	CTW FL	0.2					

^M means mixture of as primers for this reaction, cases: R8, R10 and R13.

Figure legends

Figure 1:

Distribution of the eighteen reactions in exons 2 and 3. Arrows represent primers and gray rectangles probe-regions. Numbers next to the represented amplification refer to the reaction tube.

Figure 2:

Correspondence of T_m results with allele names, for the first seven reactions considered as the first round of PCRs. Number of reaction, list of T_ms and corresponding allele names are expressed in columns. “No T” means situation not tested and “*” not always observed. The first two letters of the HLA-B allele names are written in bold style for each allele family included in the same T_m; when there are only two digits of an allele name, it means the whole allele family is included; when referring to the last allele of a family, names are written in bold and italic style at the end; “-“ (i.e. 1507-25) means alleles included from the first number (1507) to the second one (1525); “/” (i.e. 1402/04) means exactly the specified alleles (1402 and 1404, but not 1403).

Figure 3:

Correspondence of T_m results with allele names, for the following eleven reactions, PCRs rounds two and three. Number of reaction, list of T_ms and corresponding allele names are expressed in columns. “No T” means situation not tested. The first two letters of the HLA-B allele names are written in bold style for each allele family included in the same T_m; when there are only two digits of an allele name, it means the whole allele family is included; when referring to the last allele of a family, names are written in bold and italic style at the end; “-“ (i.e. 1507-25) means alleles included from the first number (1507) to the second one (1525); “/” (i.e. 1402/04) means exactly the specified alleles (1402 and 1404, but not 1403).

Figure 4:

Typing in three rounds. A) First PCR round; initial characterization of alleles in groups, B) Second PCR round; reactions required for solving homozygous allele indeterminations, C) Third PCR round; reactions required for solving heterozygous allele indeterminations. In each reaction only alleles with known frequency are shown.

Figure 5:

Ambiguities found in heterozygous HLA-B situation. Combinatorial frequencies of HLA-B alleles calculated from the mean of all Caucasian information available from Allele Project (AP column), and also (although not considered as population frequency) from the number of cases where they achieved allele frequency level in the National Marrow Donor Program (NMDP column). This figure presents only the indeterminations with values from AP that have submitted frequency, or values from NMDP higher than 0.0005 % ($5E^{-6}$) and with a percentage inside the group (% in group) higher than 1%.

Figure 6:

Example of the results of the eighteen reactions used to obtain the typing of a sample. A/ For each reaction the melting plot is shown, represented by fluorescence in 640/back 530 versus temperature, corresponding to HLA-B probe signal. Vertical lines indicated the specific Tms, and in each plot are indicated the melting temperatures of the sample. B/ Last plot presents an example of amplification curves of the beta-globin control gene (fluorescence in 705/back 530 versus cycle).

Figure 1:

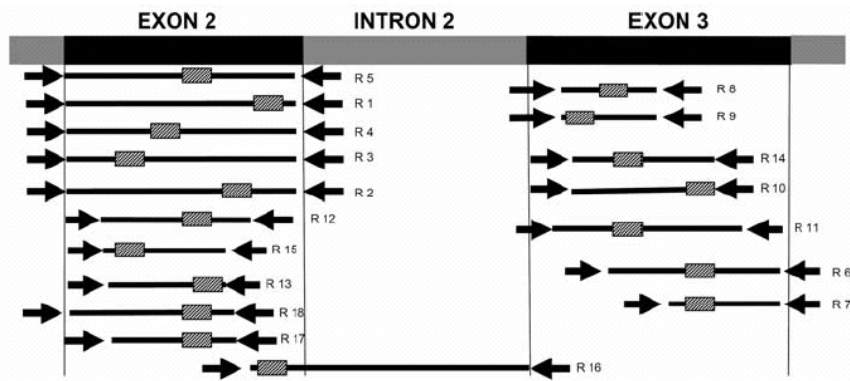


Figure 2

FIRST SEVEN REACTIONS			
TUBE	TM	HLA-B Allels	
1	57	0727; 1543; 2703-07/09-11/13-17/19-25; 3701-04/06-07; 4701; 5303.	
	54	0802; 1301-08/10-13; 1536/89; 1809; 2701; 3802-04/08; 4047; 4402-05/07-08/10-17/19N-24/26-40; 4704; 4902; 5309; 5607.	
	51	0736/38; 0803; 1513/16-17/23-24/67/87; 2702; 3801/05-07/09-10; 4012/19; 4406/18/25; 4901/03; 5101-11/13-36; 52; 5301-02/04-08; 5701-07/09; 5801-07/10N; 59.	
	71	0701-22/24-26/28-37; 0801/04-22; 1309; 14; 1501-12/14-15/18-21/25-35/37-42/44-66/68-84/89/92-94N; 1801-08/10-20; 2708/12/18; 3501-35/37-53N; 3705; 39; 4001-11/13-18/20-46/48-57; 41; 42; 4409; 45; 46; 4702; 48; 50; 54; 55; 5601-06/08-14; 67; 78; 81; 82; 83.	
	No T.	0723.	
	No T.	5808-10N.	
	No T.	4703.	
2	61.5	0708/32/38; 0801-03/06-16/18-22; 1508/29/56; 1807; 2723; 3501-19/21-25/27/29-53N; 3806-07; 4007-08/13; 4406; 4806; 5101-06/08-21/23-36; 5206; 5301-08; 59; 7801-02/04.	
	45	0710; 2701-11/13-15/17/19-21/24-25.	
	54	0727; 0804/17; 1301-06/08-13; 1501-07/12-15/19-20/24-28/30-36/38-43/45-50/53-55/57-65/68-71/73-75/77-79/83-92/94N; 1801-06/08-20; 2718; 3520/28; 37; 3803; 3902/08/13/23; 400101-0104/02-06/09-12/14-57; 41; 440201/440203-05/07-40; 4501-05/07; 47; 4801-05/07-10; 49; 50; 5107; 5201-05; 5309.	
	58	1401-03/05-06; 1509-10/18/21-23/37/44/51-52/66/72/80/93; 2712/16; 3526; 3801-02/04-05/08-10; 3901/03-07/09/11-12/14-15/18-19/22/24-32; 400105; 5122; 7803.05.	
	No T.	0715.	
	No T.	0805.	
	No T.	4601-02.	
3	60.3	070203; 08; 14; 150104/03/09-10/16/18/23/29/37/47/49/51-52/54/61-62/64/67/69/72/74/80/93; 3525; 38; 39; 4010/12; 54; 55; 5601-02/04-05/07-14; 59; 67; 82.	
	67.5	070201-0202/0204-38; 13; 150101-0103/02/04-08/11-15/17/19-21/24-28/30-36/38-46/48/50/55-60/63/65-66/68/70-71/73/75-79N/81-92/94N; 3501-3524/3526-53N; 37; 4021; 42; 4405-06; 46; 48; 4903; 51; 52; 53; 5603/06; 57; 58; 78; 81; 83.	
	58.60	1553; 27; 4001-09/11/13-20/22N-57; 41; 4402-04/07-25/27-40; 45; 47; 4901-02; 50.	
	62	18	
	No T.	4426.	
	4	66	150101-0103/0105/02/04-08/11-15/17/19-21/24-28/30-36/38-46/48/50/55-60/63/65-66/70-71/73/75-79N/82-92/94N; 3501-24/26-53N; 4021; 46; 510102/0202/05/15; 520102/0103/04; 5301-05/07-09; 57; 5801-07/09-10N; 780201/04-05.
		64	150104/1516/1567; 4010; 54; 5501-09/11-16; 5601-04/0502/07-14; 59.
59		1804; 4406/34; 4903; 510101/0103-0201/03-04/06-14/16-36; 520102/0104-03/06; 5306; 560501/06; 5808; 7801/0202-03.	
50*		All other.	
No T.		0721.	
No T.		4805.	
No T.		5205.	
5	68	0701-12/14-38; 08; 14; 1503/09-10/18/23/29/37/47/49/51-52/54/61-62/64/68-69/72/74/80/93; 27; 3525-26/49; 3801-05/08-10; 3901-18/20-32; 4011/46; 42; 4440; 48; 5501-05/08-16; 5601-05/07-14; 59; 6701; 81; 82; 83.	
	47	13; 1501-02/04-08/1101/12-17/19-21/24-28/30-36/38-45/48/50/55-60/63/65-67/70-71/73/75-79N/81-92/94N; 3546; 4021; 4408; 4601-03; 5202; 57.	
	59	1546/53; 18; 3501-24/27-45/47-48/50-53N; 37; 3806-07; 3919; 4001-10/12-20/22N-45/47-57; 41; 4402-07/09-39; 45; 47; 49; 50; 51; 5201/03/05-06; 530101/02-09; 5606; 58; 78.	
	61	0713; 64; 5607.	
	No T.	151102.	
	No T.	5204.	
	No T.	4604.	
6	62.5	0806/20; 1502-03/06/09-10/13/16/18/21-23/25/29/36-37/39/42/44/61-62/64-65/67/69/72/74/93; 1815; 3511/21; 3810; 4005/26/28/51; 4603; 5101-04/06-07/11N-14/17-18/21-30/32-33/35; 5201-02/04-06; 5306/08; 5501/03/05/11/15; 5605/06; 5709; 5806; 7801-03/05.	
	58	0813; 1301-09/11-13; 1501/04-05/07-08/11-12/14-15/19-20/24/26N-28/30-35/38/43/45-46/48/50/52-60/63/66/68/70-71/73/76-82/84-87/92/94N; 1801-14/17N-19; 2707/11; 3501-10/12-29/22-37/39-53N; 3801-09; 3901-25N/27-32; 4001-04/06-08/10-14/18-22N/24-25/27/29-31/33-40/43-50/52-57; 4410/31/36-39; 4601-02/04; 4801-04/06-10; 5105/09-10/15/19/31; 5203; 5301-05/07/09; 54; 5502/04/07-08/10/12-14/16; 5601-04/07-12/14; 5701-03/06-08; 5801-04/07-10N; 59; 67; 7804; 81.	
	51	0729; 0801-05/07-12/15-19/21-22; 1551/83; 3538; 41; 42; 4414/17/34-35; 5108/20; 5613; 82.	
	61	0702-13/15-16/18-24/26-27/29-38; 1540/47/48; 2720/24; 3707; 4015-16/23/32; 4805; 5116/34; 5509.	
	No T.	3926.	
	No T.	5805.	
	No T.	5136.	
7	51	1551/83; 3538; 3701/03N-06; 4402/05-06/08-09/11-12/14-25/27/33-35; 45; 5108/20; 5613; 82; 83.	
	58	13; 1501/04-05/07-08/11-12/14-15/19-20/24/26N-28/30-32/34-35/38/43/45-46/48/50/52-60/63/66/68/70-71/73/76-77/79N/81-82/84-87/92/94N; 1801-14/17N-20; 2701-03/05/08-09/12-14/16-17/19/23/25; 3501-08/10/12-17/19-20/22-30/32-37/39-53N; 3702; 3801-09; 3901-3925/27-32; 4035; 4403-04/10/13/26/28-30/32/36-40; 4601-02/04; 47; 4802; 5105/09/15/19/31; 5203; 5301-05/07/09; 54; 5502/07/10/12-13/16; 5601-04/07-12/14; 57; 5801-04/07/09-10N; 59; 67; 7804.	
	62.5	14; 1502-03/06/09-10/13/15-18/21-23/25/29/36-37/39-42/44/47/49/61-62/64-65/67/69/74/80/89/93; 1815; 2704/06/10/15/18/21; 3511/21; 3810; 4026/28; 4407/4603; 4803-08; 49; 50; 5101-04/06/07/11N-14/16-18/21-23/26-30/32-35; 5201-02/04-06; 5306/08; 5501/03/05/09/11/14-15; 5605-06; 5806/08;	
	No T.	1538.	
	No T.	5136.	

FRET real-time PCR HLA-B typing

Faner et al.

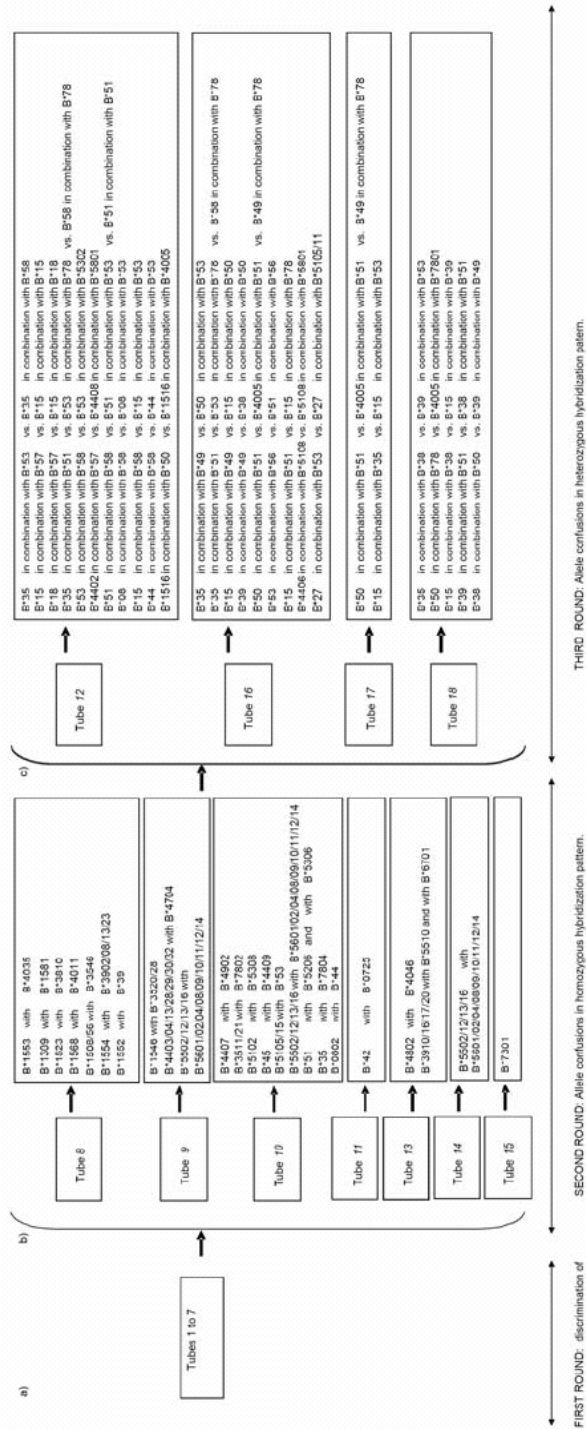
Figure 3:

FOLLOWING REACTIONS		
TUBE	TM	HLA-B Allels
8	62	14.
		15010101/0101-0105/03/05/07-08/11-12/14-15/18-19/23-24/27-29/32/34-35/38-40/43/46-47/49-54/56-57/60-61/64-66/68-71/74-76/79/81-82/84-87/92-94N; 1801-15/18-19; 3505/32/43/51; 3907; 46; 5603; 5802/06-07.
	48	5802/06-07.
	54	1310; 1506/31/55; 1820; 3544.
	55	15010102N/09/26N/30/48; 1817N; 3522; 3914; 4026/35; 5106.
	40	1517; 2701-05/08/10/12-13/15-18/23/25; 3702; 47.
	58	1558; 38; 3901-05/08-13/16/18-28/30-32; 67.
45	5602/04; 82.	
9	60	1310-11; 140601; 150101-0105/03/05/08-12/41-15/17-19/23-24/28-31/34/37-40/43/46-54/58-61/63-66/69-71/73-76/79N/81-82/87/92-94N; 1801/03-07/09-13/15-17/19-20; 2721; 3532/43-44; 38, 3901-02/04-05/07-08/10-13/15/17-23/25-28/30-32; 4026; 46, 5106; 5602-04/10; 67.
	49	1401-04; 5802/06-07.
	53	1506/27/84; 4701-03; 82.
	44	1802; 2701-06/08-10/12-13/15-18/23/25; 3702; 4704.
	No T.	140602.
	45	1405, 1507/45/55/68; 1814; 3505/22/51; 3903/14/29; 4035.
	No T.	1808.
	No T.	3916.
	No T.	3924.
	No T.	1535.
No T.	1532; 1818; 3909.	
10	51	4415/18/20; 45; 5108/20; 5613.
	57	1303-04; 1504; 3537; 5105/09/15/19; 5203; 5601/07-08/14; 5808; 7804.
	62	1516/67; 49; 50; 5101-03/07/11N-14/22-30/32-33/35; 5605-06/74; 7801-03/05.
11	44	0701-04/08/10/13/15-16/20-27/29-31/35-38; 3707; 4031-32; 4806.
	54	0705-06/32/34; 0801-08N/10-11/13-22; 4015/16/45; 4201-05; 4801/06/09-10, 81.
	No T.	0709/11.
	No T.	0717.
	No T.	0728.
No T.	4807; 4206.	
12	58	1516/17/67; 57.
	48	5801-06/05-70N.
13	61	14; 3801-03/05/08-10; 390101-0103/0201/03-09/11-12/14-15/18/22/24-32.
		0703/08/16/27/32/37-38; 08; 1509-10/18/23/29/37/47/49/51-52/54/61-62/64/68-69/72/74-75/80/93;
	52	1801-03/05-20; 3525; 37; 3804/06; 390202/10/13/16-17/19-20/23; 4012; 48.
	No T.	3807.
No T.	390104.	
14	60	0809; 1583; 4101/05-06; 4204; 5121/36; 5516.
	55	3906; 5515.
	48	1542; 54; 5501-03/05-07/08-13; 59.
15	68	73.
	58	2701-17/19-21/24-25.
16	57	1302-04/08; 4420; 4902; 5607.
	51	1516/67; 4418; 4901/03; 510101-0104/02-03/05/07-11N/13-19/21-36; 52; 59.
	No T.	5512.
No T.	5112.	
17	59	1301-08/10-13; 1513/17/24/36/43/87/89; 5202; 67.
	48	1809; 3701-04/06-07; 4406; 4903; 5101-24/27-36; 520101-0102/0104/03-05; 530101/02-09; 58.
	No T.	5126.
	No T.	520103; 5206.
	No T.	530102.
No T.	0727/36/38.	
18	68	0727/36/38; 0802-03; 1523; 2701-07/09-11/13-17/19-25; 3801-05/08-10; 4440; 5607; 59.
	47	13; 1513/16-17/24/36/43/67/87/89; 4408; 5202; 57.
		1809; 3701-04/06-07; 3806-07; 4013/19/47; 4402-07/10-39; 4701/03-04; 49; 5101-24/27-36; 520101-0103/03-05; 530101/02-09; 58.
	No T.	5126.
	No T.	530102.
No T.	520103; 5206.	

FRET real-time PCR HLA-B typing

Faner et al.

Figure 4



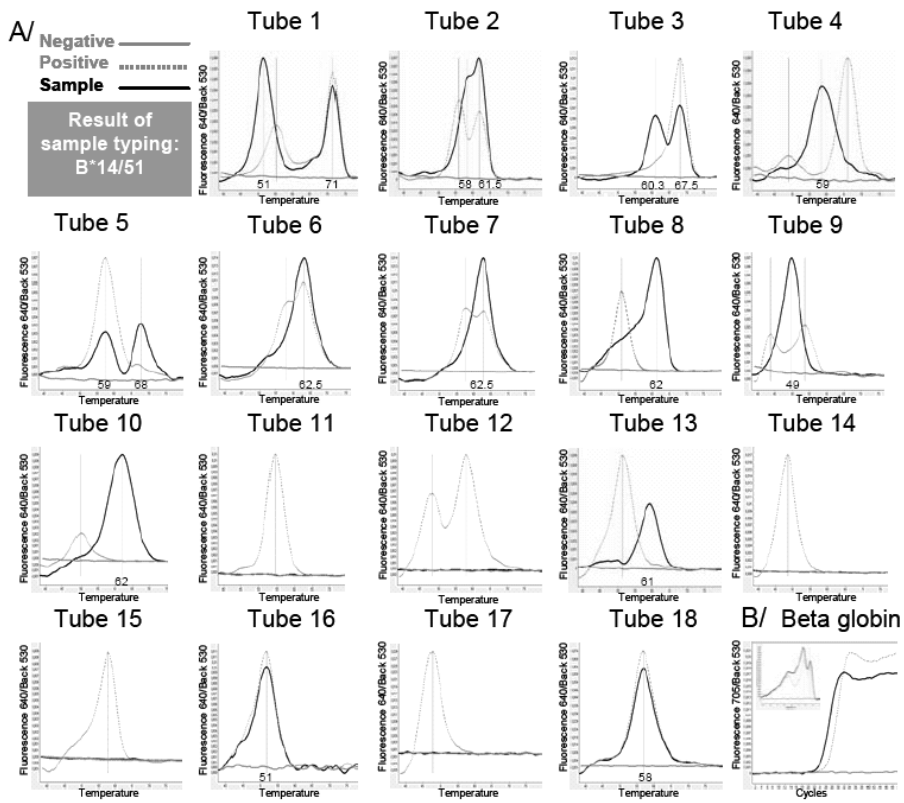
FRET real-time PCR HLA-B typing

Faner et al.

Figure 5

Number	Allele 1	Allele 2	AP	NMDP
			Frequency of combination (% in group)	Frequency of combination (% in group)
1	B*5001	B*520101	2,14E-04 (78,79%)	5,23E-04 (81,65%)
	B*4005	B*520101	1,04E-05 (3,84%)	9,02E-05 (14,07%)
	B*5002	B*520101	4,71E-05 (17,37%)	2,43E-05 (3,79%)
	B*4009	B*520101	nd (-)	2,16E-06 (0,34%)
	B*5004	B*520101	nd (-)	9,24E-07 (0,14%)
2	B*0801	B*4102	8,61E-04 (100,00%)	3,40E-04 (96,33%)
	B*0801	B*4103	nd (-)	7,82E-06 (2,22%)
	B*0801	B*4009	nd (-)	4,98E-06 (1,41%)
3	B*5001	B*510101	1,69E-03 (78,79%)	3,52E-04 (72,90%)
	B*4005	B*510101	8,24E-05 (3,84%)	6,07E-05 (12,56%)
	B*5001	B*510201	nd (-)	4,04E-05 (8,37%)
	B*5002	B*510101	3,72E-04 (17,37%)	1,64E-05 (3,39%)
	B*4005	B*510201	nd (-)	6,97E-06 (1,44%)
4	B*3701	B*8101	1,60E-05 (62,07%)	1,23E-04 (51,85%)
	B*3701	B*4801	9,76E-06 (37,93%)	1,14E-04 (48,15%)
5	B*3801	B*390101	3,22E-04 (79,64%)	1,20E-04 (57,77%)
	B*3801	B*3905	4,39E-05 (10,85%)	6,19E-05 (29,73%)
	B*3801	B*670101	3,85E-05 (9,51%)	2,05E-05 (9,83%)
	B*3801	B*3911	nd (-)	4,04E-06 (1,94%)
6	B*180102	B*8101	nd (-)	1,18E-04 (50,86%)
	B*180102	B*4801	nd (-)	1,09E-04 (47,22%)
	B*1803	B*8101	1,74E-06 (62,07%)	2,08E-06 (0,90%)
	B*1803	B*4801	1,07E-06 (37,93%)	1,93E-06 (0,83%)
7	B*0801	B*3910	4,87E-05 (30,33%)	9,03E-05 (60,74%)
	B*0801	B*670101	1,12E-04 (69,67%)	5,76E-05 (38,74%)
8	B*4102	B*4201	4,18E-05 (70,11%)	5,29E-05 (89,33%)
	B*4102	B*4202	1,78E-05 (29,89%)	4,17E-06 (7,04%)
	B*4103	B*4201	nd (-)	1,22E-06 (2,06%)
	B*4009	B*4201	nd (-)	7,75E-07 (1,31%)
9	B*5001	B*7801	3,49E-05 (78,79%)	3,89E-05 (81,65%)
	B*5002	B*7801	7,68E-06 (17,37%)	1,81E-06 (3,79%)
	B*4005	B*7801	1,70E-06 (3,84%)	6,71E-06 (14,07%)
10	B*4501	B*5108	5,24E-06 (52,77%)	3,87E-05 (81,95%)
	B*4102	B*5108	4,69E-06 (47,23%)	8,03E-06 (16,98%)
	B*4502	B*5108	nd (-)	6,72E-08 (0,14%)
11	B*5109	B*5301	3,94E-06 (91,39%)	1,43E-05 (98,89%)
	B*5109	B*5302	3,18E-07 (7,38%)	2,34E-08 (0,16%)
	B*5105	B*5109	5,30E-08 (1,23%)	1,17E-07 (0,81%)
12	B*0804	B*4801	9,29E-07 (37,93%)	4,66E-07 (48,15%)
	B*0804	B*8101	1,52E-06 (62,07%)	5,02E-07 (51,85%)
13	B*4801	B*4801	6,17E-07 (37,93%)	4,06E-05 (48,11%)
	B*4801	B*8101	1,01E-06 (62,07%)	4,37E-05 (51,81%)
14	B*5105	B*5301	6,14E-07 (91,39%)	8,33E-06 (98,93%)
	B*5105	B*5302	4,96E-08 (7,38%)	1,36E-08 (0,16%)
	B*5105	B*5105	8,26E-09 (1,23%)	6,82E-08 (0,81%)
15	B*1802	B*4801	1,81E-07 (37,93%)	2,22E-06 (51,85%)
	B*1802	B*8101	2,97E-07 (62,07%)	2,06E-06 (48,15%)
16	B*4801	B*4802	6,54E-08 (37,93%)	2,59E-06 (48,15%)
	B*4802	B*8101	1,07E-07 (62,07%)	2,79E-06 (51,85%)

Figure 6



V.III.1 Consideracions inicials al capítol III: Tipificació HLA-DRB1

En els dos capítols anteriors hem vist que la tècnica de la PCR a temps real, combinada amb les sondes d'hibridació Light Cycler FRET, és una eina capaç de resoldre la genotipificació d'HLA-B amb diversos avantatges enfront a les altres metodologies convencionalment utilitzades. Tot i això, existeixen altres tipologies de sondes d'hibridació que pel seu marcatge i les màquines que el llegeixen permeten una major multiplicitat de sondes en un tub. Tal i com s'ha comentat en l'apartat d'hipòtesis aquestes sondes combinades amb la PCR a temps real haurien de poder ser aplicades a la tipificació d'un locus HLA de classe II com és el DRB1. De forma concreta, l'aplicació de la PCR a temps real amb sondes de tipus Taqman® per a la tipificació del locus HLA-DRB1 hauria de permetre:

1. Aconseguir una major resolució de tipificació utilitzant el mínim nombre de reaccions d'amplificació, a través de combinar diferents sondes en un mateix tub.
2. Disminuir el temps de processament de la tècnica, tant per l'eliminació de les manipulacions post-PCR com per la disminució del temps d'anàlisi.
3. Eliminar el risc de contaminació per producte de PCR (ja que l'amplímer queda tancat en el tub).

V.III.1.1 Per tant s'ha pretès dissenyar un sistema de tipificació d'HLA DRB1 basat en l'ús de la PCR a temps real amb sondes Taqman® centrant-se en la resolució dels següents punts:

1. Assolir una tipificació de baixa-mitja resolució del locus HLA-DRB1.
2. Minimitzar el nombre de reaccions i de sondes d'hibridació a utilitzar per tal d'aconseguir una discriminació suficientment significativa que comporti el mínim esforç de realització i un cost econòmic assumible (combinació del màxim nombre possible de sondes Taqman® en un mateix tub, i de la detecció mitjançant encebadors específics i sondes específiques).
3. Co-amplificar les reaccions amb un gen control, per tal de garantir la presència de DNA en tots els tubs.
4. Conèixer les ambigüitats de tipificació que genera el sistema en totes les possibles mostres heterozigotes per al locus d'HLA DRB1.

5. Validar el sistema en mostres normals enviades a tipificar amb finalitat diagnòstica (comparant els resultats obtinguts mitjançant aquesta metodologia amb els obtinguts amb altres mètodes convencionals de tipificació).

V.III.2 Resum (traducció adaptada del resum de l'article)

Els mètodes de tipificació basats en la reacció en cadena de la polimerasa que s'utilitzen actualment en la majoria de laboratoris d'histocompatibilitat (com són la PCR-SSP i la PCR-SSO) tenen un temps de durada llarg i comporten un risc de contaminació durant l'elaboració dels processos post-PCR. L'objectiu d'aquest estudi ha estat desenvolupar una metodologia de tipificació basada en la PCR a temps real (rt-PCR) per HLA-DRB1 i -DRB3/4/5 de baixa-mitja resolució, que evitès els problemes de les metodologies convencionals. Aquest nou mètode desenvolupat combina la utilització d'encebadors i sondes específiques per als al·lels d'HLA-DRB. En cada una de les 16 reaccions de l'aproximació s'utilitza una parella d'encebadors i dues sondes específiques (FAM i VIC) per al gen de DRB. Per tenir un control positiu intern, cada tub alhora conté una parella d'encebadors i una sonda TET pel gen de la gliceraldehid fosfat deshidrogenasa. Aquest disseny permet una significativa reducció del nombre de reaccions a realitzar i del temps de processat, mentre que la resolució de la tipificació es veu augmentada. Després de testar la metodologia en 100 mostres i obtenir resultats satisfactoris, la tècnica va ser validada utilitzant-la per l'anàlisi de 200 mostres clíniques que prèviament havien estat tipificades per HLA-DRB utilitzant una metodologia basada en PCR convencional. Els resultats van ser idèntics en totes les mostres. Aquesta nova metodologia alhora va reduir el nombre de resultats ambigus, va ser més ràpida i va presentar menys inconvenients que les tècniques de PCR-SSP o PCR-SSO actualment utilitzades.



Development of a New HLA-DRB Real-Time PCR Typing Method

Nàtalia Casamitjana, Rosa Faner, Albert Santamaria, Roger Colobran, Anna Ribera, Ricardo Pujol-Borrell, Manel Juan, and Eduard Palou

ABSTRACT: Polymerase chain reaction (PCR)-based human leukocyte antigen (HLA) typing methods currently used in most histocompatibility laboratories, such as PCR-sequence-specific primers (PCR-SSP) and PCR-sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSO), are time-consuming and are at risk of contamination during the post-PCR process. The aim of this study was to develop a real-time PCR (rtPCR)-based HLA-DRB1 and -DRB3/4/5 low-medium resolution typing method to avoid these problems. This new method combined the use of specific primers and probes for HLA-DRB alleles. One pair of DRB gene primers and two DRB-specific probes (FAM and VIC) were used per reaction in each of a set of 16 PCR reaction tubes. To provide an internal positive control, each tube also contained a pair of primers and a TET probe for glyceral-

dehyde phosphate dehydrogenase. This allowed a very significant reduction in the number of reactions and the processing time, whereas typing resolution increased. After successful testing on 100 samples, the technique was validated in 200 clinical samples that had previously been typed for HLA-DRB using a standard PCR-based method. Identical results were obtained with all samples. This new method also reduced ambiguous results and was faster and less cumbersome than currently used PCR-SSP or PCR-SSO techniques. *Human Immunology* 66, 85-91 (2005). © American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2005. Published by Elsevier Inc.

KEYWORDS: fluorotyping; HLA-DRB; real-time PCR; TaqMan

ABBREVIATIONS

HLA human leukocyte antigen
PCR polymerase chain reaction
PCR-SSP polymerase chain reaction-sequence-specific primers

PCR-SSO polymerase chain reaction-sequence-specific oligonucleotide probes
rt-PCR real-time polymerase chain reaction

INTRODUCTION

Human leukocyte antigen (HLA) typing by polymerase chain reaction (PCR)-based techniques is widely used in clinical practice as an alternative to serologic meth-

ods. The most common PCR-based HLA typing methods are PCR with sequence-specific primers (PCR-SSP) [1-3] and sequence-specific oligonucleotide hybridization (PCR-SSO) [4]. Although both methods have been very effective in routine laboratory practice, post-PCR processing is time-consuming and there is a real risk of post-PCR contamination. On the one hand, PCR-SSP requires many PCR reactions [3] and it is difficult to automate, therefore limiting its output. On the other hand, despite the higher output of PCR-SSO, the processing times are longer and cannot discriminate between motifs occurring on *cis-trans* strands of the DNA template.

Previous studies have shown that real-time PCR (rtPCR)-based HLA typing, also called fluorotyping, does not require post-PCR processing and may be fully automated [5-10]. In previous reports on the application of rtPCR to HLA typing, it was used as an

From the Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD), Serveis Sanitaris de Referència - Centre de Transfusió i Banc de Teixits (SSR-CTBT) (N.C., R.F., A.S., R.C., A.R., R.P.-B., M.J., E.P.), and Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona (R.C., R.P.-B., M.J.), Barcelona, Spain.

Address reprints to: Eduard Palou, LIRAD, CTBT, Hospitals Vall d'Hebron, Pg de la Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona, Spain; Tel: (34) 932749025; Fax: (34) 932749161; E-mail: epalou@vhebron.net.

This study was supported by a grant from the "Fundació La Marató de TV3" (project number 00/4831); a fellowship from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2002FI00765) (R.F.); and a fellowship from the Spanish Ministry for Science and Technology (SAF200-0050) (R.C.). Based on the results of this work, a patent has been requested (application number: P200400010).

Received April 26, 2004; revised July 29, 2004; accepted August 6, 2004.

Human Immunology 66, 85-91 (2005)
© American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2005
Published by Elsevier Inc.

0198-8859/05/\$-see front matter
doi:10.1016/j.humimm.2004.08.178

TABLE 1 The sequences and position of the 3' end of primers used in this study

Primer	Sequence	Position
E02 ^a	TCCTGTGGCAGCCTAAGAGG	exon 2-126
E04 ^a	ACGTTTCTTGGAGCAGGTAAAC	exon 2-124
E2-100 FW	GCACGTTTCTTGGAGTACTCTACG	exon 2-123
E2-144C RV	TCCGTCCCGTTGAAGAAAT	exon 2-134
E2-201 FW	CGCTTCGACAGCGACGT	exon 2-219
E2-201 RV	CACGTGCGTGTGCGAAGCG	exon 2-201
E2-210 RV	TACTCCCCACGTCGCTG	exon 2-210
E2-322 RV	CYCCGTAGTTGTGTCTGCA	exon 2-322
I1-04 FW	CTTCTGTAACCGGATCGTTCTT	intron 1-475
I1-07 FW	GTCAGTGTTTTTCCCGGAGA	intron 1-450
I1-Com FW	TTCGTGTCCCCACAGCAC	exon 2-103
I2-15RV	CGCGGGCCATGCTCAC	intron 2-1
I2-1Com RV	CGCGCGCGCTCAC	intron 2-1
I2-45 RV	CACACACACACACACTCAGATTC	intron 2-43
I2-RB7 ^b	ACACACACTCAGATTCTCC	intron 2-40
DRB3 102-FW	ACGTTTCT(T/C)G(G/C)AGCTG(C/T)(G/T)TAA	exon 2-102
DRB4 115-FW	CAGGCTAAGTGTGAGTGTCAATTCC	exon 2-115
DRB4 328-RV	CTCTCCACAACCCCGTAGTTGTA	exon 2-328
DRB5 102-FW	A(C/T)GTTTCTTGCAGCAGGATAAGTA	exon 2-102
GAPDH FW	AAGGTGGTGAAGCAGGCGT	exon 8-4476 ^c
GAPDH Intron H	TCTGAGCCAGCCACCAGAG	intron H-4671 ^c

^a Primers described in Olenup et al [2].

^b Primer described in Kotsch et al [12].

^c The positions of GAPDH primers are referred to the accession number J04038 sequence.

equivalent to PCR-SSP with a fluorogenic locus-specific probe, but no attempt has been made to use the potential of this technology to discriminate between the alleles of a given locus.

As a reference HLA-typing laboratory responsible for the typing of many samples, and given the increase in the typing resolution required to improve the clinical results of transplantation (particularly bone marrow), we have been interested in improving typing methods. Ideally, such new typing methods should be faster, provide a higher level of resolution, reduce the risks of contamination, and potentially be automated.

Therefore, the aim of this study was the development of a method for the HLA-DRB loci using real-time fluorotyping with both allele-specific primers and probes. The type of rtPCR chosen (TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) is based on the specific sequence identification of PCR products with labeled probes that are cleaved during successful PCR amplification by the 5'-3' exonuclease activity of Taq DNA polymerase. This results in the uncoupling of the reporter dye from the quencher linked to the probe, and therefore in a detectable emission of fluorescence by the free-reporter dye. While taking advantage of the features of rtPCR, this new method has some useful features of PCR-SSP (*i.e.*, *cis-trans* motif discrimination and easy interpretation) and of PCR-SSO (*i.e.*, use of

specific probes), thus reducing the number of reactions and increasing typing resolution.

MATERIAL AND METHODS

DNA Samples

A total of 100 clinical samples from bone marrow or solid organ transplant patients and healthy donors were selected from our repository of DNA samples to represent common alleles of all serologically defined HLA-DRB specificities in the Spanish population. These samples were used for setting the technique.

Furthermore, 200 clinical samples from bone marrow or solid organ transplant patients and healthy donors were randomly selected to validate the method. Genomic DNA from these samples was obtained by a standard salting-out method [11]. All samples had previously been typed for HLA-DRB using a PCR-based method, such as PCR-SSO, PCR-SSP, or sequence-based typing.

PCR Reaction

A set of 16 PCR reaction tubes was used. A total of 19 primers (14 pairs) and 28 fluorogenic probes were used to identify all HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, and -DRB5 alleles corresponding to serologic specificities HLA-DR1-16 and DR51-53. Two pairs of primers were used per reaction: one pair for the *DRB* genes and the other

TABLE 2 The sequences, fluorogenic labels, melting temperatures (T_m), and position of the fluorogenic probes used in this study (all HLA-DRB probes are located in exon 2)

Probe	Sequence	Label	T_m (°C)	Position
EVH	CACTCATGTTTAACTGCTCCAAGAAACG	FAM	66.3	130-103
WQG	TTACCTGCCCACAGGAAACGTGC	VIC	66	122-100
K-D	AGAAATGACACTCAAACCTTATCCTGCTTCAAGA	FAM	65.8	139-107
EEV	CTCAAACCTTAACTCC	VIC ^a	66.2	129-114
WQLF	ATGACATTCAAACCTTAAAGCTGCCACAAGAAA	FAM	66.2	135-105
EYSTS	TCAGACGTAGAGTACTC	VIC ^a	66.5	128-113
EYSTG	AGAAATAACACTCACCCGTAGAGTACTCCAAGAA	FAM	65.6	138-106
P-R	ACTCCCTCTTAGGCTGCCACAGGA	VIC	65.2	129-107
EQA	CGGCCCGCGCTGCT	FAM	66.6	307-293
KDFL	TGTCCTCCAGGAAGTCCTTCTGGCTG	VIC	66.6	298-273
FDYF	TACTTCCATAACCAAGAGGAG	FAM ^a	66.6	175-195
YFHN	TACTTCCATAACCAAGGAGG	VIC ^a	66.4	175-193
AEH	TGTTCCAGTGCTCCGACAGCAG	FAM	65.6	271-251
RPDE	TCCAGTACTCCTCCTCAGGCCGC	VIC	65.5	271-249
GEFR	CGCCCGGAACTCCCCCA	FAM	66.1	235-218
EQR	CGGCCCGCTCTGCTCC	VIC	66.2	308-291
EDER	CGGCCCGCTCGTCTTCCA	FAM	66.5	307-290
EDKR	CGGCCCGCTTGTCTTC	VIC	65.9	308-292
VAES	TCCAGGACTCGGCGACAGGC	FAM	66.7	271-251
PSAE	TACTCGGCGCTAGGCCGC	VIC	66.4	266-248
RALV	TAGGTGTCCACCAGGGCCCG	FAM	66	320-301
EQK-Q	CGGCCCGCTTCTGCT	VIC	65.5	309-293
VGE	TGAAGCTCTCACCAACCCCGTAGTTG	FAM	66	355-330
VVE	TGAAGCTCTCCACAACCCCGTAGTTG	VIC	66	355-330
KDIL	TCCAGGATGTCTCTC	FAM ^a	66.9	294-279
KDFL	TGTCCTCCAGGAAGTCCTTCTGGCTG	VIC	66.6	298-273
RAAV	AGGTGTCCACCTCGGCCCG	VIC	66.4	319-301
PDAE	TTCAGTACTCAGCGTCAGGCCG	FAM	66.4	272-250
GAPDHex8	CAAGGGCATCCTGGGCTACACTGA	TET	67.1	4490-4513 ^b

^a MGB probe.

^b The position of GAPDH probe is referred to the accession number J04038 sequence.

pair for the *GAPDH* gene to provide an internal positive amplification control. The sequence and location of the primers are listed in Table 1.

Negative control reactions were not included, because for each sample some of the reactions are negative and these negative reactions work as negative controls.

Three probes synthesized with different fluorescent labels were used per tube: two DRB-specific probes labeled in the 5' end with FAM (absorption max = 494 nm, emission max = 518 nm) and VIC (absorption max = 538 nm, emission max = 552 nm) (except for tubes 14 and 16, where only one DRB-specific probe was used), and one GAPDH probe labeled with TET (absorption max = 521 nm, emission max = 538 nm) (all probes were purchased from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequence, location, fluorogenic label, and melting temperatures (T_m 's) of the fluorogenic probes are listed in Table 2. All the primers and all the probes were designed to have a melting temperature of 58°C–60°C and 65°C–67°C, respectively, to ensure that PCR reactions worked under the same conditions. The T_m of the probes was calculated using the Primer

Express Software provided by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Whereas most probes were attached to the TAMRA quencher dye (absorption max = 560 nm, emission max = 582 nm) at the 3' end, other probes used a nonfluorescent quencher (MGB probes, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) so as to use a shorter probe while maintaining the T_m . MGB probes were only designed when the use of TAMRA probes was not suitable.

Each PCR reaction was carried out in a final volume of 20 μ l containing the following components: Buffer A (TaqMan 1000 Rxn Gold / Buffer A Pack, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.46 μ M of AmpliTaq Gold, $MgCl_2$ [see the final concentrations shown in Table 3], 200 μ M of each dNTP, primers, a FAM probe, a VIC probe (Table 3 shows the primer mixes and probes used in each tube and their final concentrations), 25 nM of each GAPDH primer, 75 nM of the GAPDH-TET probe and 50–100 ng of template DNA. Polymerase chain reaction amplifications were carried out in a 7700 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) that detected and recorded in real time the fluorescence emis-

TABLE 3 Primers and probes used in each tube; primers, probes, and magnesium concentrations; and specificities detected by each reaction

Tube	Sense primer	Antisense primer	Probe	nM	Mg ²⁺ mM	HLA-DRB specificity
1	I1-04 FW	E2-144C RV	EVH	150	5	04
	I1-07 FW		WQG	150		07
2	I1-Com FW	E2-210 RV	K-D	250	3	09
			EEV	250		10
3	I1-Com FW	E2-201 RV	WQLF	250	5	01
			EYSTS	250		03, 0820, 1101-04/... , 1301-16/... , 1401-03/...
4	I1-Com FW	E2-201 RV	EYSTG	250	4	0801-19/... , 1105, 12, 1317, 1404/...
			P-R	200		15, 16
5	E02	E2-322 RV	EQA	150	3	15
6	E2-100 FW	E2-201 RV	KDFL	150	3	1504, 1601/02/...
			FDYF	250		0317, 0801-08/... , 1101-08/... , 1303/04/... , 1425/...
7	E2-100 FW	E2-322 RV	YFHN	250	3	0301-16/... , 0809/21, 1109/... , 12, 1301-02/05-06/... , 1401-24/...
			AEH	150		4.5
8	E2-201 FW	I2-45 RV	RPDE	150	3	0308, 11, 1204, 1411
			GEFR	150		0301/04/... , 0817, 1101-16/... , 12, 1301-02/04-06/... , 1417/... , 1501-06/...
9	E2-201 FW	I2-45 RV	EQR	200	3	0101-02/04-05/... , 0403-05/06-0701/08/... , 09, 1126, 1344, 1401/02/04-11/...
			EDER	250		0103, 0402, 1102-03/... , 1301-02/04/... , 1416, 1510
10	E2-201 FW	I2-45 RV	EDKR	250	4	1303/10/...
			VAES	100		0701-05/07, 090102, 1201-03/...
11	E2-201 FW	I2-45 RV	PSAE	250	2	0312, 0405/09-12/... , 0801/03/05-06/... , 1303-04/... , 1413, 1512
			RALV	100		0412/... , 0801-04/06-17/... , 1123/25, 1313/... , 1403/... , 1604
12	E2-201 FW	I2-45 RV	EQK-Q	100	4	0301-10/... , 0422, 1107
			VGE	175		0101/03/... , 0302/... , 0401/05/07-09/... , 07, 0801-03/05/07-09/... , 09, 10, 1101/05/... , 1302-03/05/... , 1402-03/07/... , 1502/... , 16
13	E2-100 FW*	I2-1Com RV*	VVE	175	2	0102/... , 0301/03-04/... , 0402-04/06/10-13/... , 0804/06/... , 1102-04/... , 1201/... , 1301/04/06/... , 1401/04-06/... , 1501/03-07/...
			KDIL	125		0803/10/... , 1102/... , 1203-06/08, 1301-04/06/... , 1416/... , 1501-03/...
14	E02*	I2-15 RV*	KDFL	250	2	0801-02/04-09/... , 1101/03-06/... , 1202, 1305/07/... , 1415/... , 1504
15	E04	I2RB7	RAAV	150	2	0403/06-07/11/...
16	DRB5 102-FW†	E2-322 RV†	PDAE	200	3	DRB5*0101-09, 02
			DRB3	250		DRB3
16	DRB4 115-FW	DRB4 327-RV	PDAE	150	3	DRB4*01, 02

All primers at 0.75 μM except *(1.5 μM) and †(5 μM).

sion during the amplification process. After an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, the samples underwent 40 temperature cycles of a denaturation step at 95°C for 20 seconds and an annealing/extension step at 64°C for 1 minute.

Data Analysis and Interpretation

For HLA-DRB fluorogenic typing, the PCR amplification of one sample was performed with all 16 primers and probes mixes in parallel. The presence of a PCR product was associated with a significant increase in the fluorescence emission of the corresponding reporter dye. The end point detection of fluorescence is sufficient to

get data about the amplification and to discriminate between negative and positive amplifications. In addition, real-time detection of fluorescence (cycle threshold) is useful to identify inespecific amplifications that can occur in the final cycles of the PCR. These inespecific amplifications are discarded for the results interpretation.

To discriminate negative and positive amplifications, each reaction was calibrated in the way that follows: the mean value and the standard deviation of 20 negative reactions for a particular probe were calculated, and a threshold value for each reaction was established using the

TABLE 4 Values of fluorescence threshold for all primers and probes reactions

Tube	Probe	Threshold
1	EVH	0.30
	WQG	0.30
2	K-D	0.20
	EEV	0.20
3	WQLF	0.20
	EYSTS	0.10
4	EYSTG	0.15
	P-R	0.20
5	EQA	0.15
	KDFL	0.15
6	FDYF	0.20
	YFHN	0.20
7	AEH	0.20
	RPDE	0.40
8	GEFR	0.50
	EQR	0.15
9	EDER	0.10
	EDKR	0.15
10	VAES	0.10
	PSAE	0.10
11	RALV	0.45
	EQK-Q	0.45
12	VGE	0.40
	VVE	0.40
13	KDIL	0.20
	KDFL	0.40
14	RAAV	0.60
15	PDAE	0.10
	YFHN	0.10
16	PDAE	0.12

mean value plus 4 standard deviations. For each particular sample, the results obtained in each reaction were considered positive only if they were over the corresponding threshold value. Table 4 shows the values of fluorescence threshold for all primers and probes reactions.

Table 3 shows the list of the HLA-DRB specificities detected by each reaction. The interpretation of the HLA typing results obtained by rtPCR was carried out using a probe hit table with the homozygous hybridization patterns of each HLA-DRB allele (not shown).

RESULTS AND DISCUSSION

One hundred samples representing all serologically defined HLA-DRB specificities in our population were used to develop this new method. Different combinations of primers and probes were tested to achieve the greatest specificity of each reaction. In addition, concentrations of primers, probes, and magnesium chloride were also tested to attain the most efficient reactions.

Despite being designed to work under the same PCR conditions, the fluorescence intensity obtained with the different sets of primers and probes revealed a substantial

variability between reactions, thus indicating a different PCR efficiency for individual primer mixes and probes. To solve this problem, the reactions were calibrated in each case as described in "Data Analysis and Interpretation" in the "Material and Methods" section.

In some specific alleles, the actual results obtained during the implementation of the method did not exactly match the predicted results based on the known sequence. This is because some probes are not able to discriminate some particular polymorphisms. For example, a HLA-DRB1*1401 sample gives a positive result with probe EQR in the context of tube 8 even if there is a mismatch in position 12 of this probe. Table 3 shows both the positive specificities for each reaction based on the tested alleles and the predicted positive specificities (not tested because the samples of these alleles were not available in our laboratory) based on their published sequences and on the results of related alleles.

The results obtained from the 200 samples analyzed to validate the technique were, in all cases, in accordance with the HLA types previously obtained by standard DNA typing methods, such as PCR-SSP, PCR-SSO, or sequence-based typing. Figure 1 shows an example for the HLA-DRB typing of one DNA sample using our new method.

Interestingly, a reduction in the percentage of ambiguous results was observed with our new method compared with standard low-resolution PCR-SSP or PCR-SSO. With the standard low-resolution typing methods, the continuous increase in the number of HLA-DRB1 alleles results in a significant increase in the number of ambiguous results. By including allele-specific primers and probes from our method in the same assay, the percentage of ambiguities significantly decreased. In some cases, intermediate-high resolution typing was achieved. It is the combination of the different reactions that gives the discrimination of the different allelic groups, obtaining the indicated resolution. Table 3 shows that serologic groups may be divided into smaller groups, in some cases close to a high-resolution level.

Compared with all the rtPCR-based approaches described elsewhere [5–10], our typing method has some clear advantages. Postamplification steps are avoided, thus saving work and reducing the risk of contamination; the time required for typing may be shortened to as little as 2.5 hours if the initial steps of reagents and sample loading into reaction trays could be finally automated. The use of allele-specific probes and more than one probe per tube allowed the reduction of the number of PCR tubes, thus further simplifying the PCR typing procedure and resulting in a significant cut in reagents and workload. If the costs of the different typing methods are

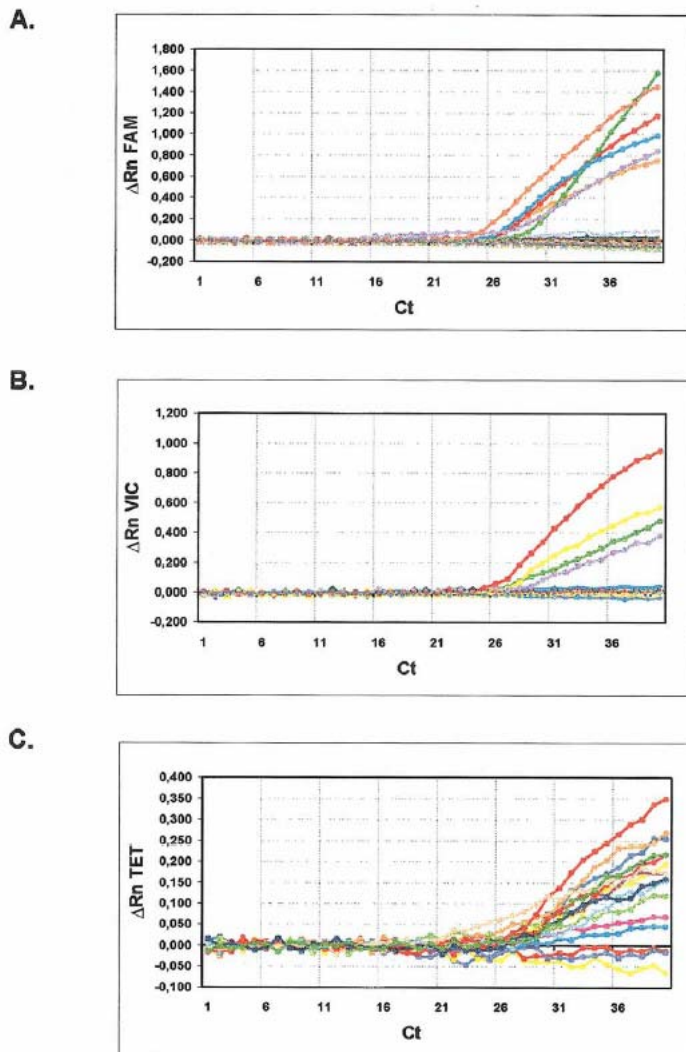


FIGURE 1 Example of HLA-DRB typing results for one DNA sample. (A) Fluorescence amplification plot of FAM probes. (B) Fluorescence amplification plot of VIC probes. (C) Fluorescence amplification plot of TET probes (GAPDH amplification control). The positive probes used with this sample were the following: FAM probes of tubes 5, 6, 8, 12, 13, and 15; VIC probes of tubes 3, 4, 7, 12, 13, and 15. The deduced HLA-DRB typing of this sample was HLA-DRB1*11, 15; DRB3; DRB5.

compared, the final cost of the rtPCR typing technique is in the same range as the other techniques, even though the fluorogenic probes are more expensive than regular reagents.

In conclusion, we have developed a rtPCR method for HLA-DRB typing that solves some of the problems of

standard DNA-based typing methods related to time and a possible automation. In addition, the allele-specific probes used in this method allowed an increase in typing resolution, compared with other rtPCR fluorotyping methods, and a reduction in the number of PCR reactions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Justí Gil, Eva Campos, Pepi Caro, Mar Santos, and Cristina Ambrós for performing the HLA typing of the analyzed samples.

REFERENCES

1. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17:2503, 1989.
2. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39:225, 1992.
3. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI: Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 46:355, 1995.
4. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324:163, 1986.
5. Faas SJ, Menon R, Braun ER, Rudert WA, Trucco M: Sequence-specific priming and exonuclease-released fluorescence detection of HLA-DQB1 alleles. *Tissue Antigens* 48:97, 1996.
6. Luedeck H, Blasczyk R: Fluorotyping of HLA-C: differential detection of amplicons by sequence-specific priming and fluorogenic probing. *Tissue Antigens* 50:627, 1997.
7. Gelsthorpe AR, Wells RS, Lowe AP, Tonks S, Bodmer JG, Bodmer WF: High-throughput class I HLA genotyping using fluorescent resonance energy transfer (FRET) probes and sequence-specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR). *Tissue Antigens* 54:603, 1998.
8. Albis-Camps M, Blasczyk R: Fluorotyping of HLA-DRB by sequence-specific priming and fluorogenic probing. *Tissue Antigens* 53:301, 1999.
9. Li XY, Liu JZ, Gao JZ: Determination of a real-time fluorotyping strategy for the HLA-DR locus. *Transpl Proc* 33:498, 2001.
10. Slateva K, Elsner HA, Albis-Camps M, Blasczyk R: HLA-DRB fluorotyping by dark quenching and automated analysis. *Tissue Antigens* 58:250, 2001.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215, 1988.
12. Kotsch K, Wehling J, Blasczyk R: Sequencing of HLA class II genes based on the conserved diversity of the non coding regions: sequencing based typing of HLA-DRB genes. *Tissue Antigens* 53:486, 1999.

V.IV.1 MATERIAL I MÈTODES TETRÀMERS DRB3

V.IV.1.1 Preparació del DNA genòmic

Per a la identificació d'individus DRB3*0101 i DRB3*0202, s'ha extret gDNA a partir de sang fresca d'individus sans seguint el mètode següent que és una modificació del protocol de "salting out":

a/ Lisi dels eritròcits amb un tampó de lisi (consistent en Sucrosa 0,32 M, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM i Tritó X100 1%) a raó de mateix volum de sang que de tampó de lisi fred (4°C), agitant suaument fins a l'hemòlisi; centrifugar 1 min a 16.100 g, descartant el sobrenedant. En aquest punt es pot congelar el botó cel·lular en N₂ líquid i conservar-lo a -70°C fins a continuar l'obtenció del DNA segons el següent apartat. Per cèl·lules en cultiu o PBMCs òbviament el botó cel·lular s'obté sense el pas de lisi d'eritròcits.

b/ Lisi de les cèl·lules (botó cel·lular obtingut) en solució TEN 8 (0,1M NaCl, 10mM EDTA pH 8,0, 20mM Tris pH 7,5, 0,01% proteïnasa K (w/v)) a raó de 500 µl de solució per cada 10⁷ cèl·lules. S'incuba de 2 a 3 h a 55-60°C fins que el lisat quedi homogeni i es fa una desproteïnitació per extracció amb Acetat Potàssic (KAc 1,5 M) agitant vigorosament durant 15 s. S'hi afegeix un volum equivalent de cloroform-isoamilalcohol (49:1). Es barreja per inversió, es centrifuga (600 g 15 min a 4°C) i es recupera la fase aquosa, on es troba el gDNA.

c/ Precipitació del gDNA amb 2,5 volums d'etanol absolut barrejant per inversió fins que s'observa la malla de DNA que es pot recuperar. Rentar-la amb etanol al 70% fred i recuperar-la per centrifugació (600 g 5 min a 4°C). S'asseca i es ressuspèn amb un volum adequat d'H₂O autoclavada o de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

Les mostres de DNA es conserven a -20°C (se'n separa una petita quantitat per calcular la concentració, puresa i integritat).

V.IV.1.1.1 Càlcul de la concentració i de la puresa i integritat del DNA

La concentració i la puresa de les preparacions es determina per espectrofotometria amb lectura a 230nm, 260nm, 280nm i 320nm d'una dilució del DNA total obtingut. La concentració (en µg/µl) es calcula amb la fórmula: $(A_{260} \times 0,064 - A_{280} \times 0,031) \times$ factor de dilució. El quocient A₂₃₀/A₂₆₀ s'utilitza com a índex de lectura de sals i es considera correcte quan està entre 0,4 i 0,6. La relació A₂₆₀/A₂₈₀ igual a 1,8 o superior es fa servir com indicador de la puresa adequada i la lectura a A₃₂₀ com a presència

d'anells aromàtics que interfereixen la lectura a 260nm. La integritat del DNA es comprova mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 0,8% i es considera no degradat quan la banda és de pes molecular alt i no s'observa bandejat tènue de fons i de pes molecular inferior o la imatge en escala típica de les cèl·lules en apoptosi.

V.IV.1.2 PCR específica per a la identificació d'individus DRB3 positius:

La identificació d'individus DRB3 positius s'ha fet mitjançant la utilització d'una PCR-SSP específica per a DRB3, descrita per Olerup [Olerup, et al., 1992] que es coamplifica amb el gen del alfa polipèptid de la glicoproteïna 1b plaquetar (HPA-2). La reacció de PCR es va fer en un volum final de 20 µl, amb la següent composició de la mescla de reacció: una concentració de 1 µM de la barreja dels encebadors sentit per DRB3 (E-52.1 i E-52.2) (Sigma genosys, London, UK), 1 µM de la barreja dels encebadors antisentit per DRB3 (D-13 i D14), 0,2 µM de cadascun dels encebadors del gen control de presència de DNA HPA-2d i HPA-2E, 1,5 mM de MgCl₂, 0,05 mM de cada dNTP (Ecogen, Barcelona, Espanya), 1x de tampó de reacció (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl i 0,1% Triton® X-100) i 0,5 unitats de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, USA), amb l'addició de 100 ng de la mostra de DNA a testar. Les condicions de ciclat van ser les següents (en un termociclador Perking Elmer 2400): una desnaturalització inicial de 95°C 3 min seguida de 10 cicles consistents en 94°C 10s i 66°C 60s, seguits de 20 cicles consistents en 94°C 10s, 61°C 50s, 72°C 30s.

Encebador	Seqüència
HPA 2-d:	5' CAGCATGTGCTCCTGCAGCCAGCG 3'
HPA 2-e:	5' CTTGCTGCTCCTGCTGCCAAGCC 3'
E-52.1:	5' TTTCTTGGAGCTGCGTAAGTC 3'
E-52.2:	5' GTTTCTTGGSGCTGCTTAAGTC 3'
D-13:	5'CTGTTCCAGGACTCGGCGA 3'
D-14 :	5' GCTGTTCCAGTACTCGGCAT 3'

Taula 3. Encebadors utilitzats per a la detecció de la presència del locus DRB3 per PCR-SSP.

V.IV.1.2.1 Electroforesi

El producte de PCR, al qual s'afegeixen la quantitat necessària de tampó de blau de bromofenol 5x (10% Ficoll, 0,5% blau de bromofenol i 5M EDTA), es resol en un gel d'agarosa al 2% (% en funció de la mida de l'amplímer) en tampó TBE 0,5x tenyit amb bromur d'etidi (0,4 mg/ml) i s'analitza en un transil·luminador de llum ultraviolada.

V.IV.1.3 Tipificació d'alta resolució dels individus DRB3 positius:

Per a la tipificació d'alta resolució dels individus DRB3 positius s'utilitza el kit de tipificació d'alta resolució Dynal AllSet+Tm SSP DRB3, (Dynal Biotech Ltd®, Bromborough, UK), que ens permet identificar els individus DRB3*0101 i també individus DRB3*0202.

V.IV.1.4 Aïllament de PBMCs dels individus de tipificació DRB3*0101 i DRB3*0202

A partir de 20ml de sang perifèrica recollida en tub estèril amb heparina sòdica, es prepara una dilució amb un volum igual de sèrum fisiològic o PBS autoclavat i se separen els limfòcits per gradient de Lymphoprep (Axis-Shield, Norway) centrifugant 30 min a 600 g a T.A. Les cèl·lules recuperades de la interfase es renten dos cops per centrifugació amb medi RPMI complet i es criopreserven en vapors de N₂ líquid amb una solució de SFB i 10% DMSO fins que s'utilitzen. També es fan botons secs de cèl·lules que es congelen directament en N₂ líquid i que s'utilitzen per a l'extracció de RNA total.

V.IV.1.5 Obtenció de RNA total i retrotranscripció

Els RNAs totals s'han obtingut a partir de diferents botons de PBMCs congelats en N₂ líquid, a partir dels quals s'ha seguit un procediment per a la purificació de l'RNA total basat en el mètode de Chomczynsky [Chomczynski, et al., 1987] lleugerament modificat en el nostre laboratori, consistent en:

a) Els botons cel·lulars congelats (de 10⁵ a 10⁶ cèl·lules sense descongelar) es ressuspenen amb una barreja 1:1 de solució desnaturalitzant (isotiocianat de guanidina 4M, acetat sòdic 50mM pH 4, 0,5% N-lauril sarcosina sòdica i 4% de 2β-mercaptoetanol 100mM) i fenol àcid (Sigma®) saturat amb aigua (o citrat) a una relació aproximada de 2 ml de solució per 10⁷ cèl·lules.

- b) S'homogenitzen amb pipeta i es deixen 5 min en gel per dissociar els complexos nucleoprotèics.
- c) S'hi afegeixen 0,2 volums de cloroform-isoamilalcohol (49:1) i es barreja per inversió durant 30 seg.
- d) S'incuba 15 min en gel i tot seguit es centrifuga (10.000g 30min a 4°C) i es recupera la fase aquosa on es troba l'RNA. Aquest es precipita amb 1 volum d'isopropanol durant 4 h a -20°C (o alternativament durant 1 hora a -70°C) i s'obté l'RNA centrifugant de nou a 10.000g a 4°C durant 30 min.
- e) El botó d'RNA es renta tres vegades amb etanol 70% fred, s'asseca i es ressuspèn amb un volum adequat d'H₂O tractada durant una nit amb dietilpirocarbonat al 0,1% (Sigma®) a 37°C i autoclavada posteriorment.
- f) Si es volen conservar les mostres d'RNA es poden congelar a -70°C. Quan la quantitat inicial de cèl·lules per l'extracció no supera 10⁶ cèl·lules, en la precipitació s'afegeixen 0,4 µmol/L de glicogen (Roche®).

V.IV.1.5.1 Càlcul de la concentració i de la puresa i integritat de l'RNA

Similarment a l'estudi de la concentració del DNA, la concentració i la puresa de les preparacions de DNA es determinen per espectrofotometria amb lectura a 230 nm, 260 nm, 280 nm i 320 nm d'una dilució de l'RNA obtingut. La concentració (en µg/µl) es calcula amb la fórmula: $(A_{260} \times 0,045 - A_{280} \times 0,031) \times \text{factor de dilució}$. El quocient A_{230}/A_{260} s'utilitza com a índex de lectura de sals i es considera correcte quan està entre 0,4 i 0,6. La relació $A_{260}/A_{280} = 2$ o superior es fa servir com a indicador de la puresa i la lectura a A_{320} com a presència d'anells aromàtics que interfereixen la lectura a 260nm.

V.IV.1.5.2 Retrotranscripció

Després de desnaturalitzar d'1 a 5 µg d'RNA total i 5 µM d'oligo-d(T)18 (Invitrogen®) a 68°C durant 5-8 min, s'afegeixen 20 U RNAsin (Promega), 1 mM de cada dNTP (Ecogen®), 100 U/ml transcriptasa reversa MMLV i tampó 1x (10 mM Tris-HCl pH 8,8, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, Tritó X-100 0,1%; Promega®) en un volum final de 20 µl durant 1 hora a 42°C. La reacció s'atura elevant la temperatura durant 3 min a 95°C. El

producte final de la retrotranscripció s'ha diluït de 10 a 100 vegades en H₂O i s'ha conservat congelat.

V.IV.1.6 PCR genèrica dels loci DRB

Per a l'obtenció de l'amplificat de tota la cadena β des de l'exó 1 fins a la regió transmembrana (exó 5), s'utilitzen encebadors genèrics per a tots els al·lels DRB1, però que ahora amplifiquen tots els al·lels del locus DRB3, i també dels loci DRB4 i DRB5. La reacció d'amplificació es fa amb els encebadors DRB_sense i DRB_antisense, veure taula (4). Aquests encebadors contenen dianes de restricció: l'encebador sentit conté una diana per EcoR1 i l'antisentit per BamH1. La reacció d'amplificació es fa en un volum final de 10 μ l i la composició de la mescla de reacció és la següent: 0,5 μ M de cada encebador, 1,5 mM de MgCl₂, 0,05 mM de cada dNTP (Ecogen®), 1x de tampó de reacció (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl i 0,1% Triton® X-100) i 0,5 unitats de Taq DNA polimerasa (Promega®, Madison, USA). S'afegeixen 2 μ l d'una dilució 1:10 o 1:100 de mostra retrotranscrita. El programa de ciclat és el següent (en un termociclador Icycler; Biorad®): una desnaturalització inicial de 95°C 3 min seguida de 35 cicles consistents en 94°C 30 s, 70°C 30 s 72°C 30 s, seguits d'una extensió final de 5 min a 72°C. La mida del producte específic és de 750 pb.

Encebador	Seqüència
DRB_sense	5' AGTCATGAATTCATGGTGTGTCTGAAGCTCCCT 3'
DRB_antisense	5' AGTCATGGATCCGCGCGGAACCAGGTCTGCTGAC GACTTGCTCTGTGCAGATTC 3'

Taula 4. Encebadors utilitzats per a l'amplificació dels loci DR.

V.IV.1.6.1 Electroforesi

El producte de PCR, al qual s'afegeixen la quantitat necessària de tampó de blau de bromofenol 5x (10% Ficoll 400, 0,5% blau de bromofenol i 5M EDTA), es resol en un gel d'agarosa al 2% (variable entre 1,5 i 3,5% en funció de la mida de l'amplímer esperat) en tampó TBE 0,5x tenyit amb bromur d'etidi (0,4 mg/ml) i s'analitza en un transil·luminador de llum ultraviolada.

V.IV.1.7 Clonació i transformació

a/Clonació: El producte de la PCR genèrica pels loci DRB es clona directament en un vector pCR®4-TOPO® (la clonació es fa gràcies a les adenines terminals que afegeix la Taq polimerasa en la reacció d'amplificació). S'utilitza el TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen®): es barregen 4 µl de d'amplímer de DRB amb 1 µl de solució salina (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) i 1 µl de vector pCR®4-TOPO® que ja conté la topoisomerasa (enzim que realitzarà la lligació) covalentment unida. S'incuba 30 min a temperatura ambient i es procedeix a la transformació bacteriana.

b/ Transformació: S'utilitzen 2 µl de la reacció de lligació per transformar 12,5 µl de cèl·lules E. coli competents TOP 10' (Invitrogen) incubant la mescla 30 min en gel i fent un shock tèrmic de 30 s a 42°C. Immediatament, les cèl·lules es refreden a 4°C, es ressuspenen en 250 µl de medi SOC (2% triptona/0,5% extracte de llevat/10mM NaCl/2,5mM KCl/10mM MgCl₂/10mM MgSO₄/20mM glucosa) prèviament atemperat i es mantenen en agitació a 200 rpm a 37°C durant una hora. Els bacteris transformats es plaquegen en plaques que contenen 40 µg/ml de kanamicina i s'incuben invertides durant tota la nit a 37°C.

V.IV.1.7.1 Cribatge de les colònies

De cada placa s'obté material de 40 colònies, que es ressuspenen en 50 µl de PBS 0,5 x i dels que s'utilitzen 4 µl per una PCR de comprovació en les mateixes condicions que les esmentades a l'apartat (V.IV.1.6) però amb un volum final de 20 µl de reacció. L'amplificació es comprova en una electroforesi com les descrites als corresponents apartats amb la meitat del producte d'amplificació.

A partir de les colònies positives s'utilitza una mescla d'enzims de restricció per a poder discriminar les que contenen les seqüències del loci DRB3 de les que contenen amplímer provinent de DRB1, DRB4 o DRB5 segons la tipificació de l'individu de partida:

- En el cas de DRB3*0101, les colònies es digereixen amb l'enzim Kpn I que només digereix els al·lels que en la posició 153 de l'exó 2 contenen la seqüència AC (DRB1*03, DRB1*1327/41/71 i DRB3*01). La reacció de digestió amb Kpn I es fa en un volum final de 15 µl, i conté 10 µl d'amplímer de la PCR de la colònia, 1 % de BSA, 5 unitats de Kpn I (Boehringer-Mannheim) i 1x de tampó de reacció L (Boehringer-Mannheim®). La reacció s'incuba una hora i mitja a

37°C i posteriorment es comprova mitjançant electroforesi tal i com s'ha descrit en apartats anteriors.

- En el cas de DRB3*0202, partiem d'un individu de tipificació DRB1*0101/1101, DRB3*0202, i la selecció de les colònies DRB3*0202 es fa en aquest cas per la seva no-digestió amb els enzims Nsi I (que en el context de la tipificació de l'individu digereix només DRB1*0101) i Sca I (que només digereix dos cops DRB1*1101 i un cop DRB3*0202). Es fa una PCR per DRB a partir de les colònies tal i com s'ha descrit anteriorment, s'utilitza en aquest cas 5 µl d'amplímer per a l'electroforesi. Seguidament es fa una digestió amb l'enzim Nsi I (New England Biolabs®) en un volum final de 10µl, que contenen 7µl d'amplímer de la PCR de la colònia, 5 unitats de Nsi I i 1x de tampó de reacció U (New England Biolabs®). La reacció s'incuba una hora i mitja a 37°C i posteriorment es comprova mitjançant electroforesi tal i com s'ha descrit en apartats anteriors. La digestió amb Sca I (Gibco BRL®) es fa en un volum final de 10 µl, que contenen 7 µl d'amplímer de la PCR de la colònia, 5 unitats de Sca I i 1x de tampó de reacció 6 (Gibco BRL®). La reacció s'incuba una hora i mitja a 37°C i posteriorment es comprova mitjançant electroforesi tal i com s'ha descrit en apartats anteriors però amb gel d'agarosa al 3%.

V.IV.1.7.2 *Creixement de les colònies i extracció del DNA plasmídic*

Deu de les colònies seleccionades per DRB3*0101 i DRB3*0202, es cultiven en 7ml de LB + kanamicina (40 µg/ml) durant la nit a 37°C i a 225 rpm. Es fan dos cultius glicerinatats de cada colònia amb 800µl del cultiu i 200 µl de glicerina 87% (Panreac) i es congelen a -70°C. Amb el cultiu restant de la colònia es procedeix a l'extracció del DNA plasmídic mitjançant la utilització del kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega®).

V.IV.1.7.3 *Quantificació del DNA plasmídic*

La quantificació del DNA plasmídic extret s'ha fet en gel d'agarosa per dilució seriada de l'amplímer i comparació del senyal de les bandes de l'amplímer amb el senyal de les bandes de concentració coneguda de mida similar dels marcadors de pes molecular φλ-Hind III (Biotools®, Madrid, Espanya).

V.IV.1.7.4 Seqüenciació de l'amplímer

S'han seqüenciat 5 colònies positives per a cada al·lel; el procés de seqüenciació s'ha fet seguint el mètode de BigDye terminator (PE Applied Biosystems®). Consisteix en la incorporació de dinucleòtids finalitzadors conjugats amb diversos fluorocroms. Així, 200-500 ng de DNA plasmídic, s'han sotmès a una PCR en un volum final de 10 µl que conté 4 µl de Terminator Ready Reaction Mix (TRRM®, AmpliTaq DNA polimerasa + dinucleòsids + 'dye terminators' + tampó x 1) i 1 µM de l'encebador (M13F o M13 R que es troben en el vector pCR®4-TOPO®). La reacció se sotmet a 94°C 3 min i 28 cicles de: 10 s a 96°C, 10 s a 55°C i 4 min a 60°C. El producte de l'amplificació es precipita amb 0,1 vol de KAc 3M pH. 5,5, 10µg de glicogen i 2,5 volums d'etanol absolut. S'incuba 10 min en gel i se centrifuga 30 min a 10.000 g. El precipitat es renta amb etanol al 75% i es ressuspen en 20 µl de formamida HiDi (PE Applied Biosystems®). Es desnaturalitza per incubació 4 min a 95°C i s'analitza en un seqüenciador automàtic de sistema capil·lar (ABI PRISM™ 3100, Applied Biosystems®).

V.IV.1.7.5 Anàlisi de la seqüència de l'amplímer

Les seqüències s'han analitzat utilitzant el software Match Tools Navigator PPC (PE Applied Biosystems®).

V.IV.1.8 Subclonació dels fragments de les cadenes DRB3*0101 i DRB3*0202 dins del vector pRmHa-3:

Dues colònies amb la seqüència correcta per DRB3*0101 i DRB3*0202 s'han digerit amb els enzims Eco RI i Bam HI (Fermentas); la digestió s'ha fet en un volum final de 20 µl, que contenen 2,5 µg de DNA plasmídic, 5 unitats d'Eco RI, 5 unitats de Bam HI, i 1x de tampó de reacció Y + Tango (Fermentas®). La reacció s'incuba 90 min a 37°C i posteriorment s'ha comprovat la digestió total de l'insert amb un gel al 2% d'agarosa de baix punt de fusió (*low melting agarose*). La banda de 740 pb corresponent al DRB3 s'ha tallat i eluit del gel amb columnes GFX (Amersham®) i la quantificació del material recuperat s'ha fet en gel al 2% d'agarosa amb dilucions successives de l'insert per comparació amb dilucions successives del marcador de pes molecular (tal i com s'ha descrit en seccions anteriors).

El plasmidi pRmHa-3 per a la cadena β de les molècules de classe II del que disposem conté el DPB1*0404 (cedit per el Dr. WW Kwok). Aquest al·lel de DP està flanquejat per les seqüències específiques dels enzims de restricció EcoRI i BamHI. Aquest plasmidi

s'ha digerit amb ambdós enzims per tal de treure l'insert, la digestió s'ha fet en un volum final de 20 µl, que contenen 5 µg de DNA plasmídic, 5 unitats de Eco RI, 5 unitats de Bam HI, i 1x de tampó de reacció Y+ Tango (Fermentas). La reacció s'incuba una hora i mitja a 37°C i posteriorment s'ha comprovat la digestió total de l'insert al 1% d'agarosa de baix punt de fusió (*low melting agarose*). La banda de 3.850 pb corresponent al plasmidi s'ha tallat i eluit del gel amb columnes GFX (Amersham) i la quantificació del material recuperat s'ha fet en un gel al 1% d'agarosa.

V.IV.1.8.1 Reacció de lligació

La reacció de lligació ha consistit en la incubació durant tota la nit a 16°C de: 100ng totals de DNA, dels quals en una relació 1 a 3 estaven composts per 65ng de pRmHa-3 amb 35 ng d'insert en presència de 400 U de T4 DNA lligasa (New England Biolabs®), tampó 1x (Tris-HCl 50mM pH 7,8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 50mg/ml BSA) en H₂O en un volum total de 10µl. En el control d'autolligació s'han mantingut les condicions omitint l'insert. La transformació del producte de lligació s'ha fet tal i com descrit en apartats anteriors.

V.IV.1.8.2 Creixement de les colònies i extracció del DNA plasmídic

Les colònies que han estat seleccionades per DRB3*0101 i DRB3*0202, es cultiven en 7 ml de LB + ampicilina (90 µg/ml) durant la nit a 37°C i a 225 rpm. Es fan dos cultius glicerinat de cada colònia amb 800 µl del cultiu i 200 µl de glicerina 87% (Panreac) i es congelen a -70°C. Amb el cultiu restant de la colònia es procedeix a l'extracció del DNA plasmídic mitjançant la utilització del kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega®).

V.IV.1.8.3 Quantificació del DNA plasmídic

Procediment idèntic al descrit a l'apartat V.IV 1.7.3

V.IV.1.8.4 Seqüenciació de l'amplímer

Procediment idèntic al descrit a l'apartat V.IV.1.7.4 amb excepció dels encebadors emprats (veure taula 5).

Encebadors seqüenciació	Seqüència
AS_dins DR:	5' CCTGGTTATGGAAGTATCTGTC 3'
Post_DR_as:	5' ATGTGAGTGTGCATCGAATAG 3'
Prin_DR_s:	5' CTCCIGGTCTGCTCTGTGA 3'

Taula 5. Encebadors utilitzats per la seqüenciació dels plasmidis.

V.IV.1.8.5 Anàlisi de la seqüència de l'amplímer

Com en l'apartat V.IV.1.7.5 les seqüències s'han analitzat utilitzant el software MT Navigator PPC (PE Applied Biosystems).

V.IV.1.9 Maxipreparació plasmídica i purificació amb clorur de cesi

Una colònia amb la seqüència correcta per DRB3*0101, DRB3*0202, alhora que una colònia transformada amb cadascun d'aquests plasmidis DRA*0101, pHs-Neo, pRmHa3-BirA, pMT-Calreticulin, pCoBlast (els 5 últims cedits per el Dr. Kwok) van ser seleccionades per a fer una maxipreparació plasmídica. Es fa un primer cultiu de 5 ml de LB + ampicilina (90 µg/ml) durant el dia a 37°C i a 225 rpm, posteriorment es dilueixen aquests 5 ml en 500 ml de LB + kanamicina (40 µg/ml) i es cultiven tota la nit a 37°C i a 225 rpm. L'extracció del plasmidi es fa pel protocol de lisi alcalina que consisteix en:

- Peletejar les colònies un cop crescudes per centrifugació (10 min a 3.000 rpm).
- Ressuspendre-les en 10 ml d'una solució I freda (4°C) composta per (50mM glucosa 10 mM EDTA, 25 mM Tris.HCl pH 8 amb una punta de lisozim).
- Incubar 5 s a temperatura ambient i després afegir 20 ml de solució de lisi (0,2 M NaOH, 1% SDS) i invertir suaument varis cops.
- Deixar lisar en gel 5 min i després afegir 15 ml de solució de neutralització (3 M Acetat Sòdic pH 4,8) i barrejar vigorosament sense vortejar.
- Centrifugar a 3.000 rpm durant 10 min, els 40 ml de sobrenendament es recuperen i divideixen en dos tubs falcon de 50 ml, en ells s'hi afegeix 25 ml d'isopropanol fred, per què precipitin els àcids nuclèics.
- Es barreja vigorosament i centrifuga a la mateixa velocitat 10 min més.

- Es decanta el sobrenedant i es recupera el DNA precipitat ressuspenent-lo amb 2 ml de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 0,1mM pH 8,0), posteriorment s'afegeixen 2,5 ml de 5 M LiCl (guardat a -20°C) i s'incuba 5 min a 4°C.
- Es centrifuga per precipitar el RNA, i llavors es recupera el sobrenedant i transvasa a un tub nou al qual s'hi afegeixen 2,5 volums d'etanol 95% fred, s'agita i centrifuga per precipitar el DNA plasmídic.
- Es decanta el sobrenedant i el pellet s'asseca; llavors el DNA es resuspèn en 4,2 ml de TE + 30 µl de EtBr (50 µg/ml) + 4,2 gr de CsCl.
- Amb aquest volum de DNA plasmídic en solució s'omplen els tubs de plàstic de polial·lomer (Optiseal, beckman) per al rotor d'ultracentrifuga VTiG.5.2 i es centrifuga a 55.000 rpm (18°C i deceleració 9) durant 16 h.
- Després es punxa i es recupera la banda de DNA plasmídic.
- La solució obtinguda es neteja de BrEt mitjançant la combinació amb el mateix volum de butanol saturat amb aigua: agitar i centrifugar 1 min a 3000 rpm, eliminar la fase superior (repetir-ho 3 cops).
- Després es dilueix la fase inferior amb tres volums més d'aigua i es precipita amb 2 volums d'etanol absolut gràcies a la incubació 15 min a 4°C i la posterior centrifugació a 5000 rpm 4°C durant 15 min.
- El pellet (que no és visible en molts casos de pur que està) es renta amb etanol 70% i es dissol en 250 µl de TE. Se n'agafa una alíquota per a la seva quantificació per gel i la resta es congela a -20°C.

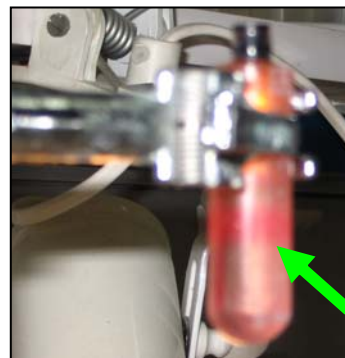
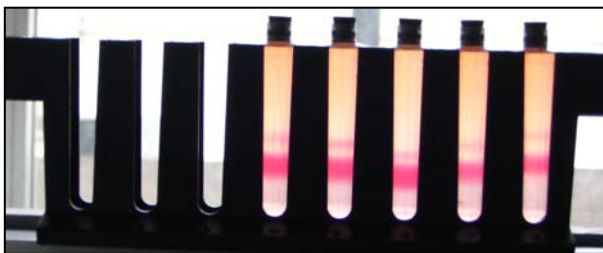


Figura 25. Exemple de bandes de DNA plasmídic que s'obté quan es fa el clorur de cesi, la de dalt es correspon a DNA que té algun tall, la de baix és la que s'ha de recuperar (indicat amb una fletxa verda a la segona foto).

V.IV.1.10 Transfecció estable de les cèl·lules S2

Les cèl·lules S2 de *Drosophila melanogaster*, es creixen en medi Schneider's *Drosophila* medium (Biological Industries®), amb el 10% de SFB (Gibco®), estreptomicina 0,1 mg/ml (CEPA®, Espanya) i penicil·lina 100 U/ml (Laboratorios Normon®, Espanya), a una densitat de $1-2 \times 10^6$ cels/ml i a una temperatura de 26°C, sense CO₂:

- Es sembren en una placa de 12 pous 2×10^6 cels en 2 ml de medi, i es deixen reposar a l'estufa per a que es dipositin al fons (un mínim de 4 h o millor tota la nit).
- Després es prepara la següent barreja en un tub de 1,5 ml: 0,4 µg de pRmHa3-DRα + 0,4 µg de pRmHa3-DRB3*0101 (o *0202) + 0,4 µg de pRmHa3-BirA + 0,4 µg de pMT-Calreticulin + 0,4 µg de pCoBlast.
- Es fa un pou control, que conté la barreja 0,4 µg de pRmHa3-DRα + 0,4 µg de pRmHa3-DRB3*0101 (o *0202) + 0,4 µg de pRmHa3-BirA + 0,4 µg de pMT-Calreticulin i és per demostrar que les cèl·lules no transfectades amb la resistència moren.
- A les barreges de plasmidis s'hi afegeixen 250 µl de medi Schneider's sense sèrum i es deixen a part.
- En un tub nou de 1,5 ml s'hi posen uns altres 250 µl de medi Schneider's sense sèrum i s'hi afegeixen 8 µl de CellFectin (Gibco®). Aquesta barreja s'afegeix gota a gota i barrejant amb el dit al tub amb la barreja de plasmidis; llavors es deixa reposar 3 h a T.A.
- Deu min abans de les 3 h, es renten les cèl·lules amb 2 ml de medi de *Drosophila* sense sèrum i després es treu el medi completament.
- Posteriorment a la barreja de DNA i CellFectina s'hi afegeixen 800 µl de medi de *Drosophila* sense sèrum i es posa gota a gota sobre les cèl·lules.
- Es deixen 3-4 h les cèl·lules a l'estufa i després es treu la mescla de transfecció i es posen 2 ml de medi Schneider's complet.
- A les 48 h s'afegeix al medi 25 µg/ml de Blastocidina.
- Cada 4-5 dies es canvia el medi, ara sempre amb 25 µg/ml de Blastocidina.
- Les cèl·lules es van contant i expandint en funció del seu creixement mai diluint-les a menys de 1×10^6 cèl·lules/ml (al pou control negatiu de transfecció les cèl·lules han de morir als 7-10 dies).

Aquest protocol es pot fer de manera alternativa utilitzant el plasmídi de resistència a la G418 pHS-Neo, i llavors la selecció de les cèl·lules es fa amb 2 mg/ml de G418 (Gibco®).

V.IV.1.11 Expansió de les cèl·lules S2 transfectants i inducció de producció de monòmer

A les dues setmanes de cultiu les cèl·lules transfectades estan preparades per passar-les a flascons de 25 cm³ i les cèl·lules control s'han mort. Llavors s'agafen 2ml del cultiu, es sembren en una placa de 12 pous, s'indueixen amb 20 µl de CuSO₄ 100 mM i 20 µl de Biotina 100 mM (saturada), i es deixen créixer 5 dies. Mentrestant el resta de *bulk* es continua expandint i congelant.

V.IV.1.12 Western o dot blot per avaluar la producció de monòmer en les cèl·lules S2.

Per determinar la presència de monòmer soluble al sobrenedant de les cèl·lules induïdes es pot fer per dos mètodes:

1/ Western revelat amb streptavidina -HRP

- Es centrifuga el sobrenedant 2 min a 10000 rpm, se n'agafen 60 µl i es combinen amb 20 µl de tampó de carrega per *Western* no desnaturalitzant (Nupage 4, Invitrogen®) i es corren en un gel pre-fet de 12 pous (Nupage 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen®) amb tampó MES (Invitrogen®) durant 40 min a 200 volts, incloent un marcador de pes molecular al gel.
- Es prepara el *sandwich* per a la transferència a una membrana Immobilon-P de porus de 0,45 µm (Millipore®), es transfereix durant 1 h a 350 A de corrent constants.
- Es bloqueja durant una hora amb PBS-tween (1/1000) + 5% de llet en pols.
- S'incuba amb 15 ml de PBS-tween (1/1000) amb una dilució 1/3000 de HRP-Streptavidina (Pierce®) durant 1 h.

2/ Dot-Blot (amb revelat bé amb streptavidina-HRP o L243, anti-HLADR)

- Es monta l'equip de Dot-Blot (Biorad®) amb un parell de papers Watman mullats amb PBS-tween (1/1000) i a sobre una membrana de nitrocel·lulosa Hybond-ECL (Amersham®).
- Es fa un primer buit per a que la membrana quedi ben tensa.

- Es dispensen 100 µl de sobrenedant en cada dot [és poden utilitzar dilucions de monòmer (generalment des de 5 a 100 ng) ja purificat com a control i per obtenir una semiquantificació de la proteïna que hi ha al sobrenedant].
- El sobrenedant es deixa reposar 10 min a sobre la membrana i després s'hi aplica el buit.
- Es desmunta el dot-blot i la membrana es bloqueja 1 h amb PBS-Tween amb 5% de llet en pols.
- S'incuba amb estreptavidina-HRP (1/3000) o l'anticòs anti-DR (L243) diluït en PBS-tween (a una concentració de 4 µg/ml) durant 1 h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C.
- Es fan 3 rentats de 10 min amb PBS-Tween, i en el cas d'emprar un anticòs anti-DR s'incuba amb un anticòs secundari en aquest cas un Goat-anti-mouse-IgG-HRP (Southern Biotechnology®) a una dilució 1/4000 en PBS-tween durant 45 min.
- També només en aquest cas de l'anti-DR es tornen a fer 3 rentats de 10 min amb PBS-tween.
- S'incuba amb un substracte de la peroxidasa com el ECL (Amersham®) o el Supersignal west-pico (Pierce®).
- Es revela per detecció de quimioluminiscència amb una pel·lícula fotogràfica Hyperfilm (Amersham®) amb diferents temps d'exposició.

V.IV.1.13 Clonació de cèl·lules S2 productores de monòmer

Els *bulks* de les transfeccions de cèl·lules S2 testades es clonen per dilució límit. Per a això es recullen les cèl·lules provinents de cada transfecció, i es fa un recompte i un càlcul de la viabilitat cel·lular (dilució a la meitat amb una solució de taronja d'acridina/bromur d'etidi). Les cèl·lules es ressuspenen en medi de cultiu Schneider's complet amb blastocidina (o geneticina 2 mg/ml segons la transfecció) i se sembren en plaques de 96 pous amb fons pla a raó de 10, 3, 1 i 0,3 cèl·lules/pou i es mantenen en cultiu durant 7-10 dies. Es consideren clonals quan, després de cultiu durant 15 dies, el percentatge de pouets amb creixement cel·lular visible en la placa d'1 cèl·lula per pouet no supera el 30% del total de la placa.

V.IV.1.13.1 Cribatge de les clones productores de monòmer

En el cas d'observar creixement en els pous de clonació, quan les cèl·lules ocupen 2/3 del pou es divideixen en un altre pou de 96. Una placa es continua expandint i la placa replicada s'indueix amb CuSO_4 tal i com s'ha descrit anteriorment i es fa l'anàlisi per un dels dos sistemes descrits a l'apartat V.IV.1.12. Les colònies més productores són seleccionades i es creixen per a la producció de monòmer.

V.IV.1.14 Producció de monòmer

V.IV.1.14.1 Expansió de les clones

Les clones productores seleccionades o en el seu defecte el *bulk* de transfecció es creixen sempre en una rang de densitat que va de $1-2 \times 10^6$ fins a $5-6 \times 10^6$ (que és quan s'han de tornar diluir). Se n'ha de créixer 2 l [això es fa en flascons *spinners* (Bellco®) de 1 l en els quals s'hi pot posar com a màxim 500 ml de cultiu de cèl·lules S2. Quan es tenen 4 flascons amb 500 ml de cultiu de S2 a una densitat cel·lular $5-6 \times 10^6$ s'indueix la producció de monòmer amb 5 ml de CuSO_4 100 mM i 5 ml de Biotina 100 mM (saturada) i es deixen 5 dies més dins l'incubador per a que produeixin el monòmer.

V.IV.1.14.2 Elaboració de la columna d'afinitat

Per a l'elaboració d'una columna d'afinitat són necessaris 20 mg d'anticòs anti-DR L243 purificat i dissolt en una solució d'estabilització (0,073 M d'àcid acètic, 0,0165 M d'acetat sòdic i 0,078 M de bicarbonat sòdic) a pH 8,0.

- Es pesen 1,7 gr de sefarosa CnBr activada (Amersham®) i es dissolen en 1 mM HCl fins a tenir un volum de 50 ml.
- Es deixa en agitació suau de 30 a 45 min per a que s'activi la sefarosa.
- Després es barreja invertint un parell de cops i es filtra amb un embut filtrador de porus (de 40 a $60\mu\text{m}$, ja que la sefarosa té un mida mitjana de les partícules de $90\mu\text{m}$), anant en compte de no deixar-ho sec. S'ha d'aturar el buit quan s'arriba als 20 ml i s'ha de barrejar mentre es filtra amb una espàtula.
- Es fan tres rentats per filtració d'aquesta manera amb 1mM de HCl i després del tercer rentat es comença amb el tampó d'assemblatge (*coupling*) (0,1 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl pH 8,5), amb el qual es fan 2 rentats però en el segon s'han de deixar 25 ml.
- Es retira el conjunt de l'embut filtrador i es posa en un tub de 50 ml.

- Es centrifuga 5 min a 500 rpm i després s'aspira el sobrenedant amb compte de no aspirar les boles de sefarosa
- Es barreja el volum d'anticòs amb el mateix volum de tampó d'assemblatge 2x (0,2 M NaHCO₃, 1M NaCl pH 8.5) i es mescla amb les boles de sefarosa [cal recordar que com a màxim es pot acabar amb un volum de 40 ml].
- Es deixa 2 h amb agitació suau a temperatura ambient.
- Passades les dues h s'agafa 1 ml de sobrenedant i es llegeix la seva absorbància a A 280 nm que ha de ser inferior a 0,03; sinó s'ha de deixar més temps unint l'anticòs a les boles de sefarosa.
- Es centrifuga 5 min a 500 rpm i es treu el sobrenedant, s'afegeixen 20 ml de tampó d'assemblatge i es repeteix la centrifugació.
- Es retira el sobrenedant i s'hi afegeix el tampó de bloqueig (1,5 gr de glicina ressuspenda en tampó d'assemblatge) i es deixa dues h amb agitació suau a temperatura ambient.
- Es monten les columnes de vidre (Biorad®).
- Es centrifuga la sefarosa amb anticòs 5 min a temperatura ambient.
- Es ressuspenden amb 5 ml de tampó d'assemblatge i es transvasa a la columna, que s'obre de baix per a que surti degotant el tampó i oberta de dalt.
- Al mateix pot anterior s'hi posen 50 ml de tampó d'assemblatge que es van afegint a mesura que passen per la columna.
- Es fa un rentat amb 50 ml de tampó d'acetat (0,1 M NaOAc, 0,5 M NaCl, pH 4,0) i al final es deixa la columna amb PBS + 0,05% azida sòdica per a la seva conservació a 4°C.

V.IV.1.14.3 Purificació del monòmer

- Passats els cinc dies d'inducció llavors es recull el sobrenedant i centrifuga 15 min a 10.000 rpm a 4°C i es filtra per un porus de 0,22µ (Nalgene)
- Els dos litres de sobrenedant resultants es posen en un erlemeyer i s'hi afegeix el 0,04% de detergent n-Octyl β-D-Glucopyranoside (OG) (Sigma®).
- Es deixa passant el sobrenedant per la columna a una velocitat de 1 gota cada dos s dins la cambra de 4°C.
- Quan ha passat el sobrenedant la columna es renta amb 200 ml de la solució I (PBS + 0,02% OG, pH 7.5), posteriorment es renta amb 50 ml de solució II (PBS + 0,35m NaCl + 0,02% OG, pH 7.5).

- El tercer rentat es fa amb 50 ml de solució III (0,01 M Tris-base, pH 7.5).
- L'elució es fa amb una solució (100 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 11.5) a 4°C.
- Es recullen 10 fraccions de 2 ml d'elució i es tamponen amb 500 µl de 2 M Tris-HCl pH4.0.
- Després de l'elució, la columna es renta amb 100 ml de PBS 0,05% azida sòdica per a la seva conservació a 4°C.

V.IV.1.14.4 Quantificació de l'eluit

L'avaluació de la presència de proteïna a l'eluit es fa mitjançant l'assaig de Bradford utilitzant el reactiu (Bio-Rad protein assay dye reagent®). Es posen 10 µl de cada tub d'eluit en una placa d'ELISA, s'hi afegeixen 200 µl de reactiu de Bradford diluït 1/5 en aigua destil·lada (incloent un pou només amb reactiu) i es llegeix l'absorbància a 570 nm. Es seleccionen només aquelles fraccions amb una densitat òptica superior a 0,1 com a les que contenen proteïna.

V.IV.1.14.5 Concentració de l'eluit

Les fraccions seleccionades s'ajunten en un concentrador Amicon ultra-15 30,000 MWCO, (Millipore) i es centrifugen a 3000 rpm 15 min. Es repeteix la centrifugació fins que només quedin 2-3 ml a la part superior del concentrador. Llavors es quantifica per l'assaig de Bradford, aquest cop però es fa quantitatiu amb l'ús d'una corba de dilucions de BSA des de 0,5mg a 4 mg. El concentrat diluït 1/5 es valora per triplicat, i les centrifugacions es repeteixen fins a obtenir una concentració de monòmer de 2 mg/ml.

V.IV.1.14.6 Diàlisi de l'eluit

- El monòmer eluit de la columna es posa en un cassette de diàlisi (Pierce®) en suspensió amb 4 l de PBS pH 6.0 a 4°C.
- El tampó es canvia cada 12 h i es fa un total de 4 canvis.
- Es treu del cassette de diàlisi i es posa en un o varis tubs de 1,5 ml (en funció del volum).
- Es centrifuga 5 min a 10.000 rpm.
- Es recupera el sobrenadant evitant el precipitat si n'hi ha, i llavors es torna a quantificar per assaig de Bradford.

Un cop quantificat el monòmer es congela a -70°C per a la seva conservació (és recomanable fer-ne alíquotes d'ús de 200 µl - 1 ml per anar-lo utilitzant).

V.IV.1.15 Càrrega del monòmer amb el pèptid

- La càrrega del monòmer amb el pèptid es fa posant el monòmer a una concentració final de 0,5 mg/ml, amb concentració final de tampó fosfat 1x (es pot afegir PBS concentrat x5 pH 5,9 i que conté OG 12,5 mg/ml, perfabloc 5 mg/ml), una concentració de pèptid (o de mescla de pèptids diluïts en DMSO) final de 400µg/ml, i la resta de volum amb aigua fins a 50µl.
- Es deixa a 37°C 3 dies.
- Cada dia es centrifuga per evitar la condensació; el darrer dia es centrifuga 2 min a 14.000 rpm i es canvien de tub només 40 µl evitant agafar el precipitat.
- S'hi afegeixen 10 µl d'estreptavidina-PE (0,25 mg/ml Biosource®).
- S'incuba un mínim de 4 h a 26°C i es guarda a 4°C.

V.IV.1.16 TGEM (*Tetramer guided epitope mapping*): Obtenció i estimulació de limfòcits T CD4+ amb pèptids

- A partir de sang total d'individus tipificats per DRB3, s'obtenen els limfòcits, mitjançant un gradient de ficoll (com s'ha explicat en apartats anteriors). El volum de sang total del que es parteix és variable entre 20 i 100 ml en funció del nombre de cèl·lules que es vulguin obtenir.
- Després es procedeix a la separació dels limfòcits T CD4+, utilitzant un dels 2 mètodes:
 - a/ a través de la utilització de boles magnètiques MACs "CD4+T Cell isolation Kit II human" (Milteny®) i l'equip Automacs. En aquest cas es tracta d'una selecció negativa de les cèl·lules CD4+.
 - b/ per separació cel·lular amb l'equip (Vantatge®), en aquest cas s'han separat les cèl·lules tenyides amb l'anticòs CD4-FITC, i s'han obtingut separades les cèl·lules CD4+High i CD4+Low.
- En el cas d'utilitzar la separació per boles magnètiques, les cèl·lules seleccionades positivament s'utilitzen com a APCs: en una placa de 48 pous s'hi sembren $2,5 \times 10^6$ cèl·lules d'aquestes i es deixen una hora a 37°C en l'incubador per a que s'enganxin els monòcits; després es renta bé un parell de cops amb medi complet per eliminar totes les cèl·lules no adherides.
En cas d'utilitzar monòcits separats per citometria (cèl·lules CD4+low) es reparteixen en funció del nombre de pous que es vulgui i es deixen enganxar a la placa en les mateixes condicions.

- Es sembren 2×10^6 limfòcits T CD4+ i s'afegeixen 10 µg/ml del pèptid que es vol analitzar.
- El dia 7 s'hi afegeix IL-2 recombinant (20UI/ml, Roche, Manenheim, Germany) i es va controlant el cultiu cada 1-2 dies; només si es veuen confluents es divideixen les cèl·lules.
- Els limfòcits T es creixen en medi RPMI amb 10% de sèrum humà AB (millor d'un donant masculí), 0,1 mg/ml (CEPA®, Espanya) i penicil·lina 100 U/ml (Laboratorios Normon®, Espanya) i 2 mM L-Glutamina.
- El sèrum humà pot ser comercial (Biological Industries®) o bé de preparació casolana a partir d'una donació de 500 ml de sang, deixada coagular. El sèrum s'obté per centrifugació a 10,000 rpm 30 min i es descomplementa una hora a 56°C; abans d'utilitzar es filtra amb tot el medi preparat per una membrana de porus de 0,22µm.

V.IV.1.17 Anàlisi per citometria

El dia 14 des de l'inici del cultiu dels limfòcits T CD4+ estimulats es procedeix a la tinció amb els tetràmers carregats amb el pèptid amb que s'han estimulat les cèl·lules:

- S'agafen de cada pou 50 µl de cèl·lules, es posen en un tub de FACs, s'hi afegeix 1 µl de tetràmer (carregat amb pèptid i conjugat amb estreptavidina a 0,5 mg/ml) i s'incuba una hora a 37°C dins l'incubador amb CO₂.
- Es posen en gel els tubs i es procedeix en la tinció de superfície amb CD4-FITC i CD25-PerCP [afegir 5 µl de cada anticòs (Becton®)].
- S'incuba durant 30 min a 4°C i després s'elimina l'excés d'anticòs i les restes cel·lulars afegint 1ml de PBS + 1% SFB i centrifugant 10 min a 300g.
- S'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el botó cel·lular en 300 µl de PBS + 1% SFB i es passa pel citòmetre.

V.IV.1.18 Obtenció de clones de limfòcits T CD4+ específiques per al tetràmer

- Es prepara un tub per a l'anàlisi per citometria tal i com descrit en l'apartat anterior, però amb un mínim de 10^6 cèl·lules, i només tenyit per al tetràmer específic-PE i CD4-FITC.

- Es separen mitjançant un separador cel·lular (Facs Vantatge®) les cèl·lules positives per al tetràmer i CD4, posteriorment es sembren a una dilució d'1 cèl·lula per pou en una placa de 96 pous en fons en U.
- S'hi afegeixen 100.000 PBMCs *feeders* (no han de ser de la mateixa tipificació) per pou irradiats a 60 Gy, i una concentració de PHA (Sigma ®) de 2 µg/ml.
- El dia següent s'hi afegeixen 20 UI/ml de Hu-rIL-2 (Roche ®) i es deixen 7-15 dies a l'incubador.
- Passat aquest temps els pous en que es veuen grumolls de creixement de cèl·lules es divideixen si són molt grans (2/3 placa); sinó es re-estimulen.
- La re-estimulació es fa amb una proporció de 1 part cèl·lules de clones T per cada 4 parts PBMCs *feeders* de la mateixa tipificació, irradiats a 60 Gy, i afegint al cultiu 10 µg de pèptid específic.
- El dia següent de la irradiació s'hi afegeixen 20 UI/ml de Hu-rIL-2.
- En cas d'estimular amb línies limfoblàstiques transformades amb el virus d'Epstein Barr (linia EVB) la proporció de cèl·lules a utilitzar és 1 a 1.
- Les cèl·lules s'han de re-estimular cada 15 dies.

És millor anar fent les 4 primeres estimulacions específiques, i després si no es té cap línia EVB es poden anar alternant les específiques amb les inespecífiques (per exemple amb PHA).

V.IV.1.19 Cribatge de les clones T CD4+ obtingudes

El cribatge de les clones es fa amb la tinció específica amb el tetràmer i CD4-FITC tal i com s'ha descrit en apartats anteriors.

V.IV.1.20 Producció de línies limfoblàstiques transformades amb el virus d'Epstein Barr

Les línies limfoblàstiques s'obtenen transformant PBMCs dels individus amb la tipificació desitjada amb el virus d'Epstein Barr (EBV). El virus s'obté del sobrenedant del cultiu de la línia cel·lular B95.8 (marmoset cell line) crescuda fins a la saturació durant 8-10 dies en medi RPMI complet a 37°C i en atmosfera rica en CO₂ (5%). El sobrenedant del cultiu se centrifuga, es filtra amb un filtre de 0,45 µm de porus i es manté a -70°C o es fa servir directament per la transformació.

Transformació:

- En un tub cònic (per afavorir el màxim contacte cel·lular) en el que hi ha un "pellet" o botó cel·lular d'aproximadament 10^7 PBMCs s'aplica 1ml de l'esmentat sobrenedant.
- S'incuba durant 1 h a 37°C en atmosfera de CO_2 (5%) i sense ressuspendre el pellet s'hi afegien 9 ml de medi RPMI complet suplementat amb 20% FCS i $4\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A purificada.
- Es cultiva durant 3 setmanes canviant el medi cada 7 dies i evitant ressuspendre el botó cel·lular.

La tercera setmana es ressuspèn el pellet i es cultiva en placa de 24 pous per tal d'expandir la línia que, a partir d'aquest moment, es cultiva en medi RPMI complet suplementat amb 10% de SFB.

V.IV.1.21 Assajos de proliferació de limfòcits T CD4 antígen-específics monitoritzats amb CFSE

Per marcar amb CFSE les cèl·lules T CD4+ aïllades s'ha utilitzat el següent protocol:

- Partint de T CD4+ rentades dos cops amb PBS x1, es ressuspenen en 1 ml de PBS (la concentració màxima que hi pot haver es $1,2 \times 10^7$ cels/ml però si es tenen menys cèl·lules es fa amb 1 ml igual).
- S'hi afegeix 1 ml de PBS 1x que conté $0,6 \mu\text{M}$ de CFSE, es barreja suaument i es deixa 10 min a 37°C (en foscor).
- Preparar un tub amb 4 ml de SFB, i un cop acabada la incubació afegir les cèl·lules en aquest tub.
- Deixar reposar 2 min, durant aquest temps el CSFE que no hagi entrat a les cèl·lules s'unirà al SFB, i posteriorment afegir 9 ml de RPMI complet fred, centrifugar a 900 rpm 10 min.
- Rentar 2 o 3 cops les cèl·lules amb RPMI complet en les mateixes condicions, i en l'últim rentat ressuspendre amb medi de limfòcits T (veure apartats anteriors) a la concentració de $2,5 \times 10^6$ cèl·lules/ml.
- Aquestes cèl·lules es sembren en una placa de 48 pous on prèviament s'havia enganxat les cèl·lules presentadores (1 hora a 37°C veure apartat TGEM) i s'estimulen amb el pèptid específic a la concentració de $10 \mu\text{g/ml}$.
- En un dels pous es sembla un control que s'estimula amb PHA $2\mu\text{g/ml}$, que ens servirà per saber el nombre de divisions que han patit les limfòcits T CD4+.

- El dia següent s'ha d'afegir 20UI/ml d'IL-2 al pou control de PHA; en els altres depèn del que es vulgui testar es pot afegir IL-2 o no, tenint en compte que farà proliferar els limfòcits T que vinguessin ja activats de l'individu.
- El pou de PHA s'ha d'anar vigilant i dividint en funció de l'expansió; a dia 7-10 es pot fer la tinció per citometria de flux amb els tetràmers que es vulguin testar, tal i com s'ha descrit anteriorment.

Només cal tenir present que no es pot utilitzar cap anticòs marcat amb FITC, ja que es el canal on es detecta el CFSE.

V.IV.1.22 Anàlisi dels pèptids antigènics trobats i el seu ancoratge en els diferents motius d'unió dels al·lèls de DR

Per a analitzar si una seqüència peptídica compleix el motiu d'unió d'un determinat al·lel d'HLA-DRB s'ha utilitzat la base de dades SYFPEITHI [Rammensee, et al., 1999], que conté tots motius d'unió que s'han definit per als al·lèls de DRB, i és capaç d'avaluar una seqüència peptídica i donar-li una puntuació si un pèptid pot unir-se a un determinat motiu.

V.IV.2 RESULTATS CAPÍTOL IV-ANNEX I

V.IV.2.1 Detecció, amplificació i clonació dels al·lels DRB3*0101 i DRB3*0202

S'ha utilitzat el genòmic de 16 individus sans de tipificació desconeguda per a la identificació d'individus portadors del loci DRB3. En total s'han identificat 7 mostres que presenten el locus DRB3 (figura 26).

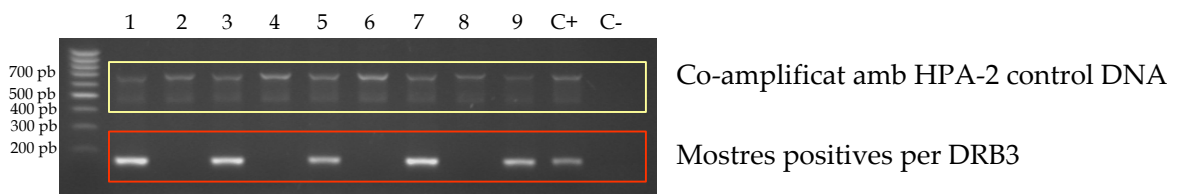


Figura 26. Gel d'agarosa del producte de la PCR utilitzada per la identificació d'individus DRB3+.

Posteriorment en aquestes mostres positives s'ha fet la tipificació d'alta resolució per al loci DRB3, i hem vist que dels 7 individus, 4 són DRB3*0101 i 3 són DRB3*0202 (figura 27). Cal dir que els dos al·lels de DRB3 que hem identificat són els més comuns en la població caucàsica.

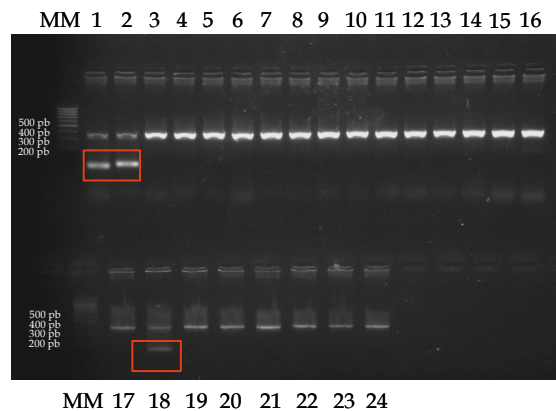


Figura 27. Gel d'agarosa de la tipificació d'alta resolució per PCR-SSP de DRB3 utilitzada en les mostres positives per la presència del locus, en aquest cas la mostra és DRB3*0101.

A partir de sang total d'un parell d'individus de cada tipificació s'han aïllat PBMCs i extret RNA total, que s'ha retrotranscrit (figura 28) i utilitzat per l'amplificació i clonació dels exons 1 al 5 dels loci DRB (tal i com s'ha descrit al material i mètodes).

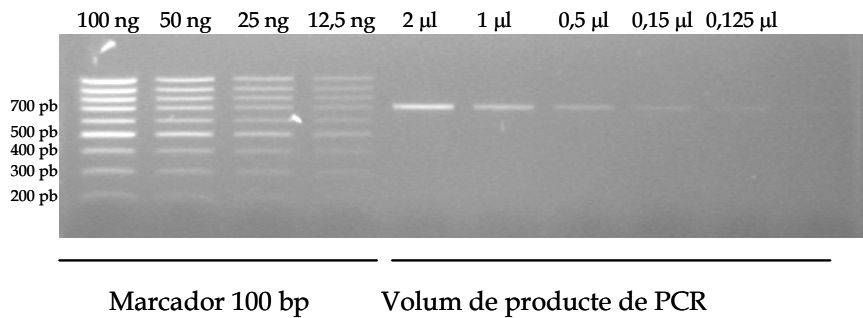


Figura 28. Gel de la quantificació del producte de PCR dels loci DRB, feta amb a partir del cDNA dels individus DRB3*0101 i DRB3*0202 seleccionats.

Posteriorment els exons 1 a 5 de DRB3*0101 i DRB3*0202 clonats dins el vector pCR®4-TOPO®, s'han subclonat a dintre del vector pRmHa-3. Aquest vector, ja conté el promotor induïble per ions de coure, sota el qual es troben les cadenes α i β . A més a més, en localització posterior al lloc on acaba la seqüència codificant de les cadenes α o β , hi ha la seqüència per a les cremalleres de leucines. En aquest cas és complementària la de la cadena α i la de la β per a que es puguin estabilitzar formant la cremallera. La zona de biotinització només es troba en el vector de la cadena β , i està en una localització posterior a la seqüència codificant de la cadena de leucines separada d'ella per un segment de DNA espaiador.

V.IV.2.2 Producció de Tetràmers de DRB3 en cèl·lules de *Drosophila melanogaster* S2

Dos plasmidis pRmHA-3 codificants un per la cadena α de DR i l'altre per la cadena β de DRB3 (*0101 o *0202) s'han transfectat en les cèl·lules de *Drosophila* S2 per a l'obtenció de tetràmers de DRB3, seguint la metodologia descrita per Novak et al [Novak, et al., 1999]. En el cas la co-transfecció s'ha fet també amb un vector que conté la seqüència de l'enzim BirA (que fa la biotinització *in vivo* de la seqüència de biotinització localitzada al final de la cadena β del DR); també amb un vector que confereix resistència a la blastocidina i amb la xaperona calreticulina.

Per Western-Blot (revelat amb estreptavidina-HRP) s'ha comprovat la producció de molècules DR per part de les cèl·lules S2 transfectades, alhora que també que la cadena β havia estat biotinitzada *in vivo* (figura 29).

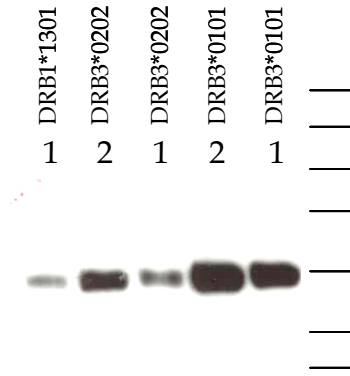


Figura 29. Western-Blot realitzat per analitzar la producció de molècules de DR per part de les cèl·lules S2 transfectades, que ahora s'utilitza per confirmar que s'ha portat a terme la biotinització *in vivo* de la cadena β . Els nombres 1 i 2 es corresponen amb el nombre de transfecció.

Els nivells de producció de les cèl·lules S2 transfectants obtingudes de DRB3*0202 i DRB3*0101 han estat de 1-1,5 mg a partir de 2 litres de sobrenedant induït, comparables als que s'obtenen en la producció de DRB1*0301 utilitzant la mateixa metodologia (tot i que els nivells per a DRB1*0401 que s'obtenen són gairebé el doble). A partir de la sembra per dilució límit, s'han obtingut diverses clones de cèl·lules S2 productores de DRB3*0202 (nombres de 14 a 37 de la figura 30) amb selecció amb blastocidina. Per a l'al·lel DRB3*0101 només s'ha obtingut una clona S2 productora que és d'expressió força dèbil (nombre 5 de la figura 30). Tot i l'obtenció de clones productores, el monòmer que hem utilitzat en els experiments de tinció de limfòcits T CD4+ estimulats, dels quals presentem resultats, ha estat purificat a partir de *bulk* de transfecció crescut, no de les clones.

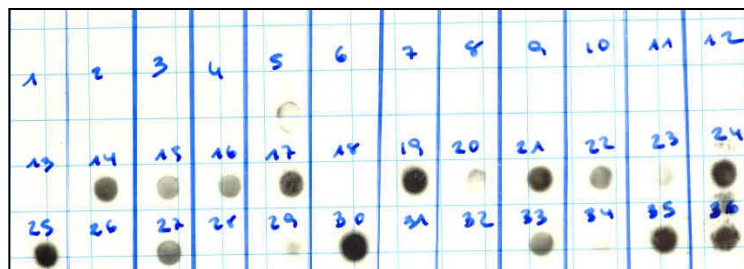


Figura 30. Dot-Blot realitzat per a la criba de les clones de cèl·lules S2 productores de monòmer, en aquest cas el revelat ha estat realitzat utilitzant la hibridació amb un anticòs específic anti-DR.

V.IV.2.3 Anàlisi de l'existència de pèptids antigènics a la toxina tetànica que puguin ser presentats i reconeguts en el context de DRB3*0101

Per avaluar l'existència de pèptids antigènics, a la cadena pesada de la toxina del *Clostridium tetani*, que són presentats i reconeguts en el context de l'al·lel DRB3*0101, hem utilitzat la tècnica del TGEM (*Tetramer guided epitope mapping*). Per això, la seqüència aminoacídica de la cadena pesada de la toxina tetànica, ha estat dividida en 105 pèptids consecutius de 20 aminoàcids de longitud, que solapen entre ells 12 aminoàcids. Aquests pèptids han estat agrupats en grups de 5 pèptids i els 21 grups resultants han estat utilitzats per a la estimulació de limfòcits T CD4+ (d'un individu DRB3*0101), amb la finalitat d'expandir una possible població T CD4+ pèptid-específica existent a la mostra. La detecció de la presència de limfòcits T CD4+ que reconeixen algun d'aquests grups de pèptids en el context de DRB3*0101, s'ha fet utilitzant els tetràmers de DRB3*0101 carregats amb els grups de pèptids específics utilitzats per estimular. Posteriorment s'han incubat les cèl·lules amb els tetràmers i s'ha valorat la tinció per citometria de flux, com a indicació de la interacció específica TCR-HLA+pèptid.

Analitzant els 21 grups de cèl·lules estimulades amb pèptids s'ha observat, que la utilització dels grups de pèptids 4, 8 i 21 provoca una expansió de limfòcits T CD4+ que es tenyeixen amb el tetràmer de DRB3*0101. Aquestes cèl·lules reconeixien per tant algun dels pèptids en cadascun dels tres grups.

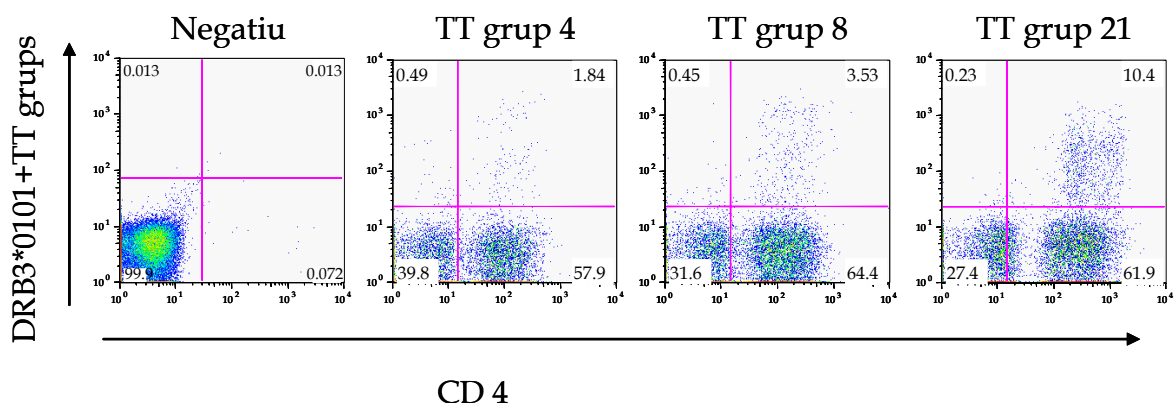


Figura 31. Grups de pèptids de la toxina tetànica (TT) que estimulen cèl·lules T CD4+ quan són presentats en el context de DRB3*0101, observem senyal de tinció amb el tetràmer de DRB3*0101 carregat amb ells. El % indica el percentatge de cèl·lules positives respecte al total de limfòcits.

Posteriorment s'han carregat els tetràmers de DRB3*0101 amb els pèptids individuals de cadascun dels grups que havien donat una tinció positiva. Dels 15 pèptids possibles s'ha observat que són els pèptids TT 20, TT 36, TT 37 i TT 102 els que són reconeguts com a pèptids antigènics en el context de DRB3*0101 i capaços de provocar una expansió de limfòcits T CD4+.

Les seqüències d'aquests pèptids són les següents:

TT 20 ILFLQWVRDIIDDFTNESSQ (610-630)

TT 36 SYQMYRSLEYQVDAIKKIID (738-758),

TT 37 EYQVDAIKKIIDYEYKIYSG (746-766),

TT 102 GLVGTHNGQIGNDPNRDILI (1066-1086).

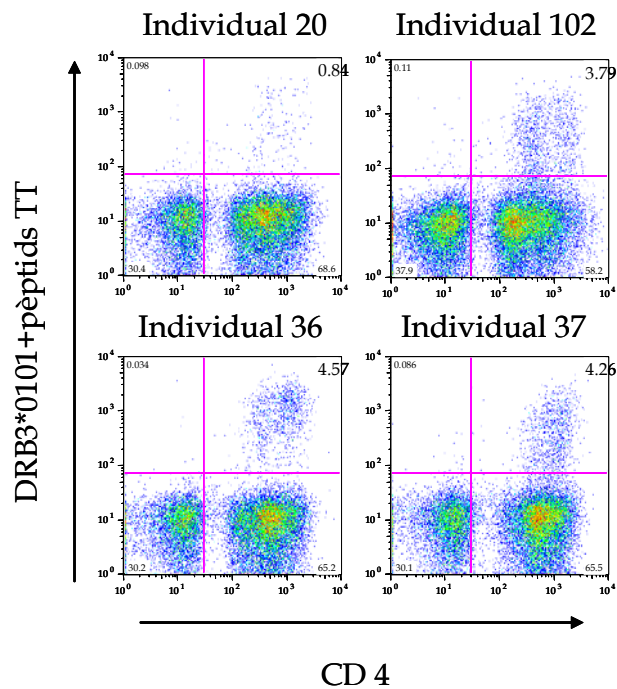


Figura 32. Tincions amb els tetràmers DRB3*0101 carregats amb els pèptids individuals corresponents.

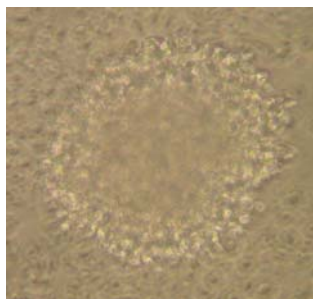


Figura 33. Aspecte dels "grumolls" de limfòcits T CD4+ estimulats.

En aquest punt cal dir que aquests resultats ens ha servit per a validar la funcionalitat del tetràmer de DRB3*0101. Després de la tinció amb els tetràmers de DRB3*0101 carregats amb els pèptids TT 36 i TT 102, s'ha procedit a una separació cel·lular (separació cel·lular per citometria de flux) dels limfòcits T CD4+ que es tenyien amb el tetràmer. S'ha obtingut 1 clona de limfòcits T CD4+ específics per TT 36 amb una afinitat similar al total de cèl·lules re-estimulades. També s'han obtingut 4 clones de limfòcits T CD4+ específics de TT 102 que són d'afinitats variables.

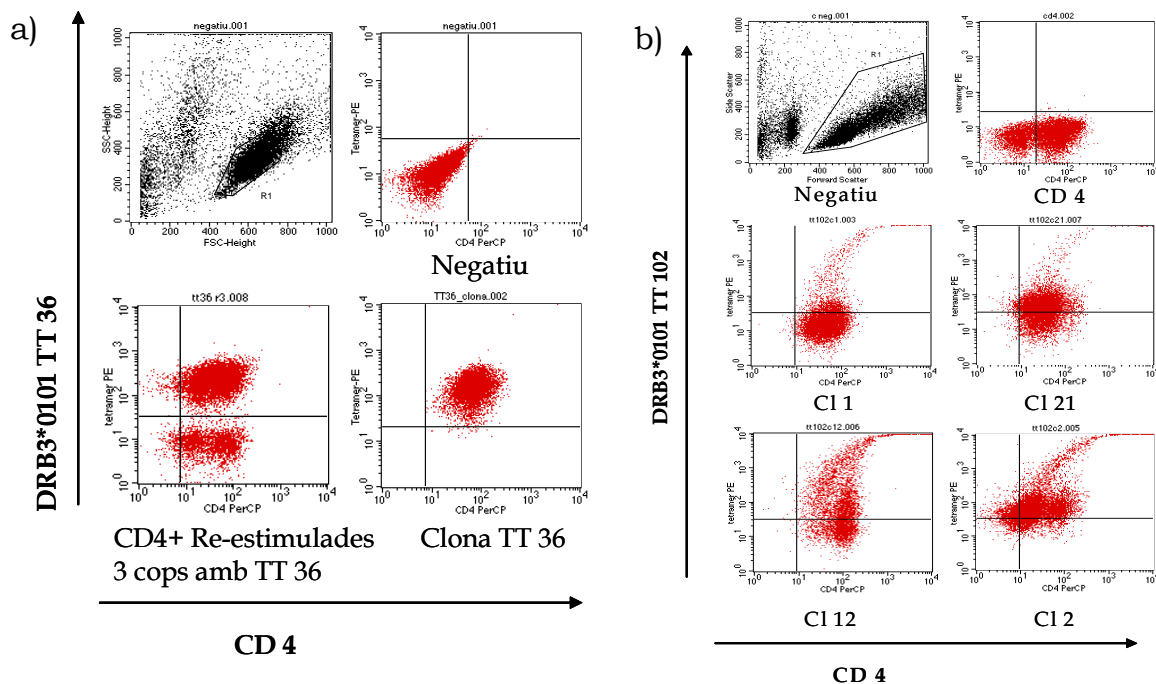


Figura 34. Clones T CD4+ específiques pels pèptids a) TT36, b) TT102 en el context de DRB3 obtingudes.

V.IV.2.4 Anàlisi de la freqüència de precursors T CD4+ específics per TT 102 en sang perifèrica un mes post-vacuna de la toxina tetànica:

L'estimulació de cèl·lules DRB3*0101 (prèviament marcades amb CFSE) d'un individu 1 mes post-vacunació amb toxoide tetànic amb els pèptids TT 36 i TT 102, s'ha fet per determinar el nombre de limfòcits T DRB3*0101 específics en sang. Els nombres de precursors observats (tot i ser experiments preliminars que volem repetir en més individus), situen el nombre de precursors específics per DRB3 en l'ordre de 1 cèl·lula entre 100.000 T CD4+. Aquesta determinació s'ha fet considerant que els limfòcits T

CD4+ control estimulats amb PHA s'han dividit 10 vegades. Aquests valors són similars als observats quan es realitzen aquests experiments amb altres DRB1 com és el cas de DRB1*0401 i el pèptid de l'Hemaglutinina 307-319 on s'observen 2-5 cèl·lules específiques cada 100.000 T CD4+ (Novak 1999).

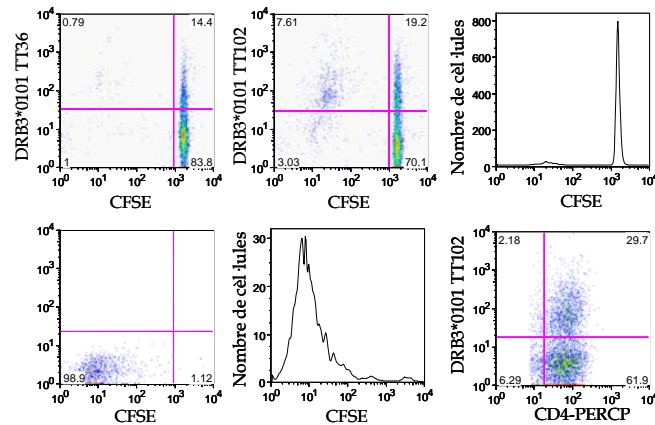


Figura 35. Anàlisi del nombre de precursors T CD4+ específics de toxoide tetànic (TT36 i TT102) restringits per DRB3*0101.

V.IV.2.5 Anàlisi de l'existència de pèptids antigènics a la toxina tetànica que puguin ser presentats i reconeguts en el context de DRB3*0202

L'anàlisi de l'existència de pèptids antigènics a la toxina del *Clostridium tetani* que són presentats i reconeguts en el context de l'al·lel DRB3*0202 s'ha fet també utilitzant la tècnica del TGEM. Els 21 grups de 5 pèptids solapants que cobreixen la seqüència de la toxina tetànica han estat utilitzats per a la estimulació de limfòcits T CD4+ d'un individu DRB3*0202 (vacunat en els últims 2 anys). Amb els tetràmers de DRB3*0202 carregats amb els grups de pèptids s'ha analitzat la tinció de les cèl·lules estimulades amb els pèptids. S'ha observat, que el grup de pèptids 13 provoca una expansió de limfòcits T CD4+ que es tenyeixen amb el tetràmer de DRB3*0202. La tinció amb els pèptids individuals que pertanyen a aquests grups ha determinat que és el pèptid 64 el responsable de l'expansió.

La seva seqüència és:

TT 64 SASHLEQYGTNEYSISSMK (962-972).

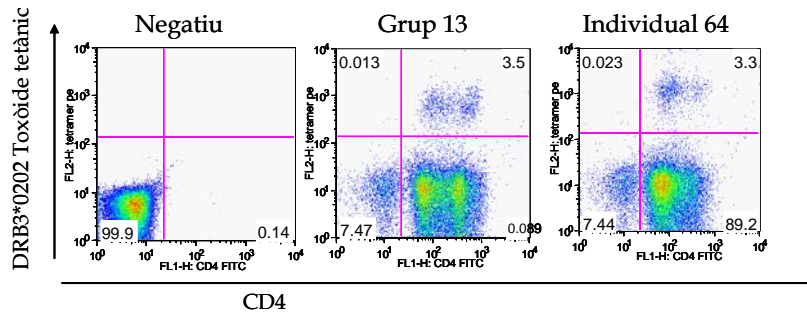


Figura 36. Pèptids individuals del Toxoide tetànic que són reconeguts en el context de DRB3*0202.

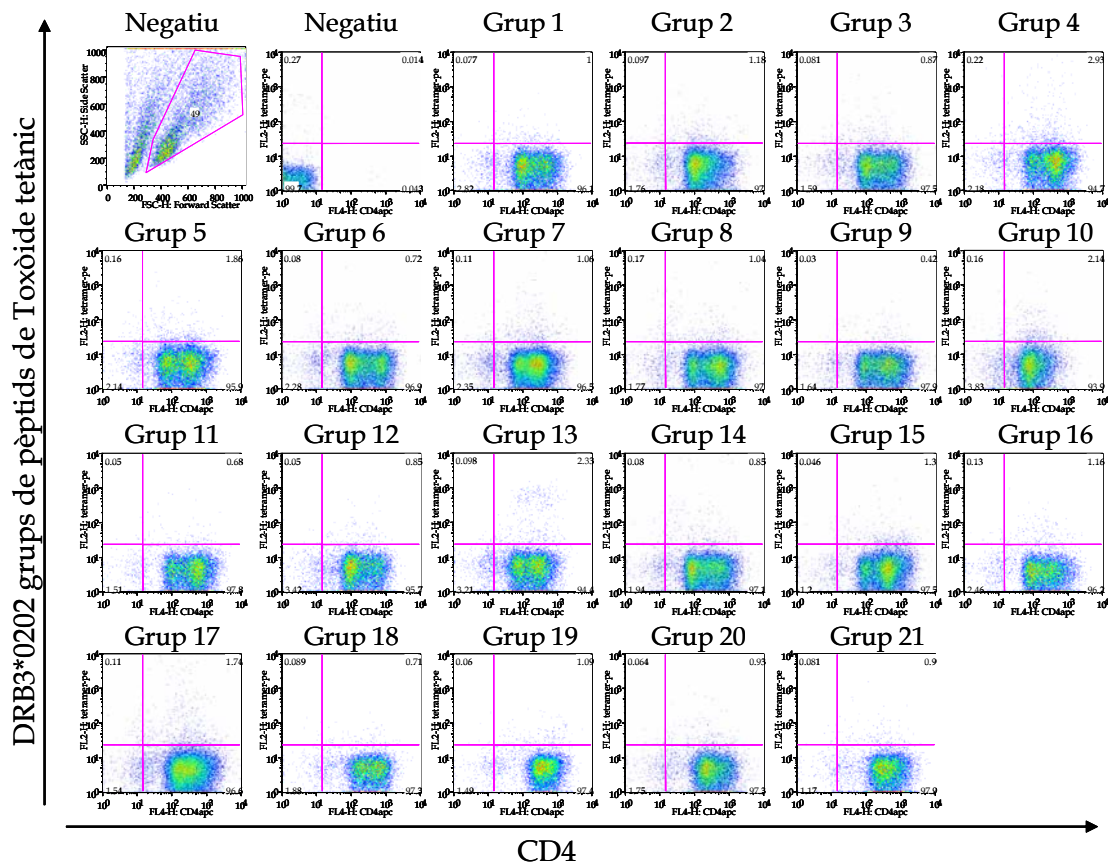


Figura 37. Tinció amb tetràmers de DRB3*0202, dels limfòcits T CD4+ estimulats amb els grups de pèptids del toxoide tetànic.

V.IV.2.6 Anàlisi de l'existència de pèptids antigènics al virus de la grip que són presentats i reconeguts en el context de DRB3*0202

Per valorar si existeix resposta al virus de la grip que sigui restringida per DRB3*0202 s'ha fet l'anàlisi de tres proteïnes del virus influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) que són l'hemaglutinina, la proteïna de la matriu i la nucleoproteïna. Per totes aquestes

proteïnes del virus de la grip, s'havia descrit prèviament que hi havia resposta T CD4+ en el context de diferents al·lels de DR [Danke, et al., 2003, Ulmer, et al., 1998].

V.IV.2.6.1 Hemaglutinina H1N1

En el cas de la seqüència aminoacídica de l'hemaglutinina, ha estat coberta per 41 pèptids de 20 aminoàcids, adjacents i solapants entre ells 12 aminoàcids. Els 41 pèptids s'han distribuït en 7 grups de cinc i 1 de sis pèptids que s'han utilitzat per estimular els limfòcits T CD4+ de diversos individus DRB*0202 prèviament vacunats amb el virus de la grip (en els últims dos anys). En la tinció amb els tetràmers de DRB3*0202 carregats amb els grups de pèptids de l'hemaglutinina s'ha vist que no n'hi ha cap que estimuli ni tenyeixi les cèl·lules en el context de DRB3*0202. Com a control de que l'estimulació era correcta s'ha avaluat la tinció amb el tetràmer de DRB1*1501 carregat amb un pèptid antigènic de l'hemaglutinina que es presenta en aquest context (el nombre 33). El control de DRB1*1501 ha donat tinció positiva demostrant que l'estimulació era correcta i que no hi ha cap pèptid antigènic per DRB3*0202 en l'hemaglutinina de H1N1.

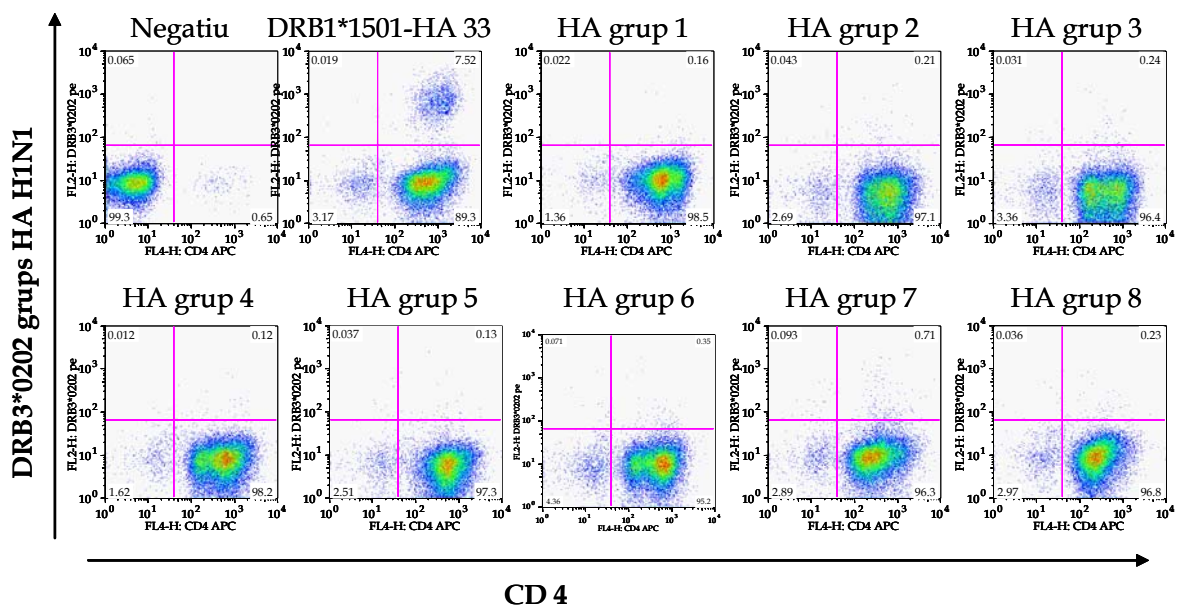


Figura 38. Anàlisi de la tinció amb el tetràmer de DRB3*0202 dels limfòcits T CD4+ estimulats amb els grups de pèptids de l'hemaglutinina de H1N1.

V.IV.2.6.2 Proteïna de la matriu H1N1

En el cas de la proteïna de la matriu la seva seqüència aminoacídica s'ha distribuït en 29 pèptids de 20 aminoàcids solapants entre ells 12 aminoàcids que s'han agrupat en 6 grups per estimular els limfòcits T CD4+ d'un individu DRB*0202. En la tinció amb els tetràmers de DRB3*0202 carregats amb els grups de pèptids s'ha vist que hi ha dos grups positius: el primer i el segon.

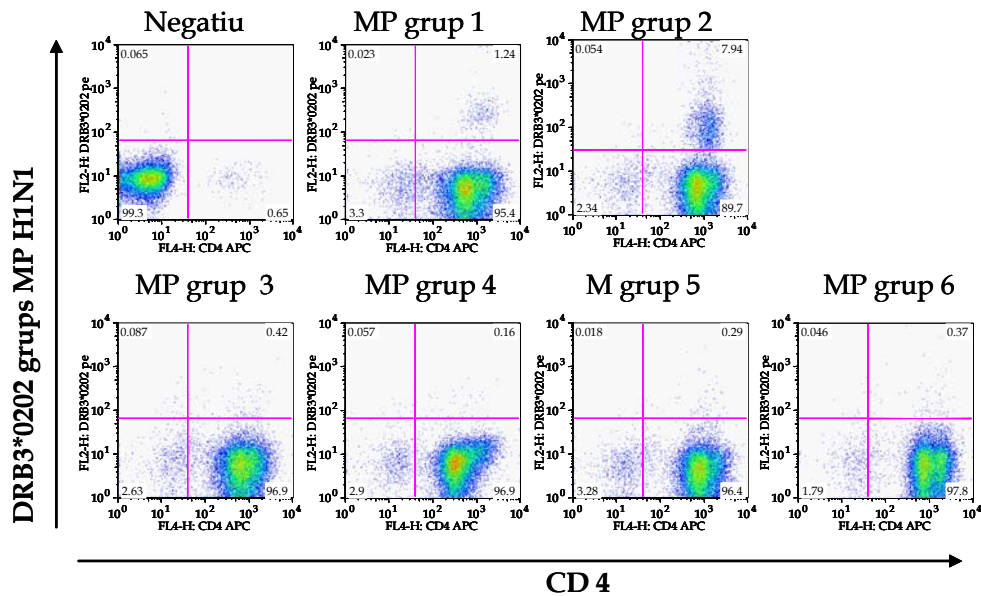


Figura 39. Tinció de limfòcits T CD4+ estimulats amb els grups de pèptids de la proteïna de la matriu H1N1 amb els tetràmers de DRB3*0202 amb els corresponents grups.

Els pèptids corresponents a aquests grups positius (1 i 2) s'han carregat de manera individual al tetràmer de DRB3*0202, i s'ha fet l'anàlisi de la tinció de les cèl·lules estimulades amb els dos grups de pèptids. Dels 10 pèptids testats corresponents als dos grups positius s'han identificat 3 pèptids que són reconeguts pels limfòcits T CD4+ en el context de DRB3*0202 MP42, MP43 i MP 51 i les seves seqüències són:

- MP42 MSLLEVEVETYVLSIIPSGPL (1-20),
- MP 43 TYVLSIIPSGPLKAEIAQRL (9-20),
- MP 51 GLQRRRFVQNALNGNGDPNN (73-92).

Els dos primers es corresponen amb un mateix determinant antigènic.

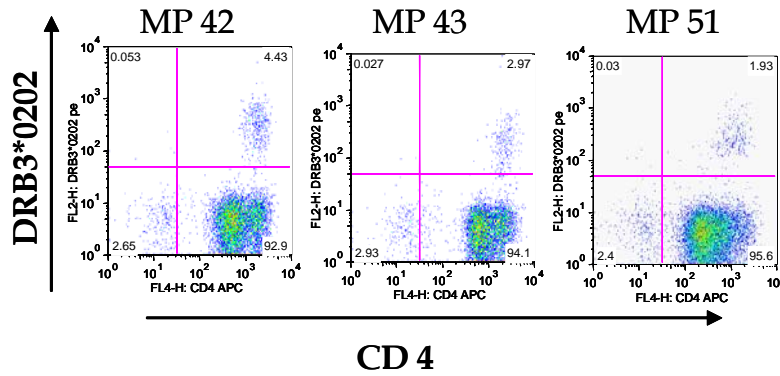


Figura 40. Tinció dels limfòcits T CD4+ estimulats amb el grups de pèptids de la proteïna de la matriu amb els tetràmers de DRB3*0202 carregats amb els pèptids positius.

V.IV.2.6.3 Nucleoproteïna

Els limfòcits T CD4+ aïllats d'un individu DRB3*0202 van ser estimulats amb els 60 pèptids solapants corresponents a la nucleoproteïna (agrupats en 12 grups). L'anàlisi de la tinció dels limfòcits T CD4+ expandits va demostrar que no hi ha cap pèptid de la nucleoproteïna que sigui reconegut per limfòcits T CD4+ en el context de DRB3*0202.

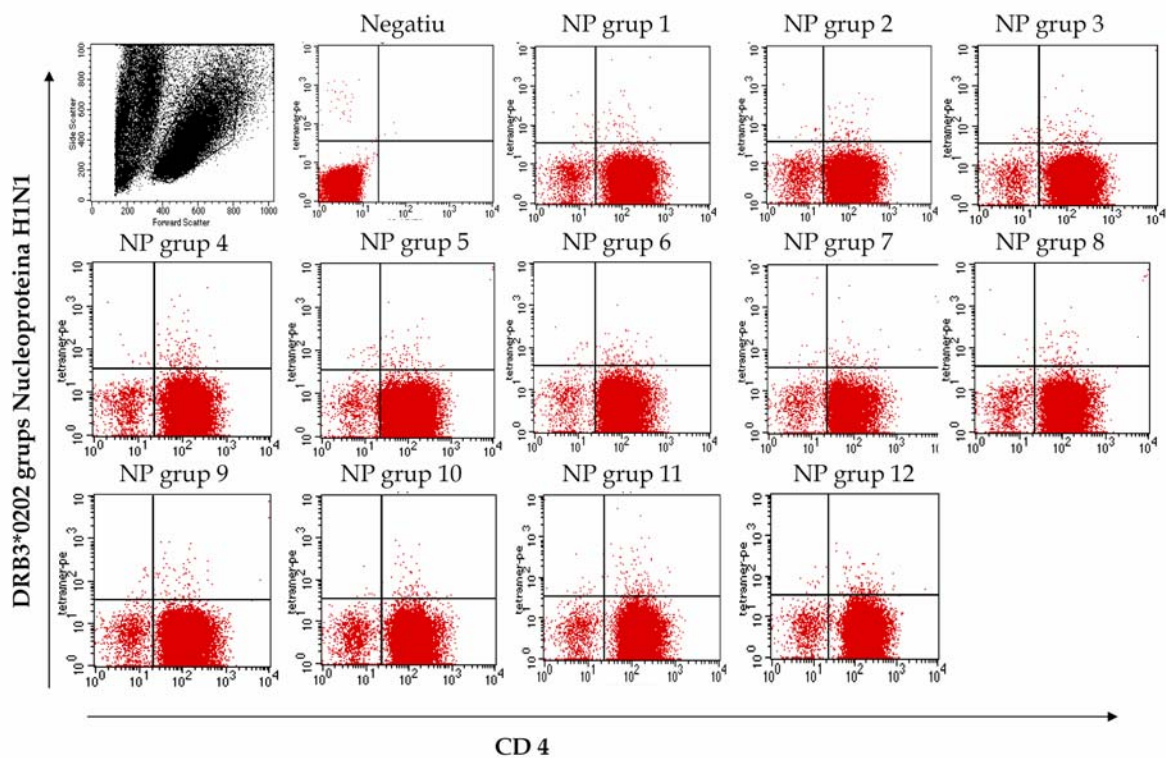


Figura 41. Anàlisi dels limfòcits T CD4+ estimulats amb els grups de pèptids de la nucleoproteïna tenyits amb els tetràmers DRB3*0202.

Tot i que en aquest cas els grups 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 i 11 podrien semblar dèbilment positius, l'anàlisi amb el tetràmer DRB3*0202 carregat amb els pèptids individuals corresponents als grups va demostrar que no hi havia cap pèptid clarament positiu. Per exemple el pèptid individual 16 pot semblar que provoca una expansió dèbil de les cèl·lules DRB3*0202, però no es defineix una població clara i alhora si fem l'anàlisi de les cèl·lules CD4+ que es tenyeixen amb el tetràmer de DRB3*0202+HA16 i que són CD25+ veiem que no són les cèl·lules activades CD25+ les que es tenyeixen amb el tetràmer indicant que no estan estimulades, i pot ser tinció inespecífica.

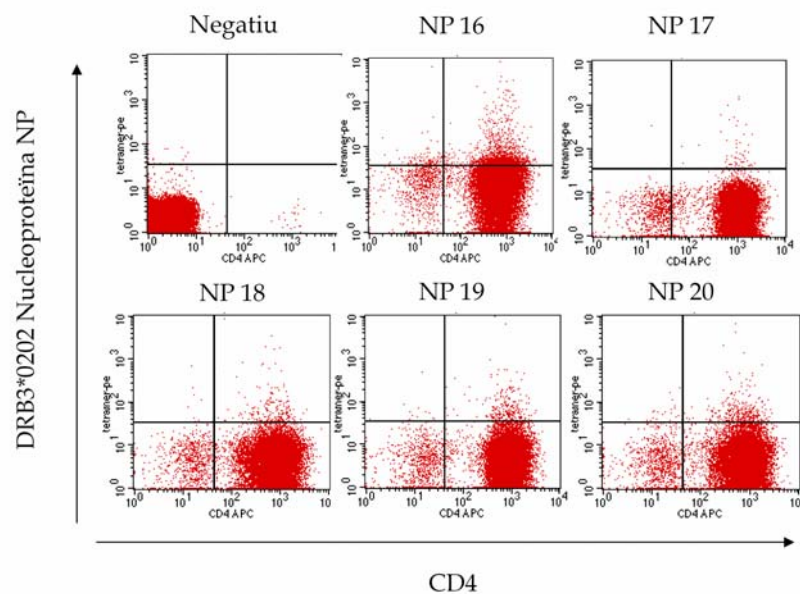


Figura 42. Anàlisi dels limfòcits T CD4+ estimulats amb el grup de pèptids 4 de la nucleoproteïna tenyits amb els tetràmers de DRB3*0202 carregats amb els pèptids individuals.

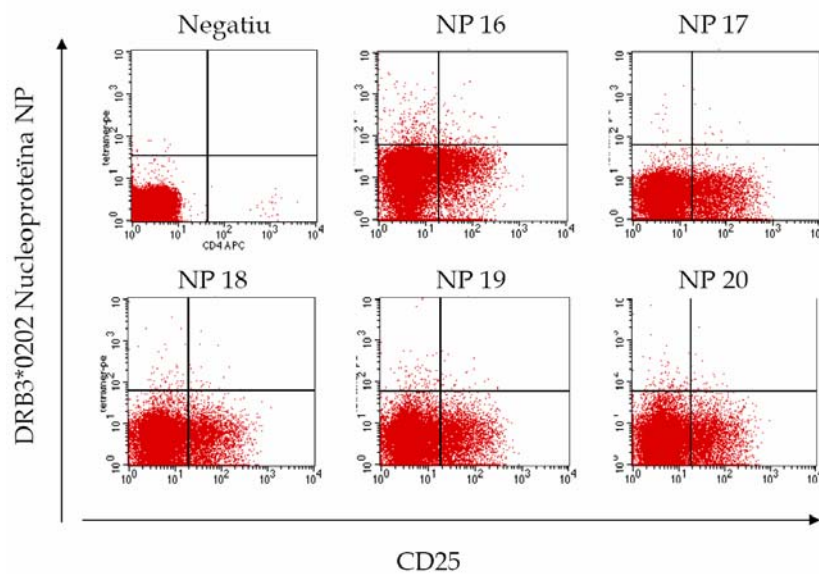


Figura 43. Anàlisi dels limfòcits T CD4+ estimulats amb el grup de pèptids 4 de la nucleoproteïna tenyides amb els tetràmers de DRB3*0202 carregats amb els pèptids individuals; en aquest cas es mostra la tinció amb tetràmer respecte a la presència de CD25 en superfície en les cèl·lules CD4 +.

V.IV.2.6.4 Valoració de la resposta a l'hemaglutinina del virus Influenza A de la soca /Panama/2007/99 (H3N2)

Després de veure que no hi havia cap pèptid antigènic en la seqüència de l'hemaglutinina de la soca (H1N1), s'ha mirat si en la mateixa proteïna d'una soca diferent existeix algun pèptid antigènic. L'estimulació de cèl·lules T CD4+ d'un individu DRB3*0202 amb els 9 grups de pèptids de l'hemaglutinina procedent del virus Influenza A/Panama/2007/99 (H3N2), ha mostrat l'existència d'un grup de pèptids positiu (el nombre 1). Amb els pèptids individuals d'aquest grup s'han carregat tetràmers DRB3*0202 i s'ha fet l'anàlisi de la tinció. S'ha vist que és el pèptid nombre 35 de la nucleoproteïna que és reconegut en el context de DRB3*0202 per limfòcits T CD4+. La seqüència d'aquest pèptid que és reconegut en el context de DRB3*0202 és: H3 35 PIGKCNSECITPNGSIPNDK. Fent una anàlisi de les soques de H3N2 que contenen aquesta seqüència en l'hemaglutinina s'ha vist que són més de 500: la reconeguda és per tant una part molt conservada de l'hemaglutinina H3N2.

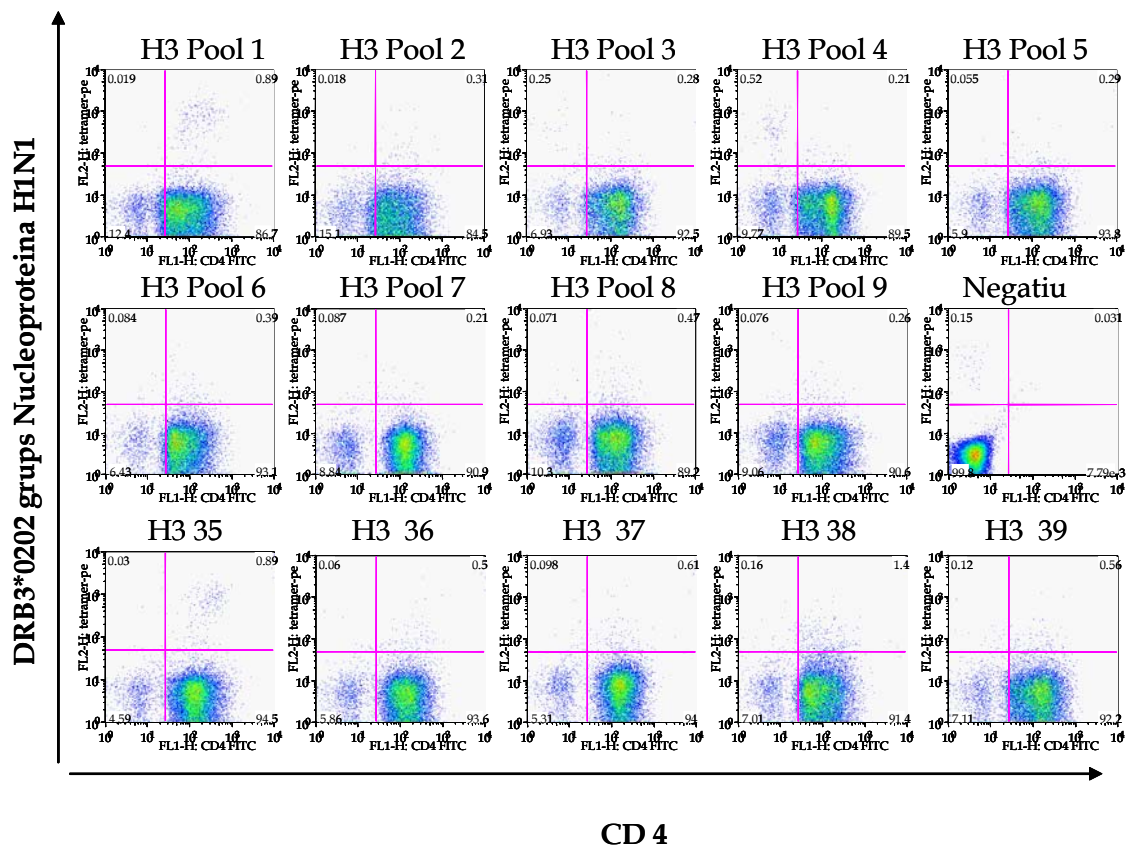


Figura 44. Tinció de limfòcits T CD4 amb els tetràmers de DRB3*0202 carregats amb els grups de pèptids d'hemaglutinina H3N2.

V.IV.2.7 Anàlisi de la freqüència de precursors T CD4+ específics pels pèptids antigènics de la proteïna de la matriu 42-43 i 51 en sang perifèrica

Per valorar el nivell de resposta T CD 4+ en el context de DRB3*0202 s'han estimulat cèl·lules DRB3*0202 i DRB1*1101 del mateix individu marcades amb CFSE amb els pèptids antigènics corresponents a cada al·lel (pèptids MP 42, 43, 51 i MP 47, 54, 67, 68). Això s'ha fet per poder comparar el nombre de limfòcits T CD4+ DRB3*0202 i DRB1*1101 específics per al virus de la grip en sang, en un individu que havia estat vacunat en els últims dos anys.

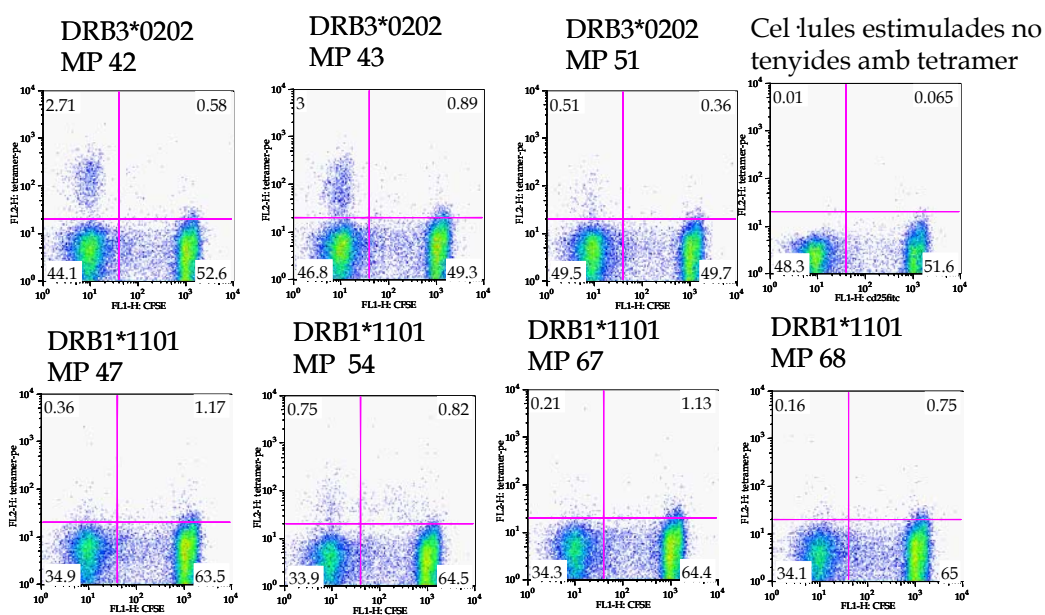


Figura 45. Assaig de proliferació amb pèptids específics en limfòcits T CD4+ tenyits amb CFSE. Posteriorment les cèl·lules han estat tenyides amb els tetràmers específics (DRB3*0202/DRB1*1101) carregats amb els pèptids corresponents.

El nombre de limfòcits T CD 4+ específics precursors calculats per a cada pèptid, en el context de DRB3*0202 o DRB1*1101 és el següent:

DRB3*0202	MP 42	1 precursor en	18.893,0	CD4+
	MP 43	1 precursor en	17.066,7	CD4+
	MP 51	1 precursor en	100.392,2	CD4+
DRB1*1101	MP 47	1 precursor en	142.222,2	CD4+
	MP 54	1 precursor en	68.266,7	CD4+
	MP 67	1 precursor en	243.809,5	CD4+
	MP 68	1 precursor en	284.444,4	CD4+

Taula 6. Nombre de limfòcits T CD4+ precursors calculats per cada pèptid.

Els nombres de precursors observats són força més elevats per DRB3*0202 que no pas pels pèptids de DRB1*1101, però entren dins els rangs de resposta CD4+ observada normalment.

V.IV.2.8 Anàlisi de l'existència de pèptids antigènics al virus de la grip que són presentats i reconeguts en el context de DRB3*0101

Per l'anàlisi de la resposta CD4+ al virus de la grip en el context de DRB3*0101, només s'ha utilitzat la proteïna de la matriu del virus influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). S'han estimulat 14 dies limfòcits T CD4+ d'un individu DRB3*0101 (que havia estat vacunat per la grip en els últims dos anys) amb els 30 pèptids solapants (en 12 aminoàcids) que cobreixen la seqüència de la proteïna de la matriu del virus influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) repartits en grups de 5 pèptids. En aquest cas s'ha observat que no hi ha cap pèptid que sigui reconegut en el context de DRB3*0101. Aquest experiment ha estat repetit dos cops, per tal de validar que l'estimulació s'havia fet de la manera correcta. Cal dir que en la primera estimulació els grups 3 i 2 semblaven lleugerament positius, però no ho van ser a l'hora de fer les anàlisis amb els pèptids individuals ni tampoc en la segona estimulació de limfòcits T CD4+ DRB3*0101 d'un altre individu.

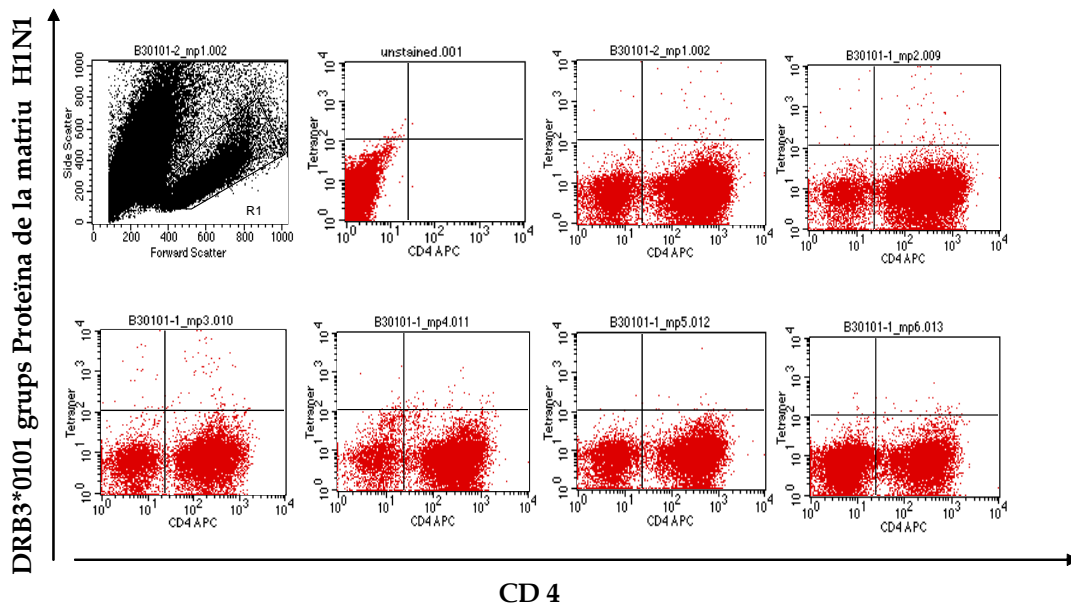


Figura 46. Limfòcits T CD4+ estimulats amb grups de pèptids de la proteïna de la matriu, tinció amb el tetràmer de DRB3*0101.

En resum podem dir que clarament existeix una resposta T CD4+ al virus de la grip en el context de DRB3*0202, ja que s'han determinat determinants antigènics tant a la proteïna de la matriu com per l'hemaglutinina. Alhora cal dir que en el context de DRB3*0101 calen fer més estudis de TGEM ja que només s'ha avaluat la proteïna de la matriu, i no l'hemaglutinina ni la nucleoproteïna, per a poder valorar el paper d'aquest loci en la resposta T CD4+ al virus de la grip.

V.IV.2.9 Correspondència dels pèptids antigènics identificats amb els motius d'unió descrits

V.IV.2.9.1 DRB3*0202

En estudis de seqüenciació (pel mètode d'Edman) de pèptids eluits de molècules de DR52 [Verreck, et al., 1996] que havien estat purificades amb anticossos específics per DRB3 s'havia descrit un possible motiu d'unió a DRB3*0202. És el següent:

	P1				P4					P6		P9		
	β85	β86	β89	β90	β13	β70	β71	β74	β78	β11	β13	β9	β58	β58
DRB3*0202	V	G	F	T	S	Q	K	Q	Y	L	S	E	D	A
Aminoàcids dels pèptids que uneixen	Y/F/I/L				N					A/S/P/D/E		L/N/I/S/G		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Polar					Petit/àcidic		petit/hidrofòbic		

Figura 47. Motiu d'unió a DRB3*0202, descrit per [Verreck, et al., 1996].

Els pèptids que nosaltres hem vist que són reconeguts en el context de DRB3*0202, en general es corresponen amb el motiu d'unió descrit per Verreck et al. Ara bé, en alguns casos hem vist que en determinades posicions hi trobem aminoàcids diferents que en general mantenen les característiques aminoacídiques dels anteriorment descrits. No obstant, no és així en la posició P6.

Proteïna de la matriu	Toxòide tetànic
42 MSLLEVET YVLSIIPSGPL ↑ ↑ ↑ ↑	64 SASHLEQYGTNEYSIISMK ↑ ↑ ↑ ↑
43 TYVLSIIPSGPL KAEIAQRL ↑ ↑ ↑ ↑	Hemaglutinina (H3N2)
51 GLQRRRFVQ NALNGNDPNN ↑ ↑ ↑ ↑	35 PIGKCNSECIT PNGSIPNDK ↑ ↑ ↑ ↑

Figura 48. Pèptids antigènics trobats pels al llocs de DRB3. En negre les posicions descrites prèviament com a lloc d'unió, en vermell les noves identifications. Indiquen en els pèptids MP 42 i 43 els dos llocs d'unió possibles.

Les noves unions d'aminoàcids concrets que hem vist que es poden ubicar en les corresponents butxaques, s'indiquen en vermell en la figura 49, on es mostra el motiu d'unió a pèptids de DRB3*0202 que caldria redefinir. Cal dir que per als pèptids MP 42-43 hem distingit dues situacions, depenent d'on considerem que s'uneix el pèptid, ja que és possible la unió en dues posicions i, per tant, en la figura 49 hem indicat les dues opcions.

	P1				P4					P6		P9		
	β85	β86	β89	β90	β13	β70	β71	β74	β78	β11	β13	β9	β58	β58
DRB3*0202	V	G	F	T	S	Q	K	Q	Y	L	S	E	D	A
Aminoàcids dels pèptids que uneixen	Y/F/I/L				N					A/S/P/D/E		L/V/I/S/G		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Polar					Petit/àcidic		petit/hidrofòbic		
	Y/F/I/L				N/S					A/S/P/D/E/I/L/Y		L/V/I/S/G/N		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Polar					Petit/àcidic /hidrofòbic		petit/hidrofòbic		
	Y/F/I/L				N/I					A/S/P/D/E/L/Y		L/V/I/S/G/N		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Polar/alifàtic					Petit/àcidic /hidrofòbic		petit/hidrofòbic		

Figura 49. Motiu d'unió dels pèptids a DRB3*0202, incloent les noves unions que hem observat.

V.IV.2.9.2 DRB3*0101

En el cas de DRB3*0101, no hi havia un motiu d'unió descrit ben caracteritzat. Només es fa referència (Kwok WW, comunicació personal i [Verreck, et al., 1996]) a la unió en posició 1 del pèptid que per tenir el DRB3*0101 una Glicina en posició 86 unirà preferencialment els aminoàcids W, Y, I, L, F. Analitzant les seqüències dels nostres pèptids antigènics hem considerat les posicions a través de les quals es poden unir a DRB3*0101 els pèptids i són les següents:

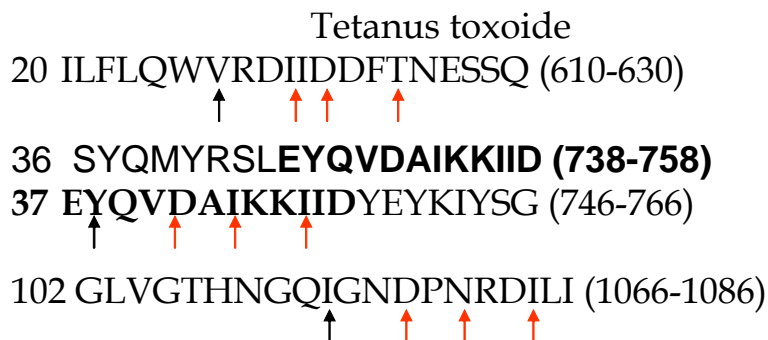


Figura 50. Motiu d'unió dels pèptids específics de DRB3*0101 que hem observat, en negre les posicions prèviament descrites i en vermell les noves posicions descrites.

En un estudi recent [Sukati, et al., 2005], s'ha descrit un pèptid derivat de l'antigen plaquetar HPA 1a que fa proliferar els limfòcits T CD4+ en context de DRB3. La seqüència del pèptid es la que es veu en la figura 51. Posada en el context d'unió a DRB3*0101 confirma els nostres resultats en que sembla que es dona la unió d'asparagina en la posició 4 i de residus hidrofòbics en P9.



Figura 51. Pèptid antigènic derivat de HPA 1a que s'ha descrit que s'uneix a DRB3*0101 i és reconegut per limfòcits T CD4+

DISCUSIÓ GENERAL

Si bé aquesta tesi en conjunt aborda aproximacions metodològiques per a millorar la definició i potenciar el coneixement funcional de les molècules HLA, les peculiaritats de les metodologies descrites fan recomanable abordar aquesta discussió general en base a dos apartats clarament diferenciats. Un primer apartat que fa referència a les aproximacions per a la tipificació i el segon en referència a l'ús de multímers MHC-pèptid (tetràmers HLA de classe II). Així en el primer apartat (tipificació HLA), cada capítol de resultats presenta el seu article amb les seves conclusions i, per tant, en aquesta discussió general només apuntarem els aspectes comuns. En canvi la discussió de l'apartat dels tetràmers de DRB3 correspon a la valoració de tots els conceptes de l'Annex 1 que al no estar presentat en format d'article necessita de la discussió que aquí s'apunta.

VI.I Millores en les metodologies per a la tipificació dels loci HLA

Les tres aproximacions de tipificació mitjançant la PCR a temps real que s'han descrit per HLA-B27, HLA-B i HLA-DRB1 han demostrat que és possible utilitzar la PCR a temps real amb sondes d'hibridació per a la resolució del polimorfisme dels loci HLA. D'altra banda, també s'ha demostrat que l'aplicació de la PCR a temps real a la tipificació HLA aporta nombrosos avantatges respecte a les tècniques actualment en ús. En la discussió de cada article s'han fet les comparacions concretes pertinents per a cada aproximació descrita. Passem ara a fer les comparacions amb altres metodologies de manera global.

VI.I.1 Comparació de la utilització de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació respecte a les metodologies de tipificació convencionals basades en la PCR

Tractarem les tipificacions d'HLA-B27, HLA-B i HLA-DRB1 com a conjunt, i descriurem els avantatges que presenten respecte a les metodologies de tipificació per PCR més utilitzades en els laboratoris d'histocompatibilitat. De manera general classifiquem els avantatges de les nostres metodologies en diferents nivells en funció de l'aspecte que milloren.

VI.I.1.1 Reducció del nombre de reaccions de PCR a realitzar i de sondes a híbrida

En les tres aproximacions descrites hem reduït el nombre de reaccions i sondes a utilitzar respecte les aproximacions tradicionals. En cada discussió específica s'ha definit la magnitud de la reducció en cada cas concret, però en termes generals podem dir que ha estat clarament rellevant. Destaquem però que la genotipificació d'alta-mitja resolució d'HLA-B27 s'ha aconseguit utilitzant només tres reaccions d'amplificació i 5 sondes d'híbridació, mentre que l'aproximació de la mateixa resolució clàssica utilitzava 14 reaccions de PCR-SSP (M. Bunce capítol 5 [Bidwell, 2000]). En el cas del locus HLA-B la nostra metodologia utilitza 18 tubs de reacció i 10 sondes d'híbridació, mentre que la PCR-SSP de baixa (Dynal AllSet⁺ SSP) resolució requereix la realització de 48 tubs d'amplificació i són 55 tubs els corresponent a HLA-B en l'aproximació del *phototyping* descrita per [Bunce, et al., 1995]. Alhora en el cas de la tipificació d'HLA-DRB1 s'utilitzen 16 tubs de reacció amb 27 sondes Taqman, mentre que a l'aproximació descrita per [Bunce, et al., 1995] són necessàries 30 les reaccions de PCR-SSP per aconseguir una tipificació de baixa-mitja resolució del locus DRB1. En aquest punt cal destacar que el nivell de resolució per HLA-B i HLA-DRB1 s'ha mantingut respecte a altres metodologies que donen una baixa-mitja resolució, i que per alguns al·lels concrets s'ha incrementat.

En quant a la reducció del nombre de sondes, queda clar que només ha estat possible en el cas d'utilització de sondes d'híbridació Light Cyclers FRET. L'exemple de màxima reducció el trobem en el cas d'HLA-B on, amb 10 sondes d'híbridació que es combinen amb encebadors específics, es pot resoldre el vast polimorfisme d'aquest locus. En el cas de les sondes Taqman® s'ha reduït el nombre de sondes respecte a la PCR-SSO degut a que la nostra metodologia permet la combinació d'encebadors específics i sondes. No hi ha dubtes de que si l'aproximació s'hagués fet amb sondes FRET, la reducció de sondes seria molt més ampla doncs la valoració de temperatures de fusió (T_m) permet fins a 7 dades distintes (habitualment 3-4), cosa que queda reduïda a dues opcions (SI o NO) en el cas de l'ús de sondes Taqman®.

VI.I.1.2 Reducció de la durada de la tècnica i dels passos a realitzar

Dels resultats obtinguts amb les metodologies de tipificació optimitzades per HLA-B27, HLA-B i HLA-DRB1, queda clar que les tècniques de tipificació basades en la PCR a temps real aconsegueixen una disminució en el temps total de la tècnica que és

sobretot deguda a l'eliminació dels passos post-PCR. Per tant, cal remarcar que utilitzant les aproximacions descrites s'eviten totes les manipulacions posteriors a la preparació de la mescla de reacció. En aquest sentit, el segon dels principals avantatges és que l'amplificació queda tancada dins el tub, i que la hibridació amb les sondes i anàlisi es fa amb en el mateix tub, i amb el mateix aparell, durant el ciclat (en el cas d'HLA-DRB1) o amb la realització d'un pas addicional (que dura 15 min) de generació de corbes de fusió post-ciclat (en el cas d'HLA-B27 i HLA-B). També, cal destacar que en les aplicacions de tipificació d'HLA-B27 i HLA-B, part de la rapidesa de la tècnica és assolida gràcies a la rapidesa de ciclat del termociclador (Light Cycler®) que escalfa les mostres amb aire calent i pot utilitzar rampes de temperatura molt ràpides. D'altra banda, en totes les aproximacions basades en la PCR a temps real desenvolupades, que l'amplímer quedi tancat dins el tub, fa possible minimitzar els riscos de contaminació deguts a la presència d'amplímer que prové de reaccions anteriors, eliminant per tant la principal font dels errors de tipificació, la contaminació.

VI.I.1.3 Capacitat de mostres a processar

Totes les nostres aproximacions de tipificació com a conseqüència de que requereixen de l'elaboració de menys reaccions d'amplificació per a l'obtenció d'un resultat, faciliten que es puguin processar més mostres en una tanda d'amplificació. En aquest sentit, cal dir però que el termociclador que hem utilitzat per a les metodologies d'HLA-B27 i HLA-B només pot processar 32 mostres en una sola tanda i aquesta és la principal limitació de la metodologia optimitzada. D'altra banda, podem dir però que ja existeixen en el mercat equips que fan és possible utilitzar les sondes Light Cycler FRET per a l'amplificació i la generació de corbes de fusió en plaques de 384 pouets. El gran avantatge d'aquestes plaques és que es poden processar moltes mostres alhora, i si es vol (o les regulacions internes ho requereixen) també es poden incloure controls per a les diferents corbes de fusió que es poden observar i així obtenir una garantia de que s'ha desenvolupat correctament la mescla de reacció. Per a l'aproximació de tipificació d'HLA-DRB1 també existeixen equips que utilitzen aquestes plaques de reacció de 384 pous i per tant la capacitat de processament de mostres és igualment elevada.

D'altra banda, la curta durada de les tècniques fa possible el processament de 4 o 5 tandes de mostres en un mateix dia. En aquest sentit la tècnica més llarga és la de

DRB1 que requereix 2,5 h, mentre que només es necessiten 90 min per obtenir els resultats de tipificació d'HLA-B27.

VI.I.1.4 Confusions heterozigotes

Com a conseqüència de l'elevat nombre d'al·lels que s'estan descrivint de tots els loci HLA, un dels problemes amb que es troben les tècniques de tipificació de baixa-mitja resolució clàssiques, són les ambigüitats de tipificació que generen en situació heterozigota. Això es veu com a conseqüència de que no es poden resoldre molts d'aquests al·lels nous, i tot i que es fan revisions de les tècniques, aquestes impliquen una major complexitat en quant a nombre de reaccions a realitzar i/o sondes a hibridar. Si bé aquest fet també afectarà a les aproximacions que hem descrit, al ser aproximacions més recents s'ha considerat ja un major nombre d'al·lels en el moment de dissenyar els encebadors i sondes, i tenint en compte la gran reducció en quant a nombre de reaccions a realitzar que s'ha obtingut, podem dir que quan es facin actualitzacions de les nostres metodologies aquestes seran basades també en la necessitat de menor nombre de reaccions i sondes.

D'altra banda, en el sentit de les confusions heterozigotes cal dir que les tres metodologies de tipificació que s'han descrit han estat valorades *in silico* mitjançant una aplicació informàtica que nosaltres mateixos hem desenvolupat per a l'anàlisi dels nivells d'indeterminació de tipificació en situació heterozigota. El resultat del grau d'ambigüitat en tots els casos ha estat molt baix per les aproximacions d'HLA-B27 i HLA-B; en els apartats corresponents s'han assenyalat les ambigüitats més rellevants i s'ha demostrat que no involucren al·lels comuns en la població caucàsica.

VI.I.1.5 Aplicacions

Les tres metodologies de tipificació descrites, tenen aplicacions diferents en relació amb el polimorfisme que resolen; la tècnica de tipificació d'HLA-B27 permet donar una mitja-alta resolució dels al·lels B27, alhora que la seva característica principal és que permet la discriminació dels al·lels associats amb l'Espondilitis anquilosant dels no associats, una informació que pot ser de gran utilitat en el diagnòstic de les malalties reumàtiques (com la mateixa Espondilitis anquilosant).

Les metodologies de tipificació d'HLA-B i HLA-DRB1 de mitja resolució descrites poden ser utilitzades per a qualsevol aplicació que requereixi aquesta resolució: poden ser des de la tipificació inicial en l'emmagatzematge de mostres en bancs de cordons,

fins a la realització d'anàlisis poblacionals per a trobar associacions amb malalties. En quant al trasplantament d'òrgans cal dir que és una tècnica que podria ser utilitzada, però seria necessària l'optimització de la metodologia també per als loci HLA-A, HLA-C i HLA-DQ ja que tots aquests loci (a més dels d'HLA-B i HLA-DR) es tenen en compte alhora de fer els estudis de compatibilitat.

Tot i que les metodologies de tipificació d'HLA-B i HLA-DR han estat descrites utilitzant tècniques de PCR a temps real diferents, pensen que en principi s'han de poder traslladar a altres equips. De fet, ja que hem vist que per a la resolució de polimorfismes són més eficaces les sondes FRET, (tal i com es discutirà en els propers apartats), s'haurà de traslladar l'aproximació d'HLA-DR a aquest sistema de sondes per tal de obtenir una major reducció en el nombre de sondes i tubs a utilitzar. Una altra utilitat de les aplicacions aquí descrites és que poden ésser utilitzades com a primer criatge a l'hora de fer un trasplantament d'òrgans. En aquest sentit utilitzar aquestes metodologies com a tècniques que proporcionen una baixa-mitja resolució accelerarà el temps total d'obtenció del resultat d'alta resolució; això podria ser especialment útil si aquesta aproximació s'aplica en els casos on es requereix la realització d'aquestes tècniques en un curt període de temps (p.e selecció de receptors en el trasplantament renal).

VI.I.1.6 Reproduïbilitat

S'ha demostrat que els protocols descrits són vàlids per a la realització de la tipificació en mostres reals de laboratori i que a més tenen les característiques bàsiques que són necessàries per a la seva aplicació a la pràctica clínica: reproduïbilitat, precisió i simplicitat d'elaboració. En quant a la reproduïbilitat dels resultats, en els casos de la utilització de sondes FRET, cal dir que en l'aproximació per HLA-B27 totes les temperatures de fusió van mostrar una variació inter-assaig i intra-assaig per sota dels $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; i en el cas de l'aproximació descrita per HLA-B aquesta mateixa variació es va observar en la majoria dels casos i amb una desviació estàndard mitjana de $0,155^{\circ}\text{C}$ (només es va observar una variabilitat major en un cas concret que ja s'ha descrit i discutit profundament al capítol II). Cal destacar que un factor que pot introduir variabilitat en el cas de la metodologia de les sondes FRET, és el mètode d'extracció de DNA de la mostra; per minimitzar les variacions de temperatura de fusió, és desitjable que totes les mostres que es processin estiguin extretes utilitzant mètodes similars, per

a que no es produeixin variacions en la composició en sals que puguin afectar la reproduïbilitat de les temperatures de fusió.

En el cas de la metodologia descrita per HLA-DRB la reproduïbilitat s'ha garantit en l'anàlisi de les 200 mostres on s'ha vist que es presentaven les corbes de fusió esperades i seguint els criteris de fluorescència i cicle d'amplificació que s'havien establert en el procés de posta a punt.

VI.I.1.7 Millores futures que permeten els sistemes de tipificació desenvolupats

En referència a com analitzar els resultats en les diferents metodologies de tipificació descrites, cal dir que s'haurien de millorar per aconseguir un major grau d'automatització. Per exemple nosaltres hem fet l'assignació manual del codi en 0 i 1 del resultat de temperatura de fusió, i això ho hauria de poder fer el mateix software d'anàlisi de combinacions per tal de possibilitar la implantació del sistema en laboratoris de tipificació HLA.

Ara bé, d'altra banda, una de les principals millores que permeten tots els sistemes descrits és que es poden actualitzar fàcilment en funció del nombre d'alels que van sortint, mitjançant l'addició de sondes o de reaccions d'amplificació. Alhora un fet important a tenir en compte és que nosaltres hem posat a punt la tècnica en un termociclador que només permetia fer multiplex amb dues sondes FRET. Amb els nous termocicladors que permeten fins a tres sondes FRET es pot disminuir el nombre de tubs a utilitzar o augmentar la resolució a obtenir, introduint una segona sonda específica d'HLA B en cada tub. Alhora hi ha termocicladors que permeten amplificacions amb multiplex de sondes Taqman, i simultàniament poden processar sondes FRET. També cal dir que els fluorocroms que nosaltres hem utilitzat, teòricament han de ser substituïbles per altres sense afectar la tècnica sempre i quan es llegeixin en canals diferents (això hauria de ser vàlid tant pels LC-Red utilitzats com pel FAM-VIC-TET).

VI.I.1.8 Cost comparatiu de la tècnica

Tot i que la tècnica avui en dia pugui considerar-se relativament cara (les sondes oligonucleotídiques marcades amb fluorocrom actualment tenen un preu alt), cal tenir en compte que l'escalatge de la producció comercial hauria de permetre una rebaixa substancial dels costos de producció. Alhora, cal destacar que amb aquestes tècniques

desapareix la necessitat d'utilitzar gels d'agarosa, fonts i cubetes d'electroforesi, bromur d'etidi, tires d'hibridació o altres sistemes d'hibridació per a la SSO. Per tant s'ha de valorar el preu en funció de les feines que redueix. Tot i això, no s'ha d'oblidar en el punt en que estan aquests assajos, que són d'elaboració pròpia i surten lleugerament més cars que no pas si fossin comercials. En aquest sentit també cal remarcar que el sistema de la Light Cycler utilitza capil·lars que són més cars que els tubs de plàstic, però que en la nova versió del termociclador per a més capacitat (LC480) aquesta limitació ja s'ha eliminat i, per tant, es pot reduir encara més el cost de l'assaig.

VI.I.1.9 Possibilitats d'automatització

Les possibilitats d'automatització que presenta la tècnica de la PCR a temps real són molt elevades, ja que existeixen en el mercat robots que extreuen el DNA a partir de la sang total, fan la mescla de reacció i la dipositen en el capil·lar/tub de reacció de la màquina de PCR a temps real. Es tractaria doncs només de manipular el robot extractor-mesclador i el termociclador, alhora que després s'han d'interpretar els resultats de les amplificacions. En aquest punt cal dir que un software específic podria permetre l'automatització d'aquest darrer pas.

VI.I.2 Comparació dels dos sistemes de PCR a temps real utilitzats

Si fem una comparació de les avantatges i inconvenients de les dues metodologies de PCR a temps real utilitzades podem dir:

VI.I.2.1 En quant a la capacitat discriminativa dels polimorfismes dels diferents tipus de sondes utilitzades

Les sondes d'hibridació de tipus Light Cycler FRET han demostrat ser molt més discriminatives a l'hora d'aconseguir la identificació dels polimorfismes en relació a la disminució del nombre de sondes a utilitzar. Això és degut a que una sola sonda ens ha permès resoldre fins a 7 seqüències polimòrfiques diferents, com és el cas de la reacció nombre 8 de l'aproximació de tipificació d'HLA-B, en diferents posicions no totalment centrades de la sonda. En canvi, les sondes Taqman han mostrat que només serveixen per a una sola seqüència polimòrfica i que en alguns casos fins i tot no la discriminen

correctament (com passa en algunes seqüències similars en les que presenten una diferència d'un sol polimorfisme que no es trobi centrat a la sonda o que no generi un canvi de temperatura d'hibridació prou elevat com per no permetre la seva hibridació en la temperatura d'aparellament de la PCR). Un exemple d'aquest cas seria el d'HLA-DRB1*1401; una mostra d'aquesta tipificació donaria ampliació amb la sonda EQR en el tub 8, tot i que manté un mal aparellament amb la posició nombre 12 d'aquesta sonda (veure capítol 3).

VI.I.2.2 En quant al nombre de reaccions a realitzar per a obtenir una resolució determinada

En el cas d'HLA-B27 amb sondes de hibridació FRET, la utilització de només tres reaccions de PCR i quatre sondes específiques per a HLA-B permet classificar els 31 al·lels de B27 en 12 grups diferents. Aquesta gran divisió que s'aconsegueix amb poques reaccions es posa de manifest en la seva màxima expressió en la tipificació del locus HLA B amb sondes FRET, on mitjançant la utilització de 18 reaccions i 10 sondes específiques d'HLA-B s'aconsegueix una divisió en 300 grups dels 751 al·lels d'aquest loci. En aquest sentit la reducció de sondes i reaccions que s'aconsegueix en la tipificació de DRB és menor, ja que són necessàries 14 reaccions amb 27 sondes específiques de DRB per a la resolució dels seus 321 al·lels (nombre d'al·lels existents quan es va fer l'estudi). Alhora, aquestes dades posen de manifest la important reducció del nombre de sondes diferents a utilitzar que permeten les sondes Light Cycler FRET, ja que com hem dit i posat de manifest, es poden utilitzar per a la resolució de més d'un polimorfisme. La reducció en el nombre de sondes a utilitzar en el cas d'aquestes metodologies no és un tema trivial, ja que són un dels components més cars d'aquest tipus de reaccions d'amplificació.

VI.I.2.3 En quant a les característiques de ciclat i optimització de les reaccions

Cal dir que l'optimització de les PCRs en l'equip d'ABI és més similar a les PCRs convencionals, que tradicionalment s'han portat a terme per a la tipificació HLA. Això és degut a que les reaccions es fan en tubs de reacció de plàstic convencionals i en un bloc de termociclador també convencional. En canvi, la tecnologia de la Light Cycler (Roche, Mannheim, Alemanya) es basa en la utilització d'aire calent per a la transmissió de calor a un tub capil·lar, en aquest sentit les rampes de temperatura de

l'aparell i per tant els temps de ciclat són molt diferents. Alhora les sondes Taqman® generen fluorescència mentre es produeix l'amplímer i per tant no requereixen unes condicions de PCR diferents de les convencionals. En canvi en la genotipificació mitjançant sondes Light Cycler FRET és fonamental el pas de generació de corbes de fusió, on per a la correcta visualització dels perfils de fusió és fonamental partir d'un elevat nivell d'amplímer, sobretot de la cadena on s'hibriden les sondes. D'aquesta manera el temps d'hibridació a una temperatura determinada de les sondes amb l'amplímer (necessària per obtenir una hibridació completa de les sondes) abans de començar amb el gradient d'augment continu de la temperatura (i que fa que es perdi fluorescència) es compensa, ja que es disposa d'un nivell inicial elevat d'aquesta cadena.

VI.I.2.4 Versatilitat de les reaccions en diferents equips

Un tercer aspecte important és la reproduïbilitat en diversos equips, en el cas de les aproximacions de tipificació d'HLA-B i HLA-B27, s'han desenvolupat en un equip Light Cycler 1.0, però han pogut ésser fàcilment transferits a un equip Light Cycler 2.0 (que conté més canals de fluorescència) sense cap impediment. En el cas de la metodologia desenvolupada per DRB es va optimitzar en un termocilcador 7700 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), però no ha pogut ésser transferida a altres equips més moderns degut a que els nous (per exemple el 7900 SDS) no llegeixen el fluorocrom TET, alhora que el sistema de bloc i les rampes de temperatura són diferents.

En aquest punt cal dir que no hem provat el trasllat de les reaccions optimitzades mitjançant una metodologia de PCR a temps real a l'altre. Però només per les diferències dels equips, en quant a característiques de ciclat i fluorocroms podem dir que necessitarien una adaptació relativament llarga, per a poder-se traslladar amb garanties la metodologia a altres equips de PCR a temps real. En referència a això el nou equip de la Light Cycler 480, ha de permetre una més fàcil reunió dels dos sistemes, ja que les reaccions es fan en placa però combinades amb el sistema de corrents d'aire per a canviar la temperatura i per tant poder utilitzar rampes ràpides amb un major nombre de canals per a la fluorescència.

En conjunt podem dir que hem demostrat que les metodologies de tipificació basades en la PCR a temps real desenvolupades superen algunes de les limitacions de les tècniques actualment en ús, essent les més importants: eliminació dels passos post-

PCR, disminució del nombre de tubs a realitzar i de nombre de sondes a hibridar, reduït nombre d'ambigüitats heterozigotes de tipificació mantenint el nivell en una baixa-mitja resolució, i considerable disminució de temps d'elaboració i esforç tècnic.

Per tot això creiem que la PCR a temps real amb sondes d'hibridació de tipus Light Cycler FRET pot ser una bona alternativa per a la tipificació dels loci HLA en general que es realitza en els estudis previs als trasplantaments d'òrgans.

VI.II Millores en les metodologies d'anàlisi de la funcionalitat de les molècules HLA

VI.II.1 Producció de tetràmers de DRB3

En primer lloc cal dir que el present treball demostra que els tetràmers dels altres loci DRB no DRB1 poden ser produïts mitjançant el procediment habitual d'elaboració de tetràmers de classe II descrit per [Novak, et al., 1999] que es basa en la síntesi de les cadenes α i β de DR en cèl·lules S2 de *Drosophila melanogaster*. Les molècules de DRB3*0101 i DRB3*0202 que hem obtingut mitjançant aquest procediment són completament funcionals i els nivells de producció són comparables als que s'obtenen per a altres al·lels de DRB1. Un dels grans avantatges de la utilització de tetràmers dels altres loci DRB no DRB1 és que poden ésser utilitzats en individus que no comparteixen la mateixa tipificació DRB1, però que pertanyen al mateix haplotip en que es presenta el locus DRB3. Així, en concret, aquests tetràmers poden ser utilitzats tant en individus DRB1*03, 11, 12, 13 com 14, prèvia tipificació per DRB3. Alhora la tipificació del loci DRB3 és molt més senzilla degut a que el polimorfisme d'aquest locus és molt més restringit (43 al·lels) que el de DRB1 (429). D'altra banda s'ha de tenir en compte que els al·lels DRB3*0101 i DRB3*0202 són els més freqüents, amb força diferència respecte a DRB3*03 que es presenta en el context de l'haplotip de DRB1*1302 [Sintasath, et al., 1999]. Així aquestes proteïnes constitueixen unes eines que poden ser utilitzades per a l'anàlisi de l'especificitat de les limfòcits T CD4 + en un espectre més ampli d'individus, amb finalitats ben diverses, fent possible que no siguin reactius individualment específics i per tant no s'hagin de sintetitzar tants tetràmers diferents.

VI.II.2 Nivells de producció

En quant a la quantitat de tetràmer DRB3 produït utilitzant cèl·lules S2 de *Drosophila melanogaster*, en un sistema en que el gen està baix el mateix promotor que les altres cadenes de DRB1 que s'han utilitzat per a la producció de tetràmers, hem vist que és comparable a l'obtingut en les transfectants de DRB1*03. En aquest punt cal dir que a part del nivell de DR recombinant que expressin les cèl·lules, també podria ser un punt crític en referència als nivells de rendiment i afinitat de l'anticòs utilitzat en la columna de purificació. La utilització en la purificació d'anticossos contra la cremallera de leucines com el 2H11 [Chang, et al., 1994] pot ser una alternativa per augmentar el rendiment, però cal dir que utilitzar un anti-DR com L243 dóna una informació extra de que el que s'està produint té una configuració similar a les molècules natives de DR, i per tant segurament serà funcional. Aquesta informació es perdria utilitzant l'anticòs contra les leucines. D'altra banda cal tenir en compte que les cèl·lules S2 no són sistemes altament eficients de producció pel que fa al rendiment, com ho podrien ser els llevats, tot i que fins al moment encara no hi ha aproximacions descrites de producció de tetràmers en llevats, però sí de producció en *Escherichia coli* [Cameron, et al., 2002]. Cal dir però que en la literatura hi ha referències que consideren que la co-transfecció de les cadenes alfa i beta (codificades en un baculovirus) amb la xaperona calreticulina per fer augmentar l'expressió de DR4 fins als 50 mg per litre de sobrenedant de cèl·lules d'insecte Hi5 (*Trichoplusia ni*) [Fourneau, et al., 2004]. Ara bé, la nostra experiència amb cèl·lules de *Drosophila melanogaster*, on les cadenes alfa i beta del DR estan co-expresades amb la calreticulina dóna nivells similars als que donen altres DRB1 en les mateixes cèl·lules sense la co-expressió de calreticulina com és el cas de DRB1*03. Cal puntualitzar que els nostres nivells d'expressió provenen del creixement del *bulk* de transfecció, segurament s'obtidran nivells més grans en referència a les clones que hem obtingut.

VI.II.3 Resposta de limfòcits T CD 4+ en el context de DRB3

En el present treball s'ha demostrat l'existència de limfòcits T CD4 + capaços de reconèixer un pèptid presentat en el context de DRB3. Tot i que aquesta demostració ja s'havia assolit en estudis anteriors d'altres grups [Irle, et al., 1988], les evidències eren indirectes ja que es produïen clones T CD4+ contra el toxoide tetànic i s'analitzava

quina era la seva restricció per DR, observant que algunes estaven restringides per DR52 (nom inicial de DRB3 en serologia). Amb aquesta metodologia no s'havia identificat si era una restricció en referència a DRB3*0101 o DRB3*0202 ja que s'analitzava només restricció per DR52. En el nostre treball hem anat més enllà, demostrant que hi ha pèptids antigènics en la toxina tetànica restringits tant per DRB3*0101 com per DRB3*0202, però que són tres en el cas del primer al·lel i només un en el cas del segon. Alhora hem produït clones T CD4+ específiques per dos dels pèptids antigènics de DRB3*0101 i hem valorat la presència numèrica en un individu 1 mes post vacunació d'aquestes cèl·lules, que ha resultat ser de la mateixa magnitud que per als altres al·lells de DRB1.

Altres estudis de la literatura també havien descrit que podrien ser presentats i reconeguts pèptids en el context de DRB3: per exemple s'havia demostrat el seu paper en la resposta T de les al·lèrgies en experiments en que utilitzen línies transfectades amb els diferents DRB1-DRB3. Observaven que per l'antigen *Dermatophagoides* spp. [O'Hehir, et al., 1990] es donava proliferació en el context de presentació via DRw52b (DRB3*0202). Però en cap cas mai s'havien detectat limfòcits T CD4+ específics per un antigen concret en el context de DRB3 utilitzant tetràmers de classe II. Per tant mai s'havia tingut evidència directa de la presentació-restricció per DRB3, alhora que no s'havien detectat amb aquesta metodologia els pèptids antigènics concrets com s'ha fet en aquest estudi.

VI.II.4 Diversitat en el motius d'unió DRB3 respecte als DRB1 del seu haplotip associat

En diferents poblacions americanes, s'ha estudiat la distribució de haplotips DRB1-DRB3 i s'ha vist que els al·lells DRB3 que es troben varien força segons l'al·lel DRB1 present. Concretament, en caucàsics s'ha vist que l'al·lel DRB1*1301 està associat tant a DRB3*0101 (63%) com a DRB3*0202 (37%) [Sintasath, et al., 1999], mentre que l'al·lel DRB1*0301 està associat tant amb l'al·lel DRB3*0101 (83%) com DRB3*0202 (16%) i DRB3*0301 (0,8%) [Tang, et al., 2002]. Els estudis d'associació de DRB1*1101 en població caucàsica han demostrat que en un 97,6% dels casos es presenta conjuntament amb DRB3*0202 [Tang, et al., 2000]. D'altra banda, en referència a DRB1*14 en caucàsics s'ha revelat una associació del 100% entre els al·lells DRB1*1401 i DRB3*0202, alhora que entre DRB1*1402 i DRB3*0101 també del 100% [Gans, et al., 2002]. En quant

a DRB1*12 no s'han fet estudis per conèixer la distribució dels haplotips DRB1*12-DRB3, però semblen associats tant a DRB3*0101 com DRB3*0202. Cal dir que les mostres que nosaltres hem tipificat, segueixen les associacions haplotípiques descrites: totes les mostres DRB3*0202 eren DRB1*1101 i tres de les mostres DRB3*0101 eren DRB1*1301.

VI.II.4.1 DRB1*1101-DRB3*0202

Si ens situen en el context de les associacions haplotípiques descrites, cal considerar com a més rellevant la comparació dels motius d'unió de DRB3*0202 i DRB1*1101. Aquesta comparació ens pot servir per a poder clarificar la raó de les associacions haplotípiques o si més no intentar destacar el paper del loci DRB3 en aquest context. En la figura 52 es representa el motiu d'unió a pèptids dels al·lels DRB1*1101 i DRB3*0202: en posició 6 de DRB3*0202 hem observat que s'hi poden unir aminoàcids hidrofòbics, tot i que no estava descrit anteriorment. Aquesta observació suposa una diferència que hem afegit a la figura en color vermell. A primer cop d'ull si bé ja s'observa que són prou diferents els aminoàcids ubicats en les posicions d'ancoratge de DRB1*1101 i DRB3*0202, es destaquen les posicions P4, P6 i P9 com a les més divergents.

Com a conseqüència de la diferència en els residus d'ancoratge dels pèptids i dels aminoàcids que aquests poden unir, podem suposar que la funció de DRB3*0202 en el context d'aquest haplotip seria la de facilitar la presentació de pèptids que en absència d'aquest locus extra no serien presentats per DRB1*1101. En aquest sentit els experiments fets de quantificació de precursors T CD4+ específics de la proteïna de la matriu del virus influenza A (H1N1) han mostrat que per als pèptids presentats en context DRB3 MP42 i MP43 existeix un precursor entre 18.000 limfòcits T CD4+, mentre que el valor més elevat per un pèptid de DRB1*1101 és d'1 precursor entre 68.000 limfòcits T CD4+. Això representa unes 3,7 vegades més de precursors per al locus DRB3 que no pas pel DRB1. Aquesta diferència de magnitud també ens fa pensar que el locus DRB3 en el context de DRB1*1101 es presenta per a suplir una manca de funció augmentant els pèptids possibles a presentar (suplint un suposat motiu de unió a DRB1*1101 poc freqüent).

	P1				P4					P6		P9		
	β85	β86	β89	β90	β13	β70	β71	β74	β78	β11	β13	β9	β58	β58
DRB3*0202	V	G	F	T	S	Q	K	Q	Y	L	S	E	D	A
Aminoàcids dels pèptids que uneixen	Y/F/I/L				N					A/S/P/D/E		L/V/I/S/G		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Polar					Petit/àcidic		petit/hidrofòbic		
	Y/F/I/L				N/S					A/S/P/D/E/I/L/Y		L/V/I/S/G/N		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Polar					Petit/àcidic /hidrofòbic		petit/hidrofòbic		
	Y/F/I/L				N/I					A/S/P/D/E/L/Y		L/V/I/S/G/N		
Hidrofòbic (aromàtic)				Polar/alifàtic					Petit/àcidic /hidrofòbic		petit/hidrofòbic			
DRB1*1101	--	V	--	--	--	D	R	A	--	S	--	--	--	E
Aminoàcids dels pèptids que uneixen	Y/F				L/V/M/A/F/Y					R/K/H		A/G/S/P		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Hidrofòbic					Bàsic		Petit		

Figura 52. Motiu d'unió de DRB3*0202 comparat amb el de DRB1*1101.

D'altra banda, encara estem en fases inicials de la quantificació de RNA missatger en cèl·lules presentadores d'antigen d'individus amb l'haplotip DRB1*1101-DRB3*0202 però sembla que és factible que hi hagi una manca d'expressió de DRB1*1101 que pugui ésser compensada amb l'expressió de DRB3*0202, que faci que es detectin més precursors per a DRB3*0202 que no pas per DRB1*1101. Cal dir que hem de repetir el nombre d'estimulacions-quantificacions de precursors en diferents individus per a poder tenir dades representatives (com a mínim de dos individus) i que estem parlant de resultats inicials. Alhora no hem pogut fer una comparativa amb el nombre de pèptids antigènics que es troben en el toxoide tetànic per als al·lels DRB3*0202 i DRB1*1101, però almenys hem pogut establir que per aquest al·lel del loci DRB3 hi ha resposta. Fet que dóna suport a que la resposta en el context de DRB3*0202 no és un fet "aïllat" ni esporàdic, sinó que ha de respondre a algun avantatge evolutiu dins dels corresponents haplotips en que es presenta.

VI.II.4.2 DRB3*0101-DRB1*1301-DRB1*0301

Amb la informació dels diferents pèptids del toxoide tetànic que són presentats per DRB3*0101 alhora que amb els descrits a la literatura [Sukati, et al., 2005], hem descrit un possible motiu d'unió per DRB3*0101 (Figura 53). Ara, si comparem aquest motiu d'unió de DRB3*0101 amb els que es troben a la literatura per DRB1*1301-DRB1*0301 veiem que les majors diferències es troben sobretot a nivell de la posició P4 de DRB1*1301, i en menor grau s'observa diversitat a P1, P6 i P9, tal i com passava en el cas de DRB3*0202 i DRB1*1101. En canvi, si comparem els motius d'unió de DRB1*0301

i DRB3*0101 són força similars, presentant una divergència mínima a nivell dels residus P1, P6 i P9.

	P1				P4					P6		P9		
	β85	β86	β89	β90	β13	β70	β71	β74	β78	β11	β13	β9	β57	β58
DRB3*0101	V	G	F	T	S	Q	K	R	Y	R	S	E	L	A
	Y/F/I/L				I/D					I/N/D		T/I		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Hidrofòbic/acidic					Hidrofòbic/acidic		Hidrofòbic		
DRB1*1301	--	V	--	--	--	D	E	A	--	S	--	--	D	--
Aminoàcids dels pèptids que uneixen	I/F/V				Y/W/L/V/A/M *					R/K *		Y/F/A/S/T *		
	Hidrofòbic (alifàtic)				Hidrofòbic *					Bàsic *		Petit/Hidrofòbic *		
DRB1*0301	--	V	--	--	--	--	--	--	--	S	--	--	--	--
Aminoàcids dels pèptids que uneixen	I/FV/M/L				D					R/K/E/Q/N		Y/L/F		
	Hidrofòbic (alifàtic)				Acidic					Bàsic/		Hidrofòbic		

Figura 53. Comparació dels motius d'unió DRB1*03-13/DRB3*0101. * Indica que el motiu prové de la seqüenciació de pèptids de l'al·lel 1302 que comparteix les mateixes posicions indicades amb * en la cadena B que 1301.

Degut a que en aquests haplotips de DRB1 es pot presentar tant DRB3*0101 com DRB3*0202 per treure conclusions del paper del loci DRB3 cal comparar també els motius d'unió de DRB3*0202 amb els de DRB1*1301 i DRB1*0301. Observem en aquest cas una major divergència de DRB3*0202 en relació a DRB1*1301, sobretot en la posició P4. Les divergències d'aquest al·lel de DRB3 amb DRB1*0301 són menors, però aquest cop trobem en les quatre posicions d'unió canvis significatius d'aminoàcids a unir, principalment en P4 i P6. Podem dir doncs que la divergència en els motius d'unió a pèptids entre DRB1*0301-DRB3*0202 és major que no amb DRB3*0101.

	P1				P4					P6		P9		
	β85	β86	β89	β90	β13	β70	β71	β74	β78	β11	β13	β9	β57	β58
DRB3*0202	V	G	F	T	S	Q	K	Q	Y	L	S	E	D	A
	Y/F/I/L				N/S					A/S/P/D/E/I/L/Y		L/V/I/S/G/N		
	Hidrofòbic (aromàtic)				Polar					Petit/acidic /hidrofòbic		petit/hidrofòbic		
DRB1*1301	--	V	--	--	--	D	E	A	--	S	--	--	--	--
Aminoàcids dels pèptids que uneixen	I/F/V				Y/W/L/V/A/M *					R/K *		Y/F/A/S/T *		
	Hidrofòbic (alifàtic)				Hidrofòbic *					Bàsic *		Petit/Hidrofòbic *		
DRB1*0301	--	V	--	--	--	--	--	R	--	S	--	--	L	--
Aminoàcids dels pèptids que uneixen	I/FV/M/L				D					R/K/E/Q/N		Y/L/F		
	Hidrofòbic (alifàtic)				Acidic					Bàsic/		Hidrofòbic		

Figura 54. Comparació dels motius d'unió DRB1*03-13/DRB3*0202. * Indica que el motiu prové de la seqüenciació de pèptids de l'al·lel 1302 que comparteix les mateixes posicions indicades amb * en la cadena B que 1301.

De totes les comparacions dels motius d'unió en el context DRB1*0301/1101/1301 se'n desprèn que les diferències majors es troben al comparar els DRB1*1101 amb DRB3*0202 i DRB3*0101/0202 amb DRB1*1301. Per tant, seria en el context d'aquests haplotips concrets en que el loci DRB3 aportaria una funció extra, potser per a suplir les mancances en presentació de pèptids dels DRB1 corresponents. No seria aquest el cas de DRB1*0301 que sembla mantenir més semblances amb els diferents al·lels del loci DRB3. En referència als determinants antigènics trobats, si mirem a la base de dades SYFPEITHI [Rammensee, et al., 1999] (que serveix per a determinar els lligands per un determinat MHC) la seva "puntuació" en la unió als DRB1 dels haplotips corresponents, podem observar que tots els pèptids antigènics trobats per DRB3*0101 es poden unir a DRB1*0301 amb una puntuació elevada (elevada possibilitat d'unió). En canvi el pèptid del toxoide tetànic que s'uneix a DRB3*0202 no compleix el motiu d'unió de DRB1*0301 ni tampoc el de DRB1*1101. Indicant que la funció d'aquest locus DRB3 en el context dels seus haplotips determinats pot ser la d'augmentar el nombre d'antígens a presentar.

D'altra banda, en l'anàlisi de precursors pel toxoide tetànic 1 mes post vacunació en el context de DRB3*0101 (fet en el context d'un individu DRB1*1301), els nivells observats de precursors T CD4+ específics són d'1 limfòcit T CD4+ específic entre 100.000 cèl·lules T CD4+. Aquest nivell de precursors específics es força elevat, alhora que similar a l'observat per altres DRB en assajos similars [Novak, et al., 1999]. En tot cas la detecció d'aquestes cèl·lules ens dona evidències de la implicació de DRB3*0101 en la resposta al toxoide tetànic.

En resum podem dir que el locus DRB3 codifica per a molècules DR amb la potencialitat completa d'actuar com a presentadores centrals, especialment per a epítops que no puguin ser presentats per les "més clàssiques" DRB1, complementant-se de manera global per a garantir les possibilitats de resposta T CD4+ dels individus que presenten aquests haplotips.

VII CONCLUSIONS GENERALS

VII.I CONCLUSIONS GENERALS

Els treballs aquí descrits permeten concloure:

VII.I.1 Tipificació HLA per PCR a temps real

1. És possible resoldre el polimorfisme de la família al·lèlica HLA-B27 (a un nivell de resolució que permet discriminar les variants associades de manera diferencial amb la malaltia EA), mitjançant la tècnica de la PCR a temps real amb la utilització de sondes d'hibridació de tipologia FRET.
2. La metodologia de la PCR a temps real amb sondes d'hibridació FRET és capaç de resoldre (a nivell de mitja-baixa resolució) el polimorfisme del locus de classe I HLA-B. Alhora l'aproximació desenvolupada amb aquestes sondes fa possible la utilització de molt poques reaccions (només 18 tubs de reacció en que s'apliquen 10 sondes d'hibridació diferents) que aconsegueixen un més que acceptable nivell de resolució al·lèlica (amb només 18 tubs els al·lèls d'HLA-B es poden diferenciar en 300 grups).
3. Les sondes d'hibridació de tipologia Taqman combinades amb la PCR a temps real poden ésser utilitzades per a la tipificació del locus de classe II HLA-DRB1. Així la metodologia que s'ha establert combina diferents sondes en un mateix tub i aconsegueix reduir a 16 el nombre de reaccions a realitzar per aconseguir una tipificació de baixa-mitja resolució d'aquest locus.
4. Les diferents metodologies de tipificació basades en la PCR a temps real descrites superen moltes de les limitacions de les tècniques de tipificació basades en la PCR que s'utilitzen actualment. S'observa una disminució de nombre de passos a realitzar, durada de la tècnica i nombre de reaccions-hibridacions a desenvolupar.
5. Les sondes FRET són més eficaces que les Taqman en quant a la resolució del polimorfisme HLA, ja que són més potents a l'hora de discriminar polimorfismes d'una sola base, i també degut a que una mateixa sonda es pot

utilitzar per a la resolució de diversos polimorfismes diferents (generant fins a 7 temperatures de fusió distintives per sonda FRET).

6. El mètode de tipificació per PCR a temps real amb sondes FRET té les qualitats metodològiques necessàries per esdevenir una nova metodologia pràctica i eficient de tipificació que permeti donar una resolució acceptable dels al·lels HLA en general.

VII.I.2 Anàlisi de la funcionalitat de les molècules DRB3 utilitzant tetràmers

7. És possible generar multímers MHC-pèptid ("tetràmers") del locus DRB3 totalment funcionals (procediment descrit per Novak). De fet s'han generat tetràmers de DRB3 dels dos al·lels més comuns en la població caucàsica DRB3*0101 i DRB3*0202.
8. S'han trobat pèptids antigènics per al virus de la grip i per al toxoide tetànic que són presentats en el context de DRB3.
9. El nivell de limfòcits T CD4+ en sang perifèrica d'individus vacunats (pel virus de la grip o pel toxoide tetànic) que reconeixen antígens en el context de locus DRB3 és similar al que es troba per altres loci de DRB1, per la qual cosa DRB3 no pot considerar-se un locus DR secundari en la funció de presentació via classe II.

VIII.I.1 BIBLIOGRAFIA

- L. Abi Rached, M. F. McDermott and P. Pontarotti (1999) *The MHC big bang*, *Immunol Rev*, 167, 33.
- S. D. Adams, K. C. Barracchini, D. Chen, F. Robbins, L. Wang, P. Larsen, R. Luhm and D. F. Stroncek (2004) *Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification*, *J Transl Med*, 2, 30.
- D. Altshuler, L. D. Brooks, A. Chakravarti, F. S. Collins, M. J. Daly and P. Donnelly (2005) *A haplotype map of the human genome*, *Nature*, 437, 1299.
- C. Amadou (1999) *Evolution of the Mhc class I region: the framework hypothesis*, *Immunogenetics*, 49, 362.
- C. Amadou, R. M. Younger, S. Sims, L. H. Matthews, J. Rogers, A. Kumanovics, A. Ziegler, S. Beck and K. F. Lindahl (2003) *Co-duplication of olfactory receptor and MHC class I genes in the mouse major histocompatibility complex*, *Hum Mol Genet*, 12, 3025.
- G. Andersson, D. Larhammar, E. Widmark, B. Servenius, P. A. Peterson and L. Rask (1987) *Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DR beta genes*, *J Biol Chem*, 262, 8748.
- J. R. Arguello, A. M. Little, E. Bohan, D. Gallardo, J. O'Shea, I. A. Dodi, J. M. Goldman and J. A. Madrigal (1998a) *A high resolution HLA class I and class II matching method for bone marrow donor selection*, *Bone Marrow Transplant*, 22, 527.
- J. R. Arguello, A. M. Little, E. Bohan, J. M. Goldman, S. G. Marsh and J. A. Madrigal (1998b) *High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA)*, *Tissue Antigens*, 52, 57.
- J. R. Arguello and J. A. Madrigal (1999) *HLA typing by Reference Strand Mediated Conformation Analysis (RSCA)*, *Rev Immunogenet*, 1, 209.
- P. Atagunduz, H. Appel, W. Kuon, P. Wu, A. Thiel, P. M. Kloetzel and J. Sieper (2005) *HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis*, *Arthritis Rheum*, 52, 892.
- F. H. Bach and D. B. Amos (1967) *Hu-1: Major histocompatibility locus in man*, *Science*, 156, 1506.
- S. Bahram, M. Bresnahan, D. E. Geraghty and T. Spies (1994) *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6259.
- Y. Bang-Ce, C. Xiaohe, F. Ye, L. Songyang, Y. Bincheng and Z. Peng (2005) *Simultaneous genotyping of DRB1/3/4/5 loci by oligonucleotide microarray*, *J Mol Diagn*, 7, 592.

-
- D. Barouch, T. Friede, S. Stevanovic, L. Tussey, K. Smith, S. Rowland-Jones, V. Braud, A. McMichael and H. G. Rammensee (1995) *HLA-A2 subtypes are functionally distinct in peptide binding and presentation*, *J Exp Med*, 182, 1847.
- J. I. Bell, D. Denney, Jr., A. MacMurray, L. Foster, D. Watling and H. O. McDevitt (1987) *Molecular mapping of class II polymorphisms in the human major histocompatibility complex. I. DR beta*, *J Immunol*, 139, 562.
- J. Bidwell (1988) *DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens*, *Immunol Today*, 9, 18.
- J. L. Bidwell, E. A. Bidwell, P. T. Klouda, R. B. Goffin, B. A. Bradley and M. Brenner (1987a) *DNA-RFLP typing in the selection of related bone marrow donors*, *Bone Marrow Transplant*, 1, 413.
- J. L. Bidwell, E. A. Bidwell, G. J. Laundry, P. T. Klouda and B. A. Bradley (1987b) *Allogotypes defined by short DQ alpha and DQ beta cDNA probes correlate with and define splits of HLA-DQ serological specificities*, *Mol Immunol*, 24, 513.
- J. L. Bidwell, E. A. Bidwell, D. A. Savage, D. Middleton, P. T. Klouda and B. A. Bradley (1988) *A DNA-RFLP typing system that positively identifies serologically well-defined and ill-defined HLA-DR and DQ alleles, including DRw10*, *Transplantation*, 45, 640.
- J. L. N. Bidwell, C (2000) *Histocompatibility testing*, Imperial college Press.
- P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1987) *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*, *Nature*, 329, 506.
- P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (2005) *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*, *J Immunol*, 174, 6.
- M. A. Blanco-Gelaz, A. Lopez-Vazquez, S. Garcia-Fernandez, J. Martinez-Borra, S. Gonzalez and C. Lopez-Larrea (2001) *Genetic variability, molecular evolution, and geographic diversity of HLA-B27*, *Hum Immunol*, 62, 1042.
- M. Bland (1995) *An introduction to medical statistics*, Oxford University Press, Oxford.
- J. G. Bodmer, S. G. Marsh, E. D. Albert, W. F. Bodmer, R. E. Bontrop, D. Charron, B. Dupont, H. A. Erlich, B. Mach, W. R. Mayr and et al. (1995) *Nomenclature for factors of the HLA system, 1995*, *Vox Sang*, 69, 359.
- J. G. Bodmer, S. G. Marsh, E. D. Albert, W. F. Bodmer, B. Dupont, H. A. Erlich, B. Mach, W. R. Mayr, P. Parham, T. Sasazuki and et al. (1994) *Nomenclature for factors of the HLA system, 1994*, *Vox Sang*, 67, 412.
- G. Bonnaud, C. Aupetit, P. M. Preux, M. Cogne and M. Drouet (1999) *Optimisation of HLA-B27 testing by association of flow cytometry and DNA typing*, *Clin Rheumatol*, 18, 23.

- J. A. Borghans, J. B. Beltman and R. J. De Boer (2004) *MHC polymorphism under host-pathogen coevolution*, *Immunogenetics*, 55, 732.
- P. Bowness (2002) *HLA B27 in health and disease: a double-edged sword?*, *Rheumatology (Oxford)*, 41, 857.
- M. V. Bozon, J. C. Delgado, A. Selvakumar, O. P. Clavijo, M. Salazar, M. Ohashi, S. M. Alosco, J. Russell, N. Yu, B. Dupont and E. J. Yunis (1997) *Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods*, *Tissue Antigens*, 50, 387.
- M. V. Bozon, J. C. Delgado, D. Turbay, M. Salazar, C. B. Granja, S. M. Alosco, B. Dupont and E. J. Yunis (1996) *Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing*, *Tissue Antigens*, 47, 512.
- D. A. Brewerton, F. D. Hart, A. Nicholls, M. Caffrey, D. C. James and R. D. Sturrock (1973) *Ankylosing spondylitis and HL-A 27*, *Lancet*, 1, 904.
- J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1993) *Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1*, *Nature*, 364, 33.
- M. J. Browning, P. Krausa, A. Rowan, D. C. Bicknell, J. G. Bodmer and W. F. Bodmer (1993) *Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2842.
- M. Bunce, M. C. Barnardo and K. I. Welsh (1994a) *Improvements in HLA-C typing using sequence-specific primers (PCR-SSP) including definition of HLA-Cw9 and Cw10 and a new allele HLA-"Cw7/8v"*, *Tissue Antigens*, 44, 200.
- M. Bunce, C. M. O'Neill, M. C. Barnardo, P. Krausa, M. J. Browning, P. J. Morris and K. I. Welsh (1995) *Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)*, *Tissue Antigens*, 46, 355.
- M. Bunce and K. I. Welsh (1994b) *Rapid DNA typing for HLA-C using sequence-specific primers (PCR-SSP): identification of serological and non-serologically defined HLA-C alleles including several new alleles*, *Tissue Antigens*, 43, 7.
- L. F. Cadavid and D. I. Watkins (1997) *The duplicative nature of the MHC class I genes: an evolutionary perspective*, *Eur J Immunogenet*, 24, 313.
- T. O. Cameron, P. J. Norris, A. Patel, C. Moulon, E. S. Rosenberg, E. D. Mellins, L. R. Wedderburn and L. J. Stern (2002) *Labeling antigen-specific CD4(+) T cells with class II MHC oligomers*, *J Immunol Methods*, 268, 51.
- M. Carrington, G. W. Nelson, M. P. Martin, T. Kissner, D. Vlahov, J. J. Goedert, R. Kaslow, S. Buchbinder, K. Hoots and S. J. O'Brien (1999) *HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage*, *Science*, 283, 1748.

-
- L. F. Castro, R. F. Furlong and P. W. Holland (2004) *An antecedent of the MHC-linked genomic region in amphioxus*, *Immunogenetics*, 55, 782.
- R. Ceppellini and J. J. van Rood (1974) *The HL-A system. I. Genetics and molecular biology*, *Semin Hematol*, 11, 233.
- N. Cereb, P. Maye, S. Lee, Y. Kong and S. Y. Yang (1995) *Locus-specific amplification of HLA class I genes from genomic DNA: locus-specific sequences in the first and third introns of HLA-A, -B, and -C alleles*, *Tissue Antigens*, 45, 1.
- A. Cesbron-Gautier, P. Simon, L. Achard, S. Cury, G. Follea and J. D. Bignon (2004) *[Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities]*, *Ann Biol Clin (Paris)*, 62, 93.
- H. C. Chang, Z. Bao, Y. Yao, A. G. Tse, E. C. Goyarts, M. Madsen, E. Kawasaki, P. P. Brauer, J. C. Sacchettini, S. G. Nathenson and et al. (1994) *A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11408.
- D. F. Chen, W. Endres, S. A. Meyer and W. Stangel (1994a) *[HLA-DR typing using PCR-SSO with simultaneous hybridization of each dot blot membrane with a digoxigenin- and a biotin-marked probe]*, *Beitr Infusionsther Transfusionsmed*, 32, 261.
- D. F. Chen, W. Endres, S. A. Meyer and W. Stangel (1994b) *A polymerase chain reaction-sequence-specific oligonucleotide procedure for HLA class II typing using biotin- and digoxigenin-labeled probes simultaneously in hybridization*, *Hum Immunol*, 39, 25.
- R. M. Chicz, R. G. Urban, W. S. Lane, J. C. Gorga, L. J. Stern, D. A. Vignali and J. L. Strominger (1992) *Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size*, *Nature*, 358, 764.
- P. Chomczynski and N. Sacchi (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*, *Anal Biochem*, 162, 156.
- C. Consolandi, A. Frosini, C. Pera, G. B. Ferrara, R. Bordoni, B. Castiglioni, E. Rizzi, A. Mezzelani, L. R. Bernardi, G. De Bellis and C. Battaglia (2004) *Polymorphism analysis within the HLA-A locus by universal oligonucleotide array*, *Hum Mutat*, 24, 428.
- T. M. s. consortium (1999) *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium*, *Nature*, 401, 921.
- F. Crawford, H. Kozono, J. White, P. Marrack and J. Kappler (1998) *Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes*, *Immunity*, 8, 675.
- M. Cullen, H. Erlich, W. Klitz and M. Carrington (1995) *Molecular mapping of a recombination hotspot located in the second intron of the human TAP2 locus*, *Am J Hum Genet*, 56, 1350.

- M. Cullen, J. Noble, H. Erlich, K. Thorpe, S. Beck, W. Klitz, J. Trowsdale and M. Carrington (1997) *Characterization of recombination in the HLA class II region*, *Am J Hum Genet*, 60, 397.
- M. Cullen, S. P. Perfetto, W. Klitz, G. Nelson and M. Carrington (2002) *High-resolution patterns of meiotic recombination across the human major histocompatibility complex*, *Am J Hum Genet*, 71, 759.
- E. G. Danchin and P. Pontarotti (2004) *Towards the reconstruction of the bilaterian ancestral pre-MHC region*, *Trends Genet*, 20, 587.
- N. A. Danke and W. W. Kwok (2003) *HLA class II-restricted CD4+ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination*, *J Immunol*, 171, 3163.
- J. Dausset (1952) *Iso-leuco-anticorps*, *Acta Haematol.*, 20, :156.
- R. J. De Boer, J. A. Borghans, M. van Boven, C. Kesmir and F. J. Weissing (2004) *Heterozygote advantage fails to explain the high degree of polymorphism of the MHC*, *Immunogenetics*, 55, 725.
- S. A. Dunbar (2006) *Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection*, *Clin Chim Acta*, 363, 71.
- I. Dunham, C. A. Sargent, J. Trowsdale and R. D. Campbell (1987) *Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7237.
- T. H. Eiermann, J. Fakler and S. F. Goldmann (1992) *The incidence of DPB1 differences between serological and mixed lymphocyte culture matched unrelated individuals: implications for selection of bone marrow donors*, *Bone Marrow Transplant*, 9, 157.
- H. A. Elsner and R. Blasczyk (2004) *Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation*, *Tissue Antigens*, 64, 687.
- P. Entz, M. R. Toliat, J. Hampe, R. Valentonyte, S. Jenisch, P. Nurnberg and M. Nagy (2005) *New strategies for efficient typing of HLA class-II loci DQB1 and DRB1 by using Pyrosequencing*, *Tissue Antigens*, 65, 67.
- M. F. Flajnik and M. Kasahara (2001) *Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system*, *Immunity*, 15, 351.
- M. F. Flajnik, Y. Ohta, C. Namikawa-Yamada and M. Nonaka (1999) *Insight into the primordial MHC from studies in ectothermic vertebrates*, *Immunol Rev*, 167, 59.
- R. A. Flavell and D. A. Hafler (1999) *Autoimmunity. What is the turning point?*, *Curr Opin Immunol*, 11, 635.
- J. M. Fournau, H. Cohen and P. M. van Endert (2004) *A chaperone-assisted high yield system for the production of HLA-DR4 tetramers in insect cells*, *J Immunol Methods*, 285, 253.

-
- A. Fraile, J. Martin, M. A. Lopez-Nevot, L. Mataran and A. Nieto (1998) *HLA-B*27 subtyping by PCR-RFLP in Spanish patients with ankylosing spondylitis*, *Tissue Antigens*, 52, 492.
 - S. B. Gabriel, S. F. Schaffner, H. Nguyen, J. M. Moore, J. Roy, B. Blumenstiel, J. Higgins, M. DeFelice, A. Lochner, M. Faggart, S. N. Liu-Cordero, C. Rotimi, A. Adeyemo, R. Cooper, R. Ward, E. S. Lander, M. J. Daly and D. Altshuler (2002) *The structure of haplotype blocks in the human genome*, *Science*, 296, 2225.
 - C. P. Gans, T. F. Tang, R. Slack, J. Ng, R. J. Hartzman and C. K. Hurley (2002) *DRB1*14 diversity and DRB3 associations in four major population groups in the United States*, *Tissue Antigens*, 59, 364.
 - D. N. Garboczi, D. T. Hung and D. C. Wiley (1992) *HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in Escherichia coli and complexed with single antigenic peptides*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3429.
 - E. Gazit and R. Loewenthal (2005) *The immunogenetics of pemphigus vulgaris*, *Autoimmun Rev*, 4, 16.
 - D. E. Geraghty (1993) *Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes*, *Curr Opin Immunol*, 5, 3.
 - D. E. Geraghty, B. H. Koller, J. Pei and J. A. Hansen (1992) *Examination of four HLA class I pseudogenes. Common events in the evolution of HLA genes and pseudogenes*, *J Immunol*, 149, 1947.
 - S. Gonzalez, J. Martinez-Borra and C. Lopez-Larrea (1999) *Immunogenetics, HLA-B27 and spondyloarthropathies*, *Curr Opin Rheumatol*, 11, 257.
 - S. Gonzalez-Roces, M. V. Alvarez, S. Gonzalez, A. Dieye, H. Makni, D. G. Woodfield, L. Housan, V. Kononkov, M. C. Abbadi, N. Grunnet, E. Coto and C. Lopez-Larrea (1997) *HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis*, *Tissue Antigens*, 49, 116.
 - J. Gorski, M. J. Niven, J. A. Sachs, B. Mach, P. G. Cassell, H. Festenstein, J. Awad and G. A. Hitman (1987) *HLA-DR alpha, -DX alpha, and DR beta III gene association studies in DR3 individuals*, *Hum Immunol*, 20, 273.
 - Z. Guo, L. Hood and E. W. Petersdorf (1999) *Oligonucleotide arrays for high resolution HLA typing*, *Rev Immunogenet*, 1, 220.
 - M. G. Guttridge, C. Burr and P. T. Klouda (1994) *Identification of HLA-B35, B53, B18, B5, B78, and B17 alleles by the polymerase chain reaction using sequence-specific primers (PCR-SSP)*, *Tissue Antigens*, 44, 43.
 - S. H. Haddock, C. Quartararo, P. Cooley and D. D. Dao (2001) *Low-resolution typing of HLA-DQA1 using DNA microarray*, *Methods Mol Biol*, 170, 201.

- M. Han, Y. Q. Tan, Y. Zhang, J. Tsai, R. Vorhaben, J. R. Moraes, M. E. Moraes and P. Stastny (2003) *Multiplex single nucleotide extension: a robust and high throughput method for HLA-A locus typing*, *Hum Immunol*, 64, 1111.
- P. W. Hedrick (2002) *Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci*, *Evolution Int J Org Evolution*, 56, 1902.
- R. Higuchi, C. H. von Beroldingen, G. F. Sensabaugh and H. A. Erlich (1988) *DNA typing from single hairs*, *Nature*, 332, 543.
- A. V. Hill, C. E. Allsopp, D. Kwiatkowski, N. M. Anstey, P. Twumasi, P. A. Rowe, S. Bennett, D. Brewster, A. J. McMichael and B. M. Greenwood (1991) *Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria*, *Nature*, 352, 595.
- A. V. Hill, C. E. Allsopp, D. Kwiatkowski, T. E. Taylor, S. N. Yates, N. M. Anstey, J. J. Wirima, D. R. Brewster, A. J. McMichael, M. E. Molyneux and et al. (1992a) *Extensive genetic diversity in the HLA class II region of Africans, with a focally predominant allele, DRB1*1304*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2277.
- A. V. Hill, J. Elvin, A. C. Willis, M. Aidoo, C. E. Allsopp, F. M. Gotch, X. M. Gao, M. Takiguchi, B. M. Greenwood, A. R. Townsend and et al. (1992b) *Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria*, *Nature*, 360, 434.
- B. F. Hirschorn K, Kolodny R L, Firschen I L (1963) *Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro*, *Science*, 1185.
- R. Horton, L. Wilming, V. Rand, R. C. Lovering, E. A. Bruford, V. K. Khodiyar, M. J. Lush, S. Povey, C. C. Talbot, Jr., M. W. Wright, H. M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler and S. Beck (2004) *Gene map of the extended human MHC*, *Nat Rev Genet*, 5, 889.
- A. L. Hughes and M. Nei (1988) *Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection*, *Nature*, 335, 167.
- A. L. Hughes and M. Nei (1989) *Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals*, *Mol Biol Evol*, 6, 559.
- A. L. Hughes and M. Yeager (1998) *Natural selection and the evolutionary history of major histocompatibility complex loci*, *Front Biosci*, 3, d509.
- P. Hurt, L. Walter, R. Sudbrak, S. Klages, I. Muller, T. Shiina, H. Inoko, H. Lehrach, E. Gunther, R. Reinhardt and H. Himmelbauer (2004) *The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex*, *Genome Res*, 14, 631.
- T. V. Hviid, H. O. Madsen and N. Morling (1992) *HLA-DPB1 typing with polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique in Danes*, *Tissue Antigens*, 40, 140.
- K. Imabayashi, Y. Yamamoto, S. Inagaki, Y. Doi, K. Yosimoto, S. Miyaishi and H. Ishizu (2005) *A new HLA-DRB1 genotyping method using single nucleotide polymorphism*

- (SNP) analysis with multiplex primer extension reactions and its application to mixed samples, *Acta Med Okayama*, 59, 179.
- C. Irle, D. Jaques, J. M. Tiercy, S. V. Fuggle, J. Gorski, A. Termijtelen, M. Jeannet and B. Mach (1988) *Functional polymorphism of each of the two HLA-DR beta chain loci demonstrated with antigen-specific DR3- and DRw52-restricted T cell clones*, *J Exp Med*, 167, 853.
- Y. Itoh, N. Mizuki, T. Shimada, F. Azuma, M. Itakura, K. Kashiwase, E. Kikkawa, J. K. Kulski, M. Satake and H. Inoko (2005) *High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population*, *Immunogenetics*, 57, 717.
- K. J. Jeffery, A. A. Siddiqui, M. Bunce, A. L. Lloyd, A. M. Vine, A. D. Witkover, S. Izumo, K. Usuku, K. I. Welsh, M. Osame and C. R. Bangham (2000) *The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection*, *J Immunol*, 165, 7278.
- A. J. Jeffreys, J. K. Holloway, L. Kauppi, C. A. May, R. Neumann, M. T. Slingsby and A. J. Webb (2004) *Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity*, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359, 141.
- A. J. Jeffreys, L. Kauppi and R. Neumann (2001) *Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex*, *Nat Genet*, 29, 217.
- C. J. Juan M, Martínez-Cáceres E, de la Fuente MA, and Y. J. Vives J, Gayá A: (1992) *Análisis informático de las técnicas de genotipificación de los antígenos HLA de clase II: HETERO V2.0.*, *Immunologia*, 11, 14.
- M. Kasahara (1999) *Genome dynamics of the major histocompatibility complex: insights from genome paralogy*, *Immunogenetics*, 50, 134.
- M. Kasahara, M. F. Flajnik, T. Ishibashi and T. Natori (1995) *Evolution of the major histocompatibility complex: a current overview*, *Transpl Immunol*, 3, 1.
- W. M. Kast, R. M. Brandt, J. Sidney, J. W. Drijfhout, R. T. Kubo, H. M. Grey, C. J. Melief and A. Sette (1994) *Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins*, *J Immunol*, 152, 3904.
- N. Katsanis, J. Fitzgibbon and E. M. Fisher (1996) *Paralogy mapping: identification of a region in the human MHC triplicated onto human chromosomes 1 and 9 allows the prediction and isolation of novel PBX and NOTCH loci*, *Genomics*, 35, 101.
- J. Kelley, L. Walter and J. Trowsdale (2005) *Comparative genomics of major histocompatibility complexes*, *Immunogenetics*, 56, 683.
- M. Kimura and N. Takahata (1983) *Selective constraint in protein polymorphism: study of the effectively neutral mutation model by using an improved pseudosampling method*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 1048.
- J. Klein and A. Sato (2000a) *The HLA system. First of two parts*, *N Engl J Med*, 343, 702.

- J. Klein and A. Sato (2000b) *The HLA system. Second of two parts*, *N Engl J Med*, 343, 782.
- A. Kong, D. F. Gudbjartsson, J. Sainz, G. M. Jonsdottir, S. A. Gudjonsson, B. Richardsson, S. Sigurdardottir, J. Barnard, B. Hallbeck, G. Masson, A. Shlien, S. T. Palsson, M. L. Frigge, T. E. Thorgeirsson, J. R. Gulcher and K. Stefansson (2002) *A high-resolution recombination map of the human genome*, *Nat Genet*, 31, 241.
- H. Kozono, J. White, J. Clements, P. Marrack and J. Kappler (1994) *Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides*, *Nature*, 369, 151.
- P. Krausa, M. J. Browning, J. H. Moses and J. G. Bodmer (1994) *HLA-A locus DNA typing of the 4AOH cell panel by arms PCR*, *Eur J Immunogenet*, 21, 199.
- J. K. Kulski, T. Shiina, T. Anzai, S. Kohara and H. Inoko (2002) *Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man*, *Immunol Rev*, 190, 95.
- A. Kumanovics, T. Takada and K. F. Lindahl (2003) *Genomic organization of the mammalian MHC*, *Annu Rev Immunol*, 21, 629.
- I. V. Kutyavin, I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer and J. Hedgpeth (2000) *3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures*, *Nucleic Acids Res*, 28, 655.
- S. LeibundGut-Landmann, J. M. Waldburger, M. Krawczyk, L. A. Otten, T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea and W. Reith (2004) *Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes*, *Eur J Immunol*, 34, 1513.
- M. R. Lincoln, A. Montpetit, M. Z. Cader, J. Saarela, D. A. Dymont, M. Tiislar, V. Ferretti, P. J. Tienari, A. D. Sadvnick, L. Peltonen, G. C. Ebers and T. J. Hudson (2005) *A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis*, *Nat Genet*, 37, 1108.
- C. Lopez-Larrea, S. Gonzalez and J. Martinez-Borra (1998) *The role of HLA-B27 polymorphism and molecular mimicry in spondylarthropathy*, *Mol Med Today*, 4, 540.
- D. R. Madden (1995) *The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes*, *Annu Rev Immunol*, 13, 587.
- M. Maeda, N. Murayama, H. Ishii, N. Uryu, M. Ota, K. Tsuji and H. Inoko (1989) *A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases*, *Tissue Antigens*, 34, 290.
- R. Maile, B. Wang, W. Schooler, A. Meyer, E. J. Collins and J. A. Frelinger (2001) *Antigen-specific modulation of an immune response by in vivo administration of soluble MHC class I tetramers*, *J Immunol*, 167, 3708.
- L. Malfroy, M. P. Roth, M. Carrington, N. Borot, A. Volz, A. Ziegler and H. Coppin (1997) *Heterogeneity in rates of recombination in the 6-Mb region telomeric to the human major histocompatibility complex*, *Genomics*, 43, 226.

-
- P. P. Marsh SGE, Barber LD: (2000) *The HLA Facts Book*, Academic Press, San Diego.
- N. Marziliano, E. Pelo, B. Minuti, I. Passerini, F. Torricelli and L. Da Prato (2000) *Melting temperature assay for a UGT1A gene variant in Gilbert syndrome*, *Clin Chem*, 46, 423.
- F. Mazet and S. M. Shimeld (2002) *Gene duplication and divergence in the early evolution of vertebrates*, *Curr Opin Genet Dev*, 12, 393.
- W. Mempel, H. Grosse-Wilde, E. Albert and S. Thierfelder (1973) *A typical MLC reactions in HL-A-typed related and unrelated pairs*, *Transplant Proc*, 5, 401.
- A. J. M. Michael Browning (1996) *HLA AND MHC GENES MOLECULES AND FUNCTIONS (Human Molecular Genetics)*, BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- M. M. Miretti, E. C. Walsh, X. Ke, M. Delgado, M. Griffiths, S. Hunt, J. Morrison, P. Whittaker, E. S. Lander, L. R. Cardon, D. R. Bentley, J. D. Rioux, S. Beck and P. Deloukas (2005) *A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms*, *Am J Hum Genet*, 76, 634.
- V. Monsurro, D. Nagorsen, E. Wang, M. Provenzano, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg and F. M. Marincola (2002) *Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8(+) T cells*, *J Immunol*, 168, 5933.
- Y. Morishima, Y. Kodera, N. Hirabayashi, M. Tanimoto, T. Matsuyama, K. Horibe, H. Ohta, S. Mizuno, Y. Morishita, T. Yamauchi and et al. (1995) *Low incidence of acute GVHD in patients transplanted with marrow from HLA-A,B,DR-compatible unrelated donors among Japanese*, *Bone Marrow Transplant*, 15, 235.
- A. J. Mungall, S. A. Palmer, S. K. Sims, C. A. Edwards, J. L. Ashurst, L. Wilming, M. C. Jones, R. Horton, S. E. Hunt, C. E. Scott, J. G. Gilbert, M. E. Clamp, G. Bethel, S. Milne, R. Ainscough, J. P. Almeida, K. D. Ambrose, T. D. Andrews, R. I. Ashwell, A. K. Babbage, C. L. Bagguley, J. Bailey, R. Banerjee, D. J. Barker, K. F. Barlow, K. Bates, D. M. Beare, H. Beasley, O. Beasley, C. P. Bird, S. Blakey, S. Bray-Allen, J. Brook, A. J. Brown, J. Y. Brown, D. C. Burford, W. Burrill, J. Burton, C. Carder, N. P. Carter, J. C. Chapman, S. Y. Clark, G. Clark, C. M. Clee, S. Clegg, V. Cobby, R. E. Collier, J. E. Collins, L. K. Colman, N. R. Corby, G. J. Coville, K. M. Culley, P. Dhami, J. Davies, M. Dunn, M. E. Earthrowl, A. E. Ellington, K. A. Evans, L. Faulkner, M. D. Francis, A. Frankish, J. Frankland, L. French, P. Garner, J. Garnett, M. J. Ghori, L. M. Gilby, C. J. Gillson, R. J. Glithero, D. V. Grafham, M. Grant, S. Gribble, C. Griffiths, M. Griffiths, R. Hall, K. S. Halls, S. Hammond, J. L. Harley, E. A. Hart, P. D. Heath, R. Heathcott, S. J. Holmes, P. J. Howden, K. L. Howe, G. R. Howell, E. Huckle, S. J. Humphray, M. D. Humphries, A. R. Hunt, C. M. Johnson, A. A. Joy, M. Kay, S. J. Keenan, A. M. Kimberley, A. King, G. K. Laird, C. Langford, S. Lawlor, D. A. Leongamornlert, M. Leversha, et al. (2003) *The DNA sequence and analysis of human chromosome 6*, *Nature*, 425, 805.
- G. T. Nepom (2001) *The role of the DR4 shared epitope in selection and commitment of autoreactive T cells in rheumatoid arthritis*, *Rheum Dis Clin North Am*, 27, 305.

- G. T. Nepom and W. W. Kwok (1998) *Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM, Diabetes*, 47, 1177.
- D. B. Ness and F. C. Grumet (1987) *New polymorphisms of HLA-B27 and other B locus antigens detected by RFLP using a locus-specific probe, Hum Immunol*, 18, 65.
- C. R. Newton, A. Graham, L. E. Heptinstall, S. J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. C. Smith and A. F. Markham (1989) *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS), Nucleic Acids Res*, 17, 2503.
- A. Nieto, A. Fraile, J. Vinasco and J. Martin (1997) *HLA-B*27 typing by PCR-restriction fragment length polymorphism, Tissue Antigens*, 49, 283.
- E. J. Novak, A. W. Liu, G. T. Nepom and W. W. Kwok (1999) *MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen, J Clin Invest*, 104, R63.
- R. E. O'Hehir, B. Mach, C. Berte, R. Greenlaw, J. M. Tiercy, V. Bal, R. I. Lechler, J. Trowsdale and J. R. Lamb (1990) *Direct evidence for a functional role of HLA-DRB1 and -DRB3 gene products in the recognition of Dermatophagoides spp. (house dust mite) by helper T lymphocytes, Int Immunol*, 2, 885.
- S. M. O'Herrin, J. E. Slansky, Q. Tang, M. A. Markiewicz, T. F. Gajewski, D. M. Pardoll, J. P. Schneck and J. A. Bluestone (2001) *Antigen-specific blockade of T cells in vivo using dimeric MHC peptide, J Immunol*, 167, 2555.
- S. Ohno, U. Wolf and N. B. Atkin (1968) *Evolution from fish to mammals by gene duplication, Hereditas*, 59, 169.
- O. Olerup (1990) *HLA class II typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele-specific restriction endonucleases will fail to unequivocally identify the genotypes of many homozygous and heterozygous individuals, Tissue Antigens*, 36, 83.
- O. Olerup and H. Zetterquist (1991) *HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique, Tissue Antigens*, 37, 197.
- O. Olerup and H. Zetterquist (1992) *HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation, Tissue Antigens*, 39, 225.
- G. L. Palmisano, L. Delfino, M. Fiore, A. Longo and G. B. Ferrara (2005) *Single nucleotide polymorphisms detection based on DNA microarray technology: HLA as a model, Autoimmun Rev*, 4, 510.
- P. Parham (1989) *MHC molecules. A profitable lesson in heresy, Nature*, 340, 426.
- P. Parham, D. A. Lawlor, C. E. Lomen and P. D. Ennis (1989) *Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles, J Immunol*, 142, 3937.

-
- N. Pearce (1993) *What does the odds ratio estimate in a case-control study?*, *Int J Epidemiol*, 22, 1189.
- D. Pirulli, M. Boniotto, D. Puzzer, A. Spano, A. Amoroso and S. Crovella (2000) *Flexibility of melting temperature assay for rapid detection of insertions, deletions, and single-point mutations of the AGXT gene responsible for type 1 primary hyperoxaluria*, *Clin Chem*, 46, 1842.
- P. Price, C. Witt, R. Allcock, D. Sayer, M. Garlepp, C. C. Kok, M. French, S. Mallal and F. Christiansen (1999) *The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases*, *Immunol Rev*, 167, 257.
- H. Rammensee, J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor and S. Stevanovic (1999) *SYPPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*, *Immunogenetics*, 50, 213.
- M. Ramos and J. A. Lopez de Castro (2002) *HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis*, *Tissue Antigens*, 60, 191.
- W. Reith and B. Mach (2001) *The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression*, *Annu Rev Immunol*, 19, 331.
- S. Ringquist, A. M. Alexander, W. A. Rudert, A. Styche and M. Trucco (2002) *Pyrosequence-based typing of alleles of the HLA-DQB1 gene*, *Biotechniques*, 33, 166.
- S. Ringquist, A. M. Alexander, A. Styche, C. Pecoraro, W. A. Rudert and M. Trucco (2004) *HLA class II DRB high resolution genotyping by pyrosequencing: comparison of group specific PCR and pyrosequencing primers*, *Hum Immunol*, 65, 163.
- J. Robinson, A. Malik, P. Parham, J. G. Bodmer and S. G. Marsh (2000) *IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex*, *Tissue Antigens*, 55, 280.
- J. Robinson, M. J. Waller, P. Parham, N. de Groot, R. Bontrop, L. J. Kennedy, P. Stoehr and S. G. Marsh (2003) *IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex*, *Nucleic Acids Res*, 31, 311.
- E. H. Rozemuller, A. G. Bouwens, B. E. Bast and M. G. Tilanus (1993) *Assignment of HLA-DPB alleles by computerized matching based upon sequence data*, *Hum Immunol*, 37, 207.
- A. Rudensky, P. Preston-Hurlburt, S. C. Hong, A. Barlow and C. A. Janeway, Jr. (1991) *Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules*, *Nature*, 353, 622.
- A. M. Sadler, F. Petronzelli, P. Krausa, S. G. Marsh, M. G. Guttridge, M. J. Browning and J. G. Bodmer (1994) *Low-resolution DNA typing for HLA-B using sequence-specific primers in allele- or group-specific ARMS/PCR*, *Tissue Antigens*, 44, 148.
- R. K. Saiki, T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1986) *Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes*, *Nature*, 324, 163.

- P. Santamaria, M. T. Boyce-Jacino, A. L. Lindstrom, J. J. Barbosa, A. J. Faras and S. S. Rich (1992) *HLA class II "typing": direct sequencing of DRB, DQB, and DQA genes*, *Hum Immunol*, 33, 69.
- P. Santamaria, A. L. Lindstrom, M. T. Boyce-Jacino, S. H. Myster, J. J. Barbosa, A. J. Faras and S. S. Rich (1993) *HLA class I sequence-based typing*, *Hum Immunol*, 37, 39.
- L. Schlosstein, P. I. Terasaki, R. Bluestone and C. M. Pearson (1973) *High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis*, *N Engl J Med*, 288, 704.
- M. T. Seipp, M. Erali, R. L. Wies and C. Wittwer (2005) *HLA-B27 typing: evaluation of an allele-specific PCR melting assay and two flow cytometric antigen assays*, *Cytometry B Clin Cytom*, 63, 10.
- T. Shiina, H. Inoko and J. K. Kulski (2004) *An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004*, *Tissue Antigens*, 64, 631.
- T. Shiina, G. Tamiya, A. Oka, N. Takishima, T. Yamagata, E. Kikkawa, K. Iwata, M. Tomizawa, N. Okuaki, Y. Kuwano, K. Watanabe, Y. Fukuzumi, S. Itakura, C. Sugawara, A. Ono, M. Yamazaki, H. Tashiro, A. Ando, T. Ikemura, E. Soeda, M. Kimura, S. Bahram and H. Inoko (1999) *Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13282.
- A. Sidow (1996) *Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates*, *Curr Opin Genet Dev*, 6, 715.
- V. L. Singer, T. E. Lawlor and S. Yue (1999) *Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test)*, *Mutat Res*, 439, 37.
- D. M. Sintasath, T. Tang, R. Slack, E. E. Tilley, J. Ng, R. J. Hartzman and C. K. Hurley (1999) *Relative HLA-DRB1*13 allele frequencies and DRB3 associations of unrelated individuals from five US populations*, *Hum Immunol*, 60, 1001.
- L. M. Sollid (2002) *Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder*, *Nat Rev Immunol*, 2, 647.
- A. Spurkland, I. Knutsen, G. Markussen, F. Vartdal, T. Egeland and E. Thorsby (1993) *HLA matching of unrelated bone marrow transplant pairs: direct sequencing of in vitro amplified HLA-DRB1 and -DQB1 genes using magnetic beads as solid support*, *Tissue Antigens*, 41, 155.
- C. A. Stewart, R. Horton, R. J. Allcock, J. L. Ashurst, A. M. Atrazhev, P. Coggill, I. Dunham, S. Forbes, K. Halls, J. M. Howson, S. J. Humphray, S. Hunt, A. J. Mungall, K. Osoegawa, S. Palmer, A. N. Roberts, J. Rogers, S. Sims, Y. Wang, L. G. Wilming, J. F. Elliott, P. J. de Jong, S. Sawcer, J. A. Todd, J. Trowsdale and S. Beck (2004) *Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping*, *Genome Res*, 14, 1176.
- H. Sukati, H. Bessos, R. N. Barker and S. J. Urbaniak (2005) *Characterization of the alloreactive helper T-cell response to the platelet membrane glycoprotein IIIa (integrin-beta3) in human platelet antigen-1a alloimmunized human platelet antigen-1b1b women*, *Transfusion*, 45, 1165.

-
- N. Takahata and M. Nei (1990) *Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci*, *Genetics*, 124, 967.
- N. Takahata, Y. Satta and J. Klein (1992) *Polymorphism and balancing selection at major histocompatibility complex loci*, *Genetics*, 130, 925.
- T. F. Tang, A. Y. Huang, A. Pappas, R. Slack, J. Ng, R. J. Hartzman and C. K. Hurley (2000) *Relative frequencies of DRB1*11 alleles and their DRB3 associations in five major population groups in a United States bone marrow registry*, *Hum Immunol*, 61, 820.
- T. F. Tang, J. Wang, R. Slack, Y. S. Lin, L. Li, U. Heine, J. Ng, R. J. Hartzman and C. Katovich Hurley (2002) *DRB1*03 diversity and DRB3 associations in five major population groups in the United States*, *Hum Immunol*, 63, 221.
- P. I. Terasaki and J. D. McClelland (1964) *Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins*, *Nature*, 204, 998.
- E. Thorsby (1997) *Invited anniversary review: HLA associated diseases*, *Hum Immunol*, 53, 1.
- J. M. Tiercy, C. Goumaz, B. Mach and M. Jeannet (1991) *HLA-DR oligotyping of 100 kidney transplant patients with difficult serological typing: correlation between serology and DNA typing*, *Transplant Proc*, 23, 383.
- J. P. Ting and J. Trowsdale (2002) *Genetic control of MHC class II expression*, *Cell*, 109 Suppl, S21.
- J. L. Tiwari and P. I. Terasaki (1981) *HLA-DR and disease associations*, *Prog Clin Biol Res*, 58, 151.
- J. B. Ulmer, T. M. Fu, R. R. Deck, A. Friedman, L. Guan, C. DeWitt, X. Liu, S. Wang, M. A. Liu, J. J. Donnelly and M. J. Caulfield (1998) *Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA*, *J Virol*, 72, 5648.
- N. Uryu, M. Maeda, M. Ota, K. Tsuji and H. Inoko (1990) *A simple and rapid method for HLA-DRB and -DQB typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases*, *Tissue Antigens*, 35, 20.
- J. J. van der Poel, J. Pool, E. Goulmy, M. J. Giphart and J. J. van Rood (1986) *Recognition of distinct epitopes on the HLA-A2 antigen by cytotoxic T lymphocytes*, *Hum Immunol*, 16, 247.
- S. H. van Erp, E. Egberts and R. J. Stet (1996) *Evidence for multiple distinct major histocompatibility complex class I lineages in teleostean fish*, *Eur J Immunogenet*, 23, 371.
- A. van Leeuwen, A. Termijtelen, S. Shaw and J. J. van Rood (1982) *Recognition of a polymorphic monocyte antigen in HLA*, *Nature*, 298, 565.

- F. A. Verreck, A. van de Poel, J. W. Drijfhout, R. Amons, J. E. Coligan and F. König (1996) *Natural peptides isolated from Gly86/Val86-containing variants of HLA-DR1, -DR11, -DR13, and -DR52*, *Immunogenetics*, 43, 392.
- L. F. Versluis, E. Rozemuller, S. Tonks, S. G. Marsh, A. G. Bouwens, J. G. Bodmer and M. G. Tilanus (1993) *High-resolution HLA-DPB typing based upon computerized analysis of data obtained by fluorescent sequencing of the amplified polymorphic exon 2*, *Hum Immunol*, 38, 277.
- T. U. Vogel, D. T. Evans, J. A. Urvater, D. H. O'Connor, A. L. Hughes and D. I. Watkins (1999) *Major histocompatibility complex class I genes in primates: co-evolution with pathogens*, *Immunol Rev*, 167, 327.
- A. M. Ward and A. Nikaein (1995) *Comparison of monoclonal antibodies for flow cytometric analysis of HLA-B27 antigen*, *Cytometry*, 22, 65.
- T. Watanabe, W. W. Anderson, T. Dobzhansky and O. Pavlovsky (1970) *Selection in experimental populations of Drosophila pseudoobscura with different initial frequencies of chromosomal variants*, *Genet Res*, 15, 123.
- D. I. Watkins (1995) *The evolution of major histocompatibility class I genes in primates*, *Crit Rev Immunol*, 15, 1.
- C. T. Wittwer, M. G. Herrmann, C. N. Gundry and K. S. Elenitoba-Johnson (2001) *Real-time multiplex PCR assays*, *Methods*, 25, 430.
- C. T. Wittwer, M. G. Herrmann, A. A. Moss and R. P. Rasmussen (1997) *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*, *Biotechniques*, 22, 130.
- P. Wordsworth (1991) *PCR-SSO typing in HLA-disease association studies*, *Eur J Immunogenet*, 18, 139.
- J. Q. Xiao, C. T. Li, J. M. Tan, M. H. Kang and Y. Li (2003a) *[Development of oligonucleotide arrays for HLA-DR53-associated group genotyping]*, *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 41, 225.
- J. Q. Xiao, J. M. Tan, C. T. Li, M. H. Kang, Y. H. Fang, Y. Li, J. Shen and Y. D. Ding (2003b) *[Genotyping of HLA-DRB by oligonucleotide arrays in Han populations in southern China]*, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83, 417.
- M. Yeager, S. Kumar and A. L. Hughes (1997) *Sequence convergence in the peptide-binding region of primate and rodent MHC class Ib molecules*, *Mol Biol Evol*, 14, 1035.
- R. M. Younger, C. Amadou, G. Bethel, A. Ehlers, K. F. Lindahl, S. Forbes, R. Horton, S. Milne, A. J. Mungall, J. Trowsdale, A. Volz, A. Ziegler and S. Beck (2001) *Characterization of clustered MHC-linked olfactory receptor genes in human and mouse*, *Genome Res*, 11, 519.
- I. Yunis, M. Salazar and E. J. Yunis (1991) *HLA-DR generic typing by AFLP*, *Tissue Antigens*, 38, 78.

IX APÈNDIX I - PATENTS

Agraïments

Per començar voldria agrair al Manel, el meu director de tesi, tota la confiança dipositada en mi, també tot el he pogut aprendre d'ell estant en aquesta unitat, la seva paciència i el temps que m'ha dedicat. Agrair al Dr. Ricardo Pujol l'oportunitat de fer la tesi al seu laboratori i tot el recolzament en el tema de les publicacions i patents, i al Dr. Bill Kwok li vull agrair la oportunitat de passar tres mesos al seu laboratori de Seattle i aprendre d'ells totes les tècniques referents als tetràmers.

Ara per grups:

A la gent de Can Ruti; a la Pilar li vull agrair tot el que li he preguntat i he après d'ella, correccions de la tesi incluídes i l'amistat. Al Roger, l'haver esta el meu company de laboratori dia a dia, l'amistat i les coses compartides. Als que ja no estan al laboratori 1 (que tampoc no existeix) la Lídia, el Xavi i la Patrícia, que li van donar caliu i dels que vaig aprendre moltes coses. Al Kolko el deixar-me utilitzar la seva campana (tot un honor) i que m'acompanyes en els trajectes de tornada a casa "per que no em perdés" conduint sola. Al Marco per informar-me de quins caps de setmana he de patir la Formula 1 i per tota l'ajuda amb la citometria. A tots els becaris "ratolins"; al Pastor l'haver-me acompanyat a vegades els matins en cotxe per poder trobar Can Ruti, a la Mari Carmen per les informacions tesils i diverses compartides, al Jorge que m'ha donat sang milions de cops i s'ha vacunat pel tetanus, a la Aurora la seva simpatia, i a la Raquel, la Rosa i els nouvinguts les estones de laboratori compartides. A la Mar agrair-li la seva sempre bona disposició a compartir campana i la seva alegria que fa que els dimecres ja semblin divendres (segons la seva teoria). A la Marga i la Olga, les que patit el B27 a la rutina, els hi vull agrair la seva paciència i confiança. A la Pepi, la seva ajuda els mesos que va estar treballant en mi i també la seva simpatia i bona disposició a ajudar sempre. A la Yoli la simpatia i l'ajuda per aconseguir enquadernacions, piles i tot el que sempre deman que no és poc... a la María José el baixar-me en el seu Micra i la seva ajuda, al Francesc els cables amb l'informàtica, a la Marta Vives l'ajuda burocràtica i a tots els altres que em deixi, em sap greu i gràcies!

Als d'abans de Vall d'Hebron i ara ja de Can Ruti: a l'Eduard li vull agrair les coses apreses en relació al HLA, la lectura crítica dels articles i totes les mostres que m'ha donat. A la Natàlia el poder-hi parlar de la feina que fèiem i que no entenia del tot ningú i la seva ajuda. A la Justi i l'Eva el poder utilitzar les mostres que elles

costosament tecniquen diàriament i també per la seva col·laboració. I els que ara són companys de laboratori Cristina i Albert l'ajuda en el material per pràctiques.

A la gent de l'Autònoma, a agrair a la Dra. Dolores Jaraquemada el seus comentaris sempre útils, a la Laia la seva simpatia i bona disposició a deixar-nos sempre coses i a tots els altres la seva col·laboració.

Als de Seattle, a la Laurie i l'Eddie la seva constant ajuda, i per respondre sempre a les meves preguntes i correccions lingüístiques. Al Jumbao per donar-me sempre coses a fer, al John el compartir la informació de quan portaven menjar al laboratori, i a la Michelle per ésser amb mi una nouvinguda allà i compartir la informació de quins llocs visitar. A la Kelly, el Victor, el Hughes i el Nathan per les seves bromes, estones de riure i companyia que van fer que tres mesos passessin volant.

Als de casa, al Joan per aguantar-me cada dia (o com diu ell per la paciència, el suport logístic i la companyia), a la seva família per fer-me sentir una més d'ells i a la meua per ser-hi sempre donant suport tot i la distància física.

A tots gràcies.