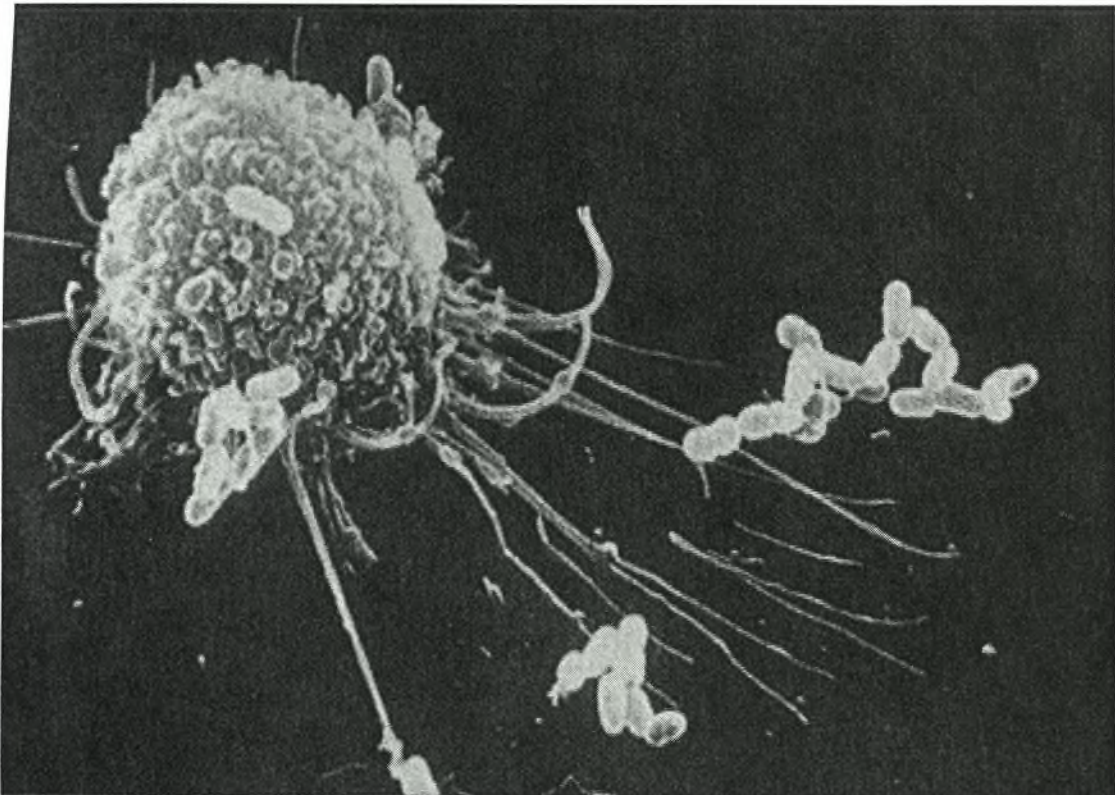


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

«Αξιολόγηση Της Μικροσφαιριδιακής Κυτταρομετρικής Τεχνολογίας Στην HLA-A*, -B*, -DRB1* Τυποποίηση Σε Σύγκριση Με Την Κλασσική Μέθοδο Γονιδιακής Τυποποίησης PCR-SSP (PCR με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών)».



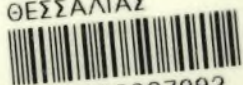
Παν. Έτος 2003-2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4299/1
Ημερ. Εισ.: 28-02-2005
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2004
ΚΟΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087993

Τριμελής Επιτροπή:

Γερμενής Αναστάσιος: Αναπληρωτής καθηγητής Ανοσολογίας-
Επιβλέπων

Κουρέτας Δημήτριος: Αναπληρωτής καθηγητής

Μαρκουλάτος Παναγιώτης : Αναπληρωτής καθηγητής

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας-
Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μέρος Α': ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ HLA

1. Εισαγωγή.....	5
2. Δομή των HLA μορίων.....	6
2.1 Δομή των HLA τάξης I μορίων.....	6
2.2 Δομή των HLA τάξης II μορίων.....	8
3. Ονοματολογία των HLA μορίων.....	9
4. Κυτταρική κατανομή και έκφραση των HLA μορίων.....	10
5. Η επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου.....	10
6. HLA και επιλογή στο θυμοαδένα.....	13
7. Αλληλεπίδραση του TcR και του συμπλόκου HLA πεπτίδιο.....	14
8. Βιολογικός ρόλος των HLA μορίων	15
8.1 Σύνδεση των HLA τάξης I και II μορίων με αντιγονικά πεπτίδια.....	16
8.2 Άμεση και έμμεση οδός παρουσίασης των HLA μορίων στη μεταμόσχευση.....	16

Μέρος Β': ΜΕΘΟΔΟΙ ΗΛΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ

1.	Εισαγωγή.....	18
2.	Βασικές τεχνικές μοριακής βιολογίας.....	19
2.1	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.....	19
2.2	Υβριδισμός-Μετουσίωση.....	19
2.3	Υβριδισμός κατά Southern (Southern blotting).....	20
2.4	Υβριδισμός κατά Northern (Northern blotting).....	21
2.5	Αποτύπωση κηλίδας (Dot blot υβριδισμός).....	21
2.6	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	21
3.	Έλεγχος Ιστοσυμβατότητας με μοριακές τεχνικές.....	22
3.1	Ανίχνευση Πολυμορφισμών Μήκους Θραύσματος από Περιοριστικό ένζυμο (RFLP).....	23
3.2	Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μετά από μεγέθυνση με PCR (Sequence Specific Oligonucleotides, PCR-SSO).....	24
3.3	PCR με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών (Sequence Specific Primers, PCR-SSP).....	24

ΜΕΡΟΣ Γ': ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΗΛΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ

1.	Μεταμόσχευση.....	25
1.1	Μεταμόσχευση νεφρού.....	25
1.2	Μεταμόσχευση παγκρέατος.....	27
1.3	Μεταμόσχευση καρδιάς	27
1.4	Μεταμόσχευση ήπατος.....	27
1.5	Μεταμόσχευση μυελού των οστών	27
2.	Συσχέτιση των HLA αντιγόνων με νοσήματα.....	28
3.	Φυλογενετική ανάλυση πληθυσμών.....	29
4.	Έλεγχος πατρότητας.....	29

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....30

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

Υλικό.....	30
Μέθοδοι.....	30

1.	Μεγέθυνση του DNA με PCR και χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών (Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Primers, PCR-SSP).....	30
1.1	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα.....	30
1.2	PCR Αντίδραση.....	31
1.3	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	33
2.	Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μετά από μεγέθυνση του DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση της μικροσφαιριδιακής κυτταρομετρικής τεχνολογίας LIFEMATCH (LIFEMATCH HLA-SSO).....	34
2.1	Αρχές της διαδικασίας-λειτουργία LIFEMATCH	34
2.2	Η διαδικασία.....	38
	Α. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα...38	
	Β. Μεγέθυνση του DNA (PCR).....38	
	Γ. Υβριδισμός.....40	
	Δ. Ανάλυση των δειγμάτων με χρήση του Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH	41
2.3	Αποτελέσματα.....	42
2.4	Περιορισμοί της διαδικασίας.....	45
2.5	Αντιμετώπιση προβλημάτων.....	46
3.	Εργαστηριακός εξοπλισμός (όργανα).....	47
4.	Αναλώσιμα υλικά.....	48
5.	Αντιδραστήρια.....	48
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	55
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μέρος Α'

Το Σύστημα HLA

1. Εισαγωγή

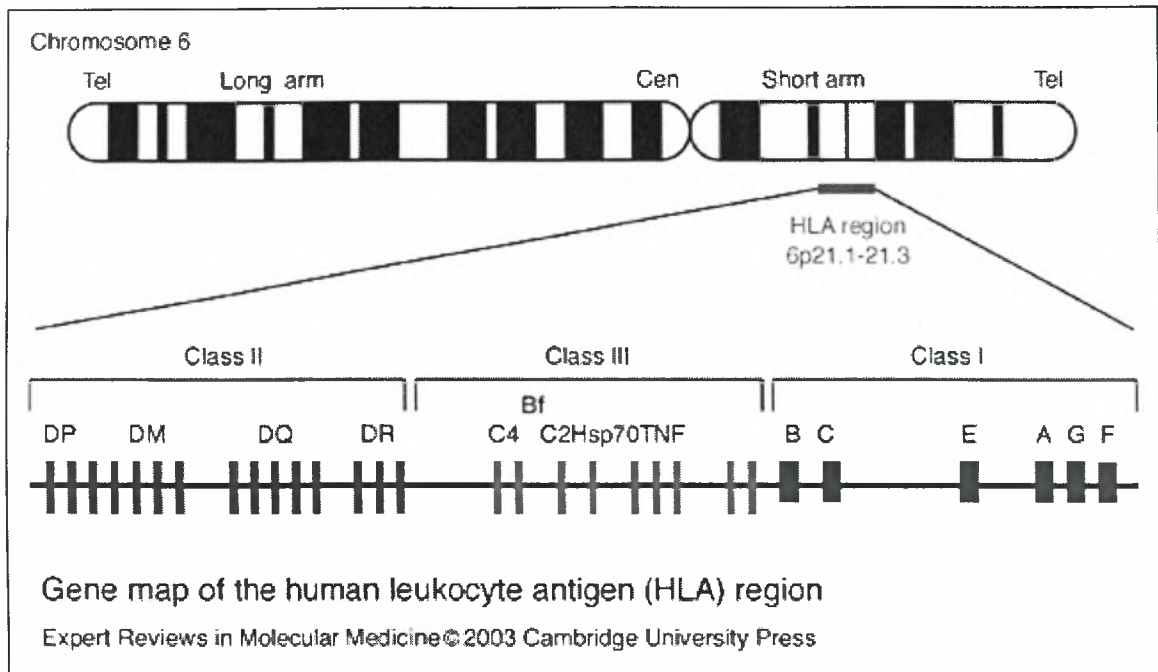
Οι γενετικοί τόποι, τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στην απόρριψη των ξένων ή των μη-αναγνωριζόμενων ιστών, σχηματίζουν μια περιοχή στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 γνωστή ως Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Ο όρος HLA (Human Leucocyte Antigens) αναφέρεται στο ανθρώπινο MHC και χρήζει ιδιαίτερης προσοχής λόγω του μεγάλου βαθμού πολυμορφισμού του και της συσχέτισής του με ασθένειες, κυρίως ανοσολογικές διαταραχές (Klein 1986).

Το σύστημα HLA κωδικοποιεί τρία είδη γλυκοπρωτεϊνών, τα μόρια τάξης I, τάξης II και τάξης III. Τα μόρια τάξης I και II αποκαλούνται HLA αντιγόνα ή αλλοαντιγόνα, ακριβώς γιατί μπορεί να αναγνωριστούν ως ξένα από το ανοσοποιητικό σύστημα του λήπτη κατά την μεταμόσχευση οργάνων ή ιστών μεταξύ ασύμβατων HLA ατόμων. Εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου και είναι μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Εμπλέκονται στην επεξεργασία και παρουσίαση των πρωτεϊνών του ίδιου του οργανισμού και ξένων πρωτεϊνών, λειτουργίες σημαντικές για τον έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης των T-κυττάρων καθώς και για την παραγωγή των αντισωμάτων από τα B-κύτταρα.

Οι γενετικοί τόποι (loci) των HLA τάξης I και II είναι οι πλέον πολυμορφικοί στο γονιδίωμα των θηλαστικών. Ο όρος πολυμορφισμός αναφέρεται στην ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού αλληλομόρφων γονιδίων (αλληλία) για κάθε γονιδιακή θέση. Ο μεγάλος βαθμός πολυμορφισμού στα γονίδια του HLA πιθανόν να διατηρείται λόγω φυσικής επιλογής, επειδή τα διάφορα αλληλόμορφα μπορεί να παρέχουν διαφορετικού βαθμού προστασία από παθογόνα λοιμογόνων νόσων (Pløegh et al. 1981).

Πολλά γονίδια μέσα στο σύστημα HLA δεν έχουν καμία σχέση με την ανοσία. Συγκεκριμένα, η γονιδιακή περιοχή των HLA τάξης III είναι ένα τμήμα μεταξύ των περιοχών των HLA τάξης I και II και περιέχει πάνω από 40 γονίδια, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν για τους παράγοντες του συμπληρώματος (C2, C4A, C4B και Bf), για τους παράγοντες νέκρωσης όγκων α και β (TNF, Tumor Necrosis Factor), για την πρωτεΐνη οξείας φάσης HSP70 αλλά και για το στεροειδές ένζυμο 21-υδροξυλάση (Forbes et al. 1999).

Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή των τεχνικών μοριακής βιολογίας επέτρεψε στους επιστήμονες να ανακαλύψουν τη γονιδιακή οργάνωση του HLA συστήματος. Ο καθιερωμένος γενετικός χάρτης για το HLA σύστημα περιλαμβάνει ένα χρωμοσωμικό τμήμα με μήκος 4×10^6 νουκλεοτίδια στην p21.3 ταινία πάνω στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (Σχήμα 1). Το ανθρώπινο MHC περιλαμβάνει 200 γονίδια, 40 από τα οποία κωδικοποιούν για λευκοκυτταρικά αντιγόνα (Klein et al. 2000).

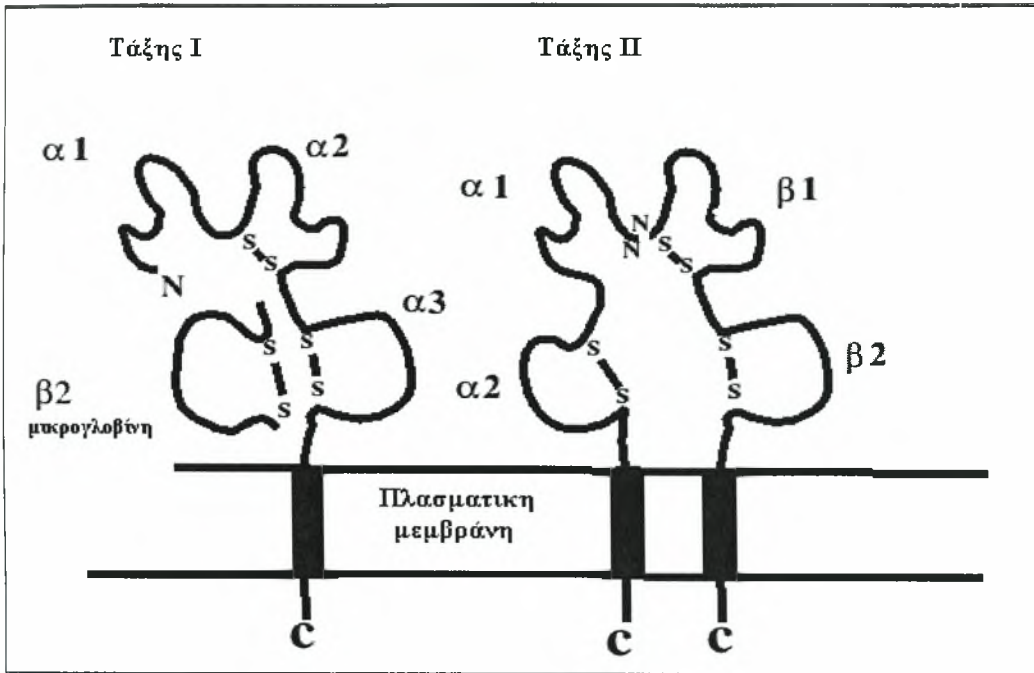


Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής HLA στο χρωμόσωμα 6 του ανθρώπου.

2. Δομή των HLA μορίων

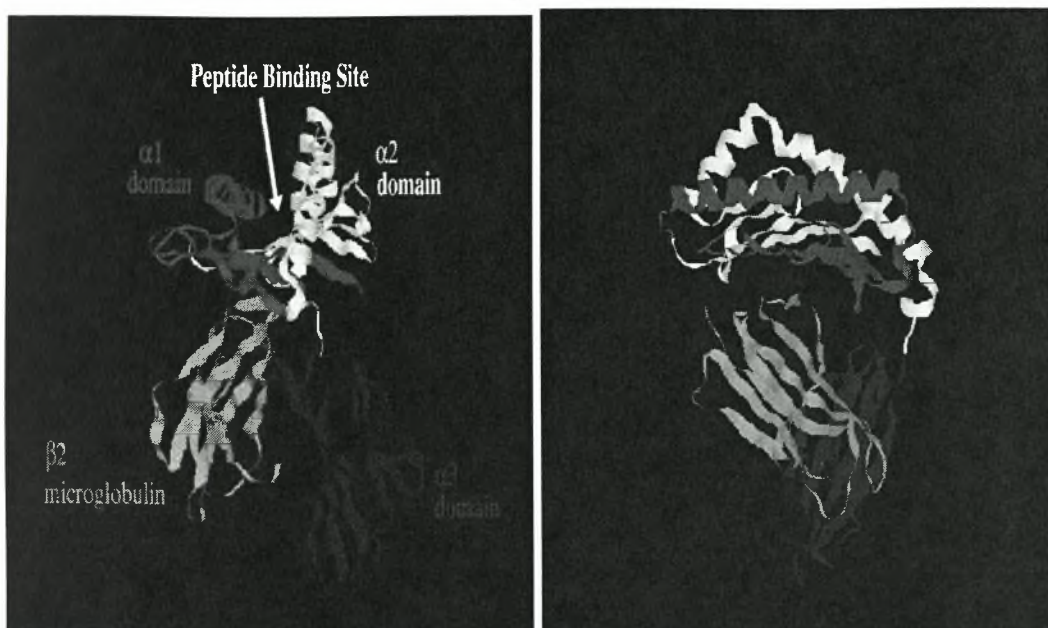
2.1 Δομή HLA τάξης I μορίων

Οι βασικές δομικές μονάδες των HLA τάξης I μορίων αποτελούνται από μια βαριά πολυπεπτιδική αλυσίδα (α αλυσίδα) των 340 αμινοξέων και από μία ελαφριά αλυσίδα (12kd), τη β_2 -μικροσφαιρίνη. Τα γονίδια τάξης I κωδικοποιούν για την α -πολυπεπτιδική αλυσίδα των τάξης I μορίων, ενώ η β -πολυπεπτιδική αλυσίδα των τάξης I μορίων κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15, το γονίδιο β_2 -μικροσφαιρίνης. Η α αλυσίδα έχει πέντε περιοχές: δύο περιοχές σύνδεσης του αντιγόνου ($\alpha 1$ και $\alpha 2$), μία περιοχή με δομή ανοσοσφαιρίνης ($\alpha 3$), μια διαμεμβρανική περιοχή και κυταροπλασματική ουρά (Σχήμα 2). Η μεγαλύτερη ποικιλομορφία στο δομικό πολυμορφισμό των HLA μορίων τάξης I εντοπίζεται στις $\alpha 1$ και $\alpha 2$ περιοχές, σε σημεία που λέγονται υπερμεταβλητές περιοχές. Η $\alpha 3$ περιοχή εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τη β_2 -μικροσφαιρίνη και μαζί και οι δύο μεγάλη ομοιότητα με τις αλληλουχίες των σταθερών περιοχών των ανοσοσφαιρινών. Συνεπώς, τα μόρια τάξης I μοιράζονται την κοινή εξελικτικά καταγωγή τους με τις ανοσοσφαιρίνες και θεωρούνται μέλη της μεγάλης οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, η οποία περιλαμβάνει ακόμη τον T-κυτταρικό υποδοχέα (TcR) και τα CD4 και CD8 μόρια προσκόλλησης (Jones 1997 and Madden 1995).



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των HLA μορίων τάξης Ι και ΙΙ.

Πρόσφατες μελέτες κρυσταλλογράφησης των HLA μορίων τάξης Ι φανέρωσαν την τρισδιάστατη δομή τους (Σχήμα 3). Οι $\alpha 1$ και $\alpha 2$ περιοχές της βαριάς αλυσίδας συνδυάζονται για να σχηματίσουν ένα στερεό οικοδόμημα όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο που προέρχεται από την επεξεργασία ενός μεγαλύτερου αντιγόνου, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Σ' αυτή τη διαμόρφωση, δύο α -έλικες σχηματίζουν τα πλευρικά τοιχώματα μιας μακριάς και βαθιάς σχισμής, ο πυθμένας της οποίας αποτελείται από μια β -πτυχωτή επιφάνεια, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας σχισμοειδούς θήκης (groove ή cleft). Εκεί συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο (antigen-binding site) για να παρουσιαστεί στο CD8⁺ T λεμφοκύτταρο. Τα εσωτερικά τοιχώματα της κοιλότητας της σχισμοειδούς θήκης δεν είναι ομαλά και φέρουν κοιλώματα (pockets ή depressions). Έξι κοιλώματα που σημειώνονται με τα γράμματα A,B,C,D,E και F έχουν αναγνωριστεί και εντοπίζονται στη συμβολή της β -πτυχωτής επιφάνειας με την α -έλικα (κοιλώματα B,C,D,E) ή μεταξύ δύο α -ελίκων (κοιλώματα A και F). Τα πεπτίδια που μπορούν να προσδεθούν είναι μικρού μεγέθους (8-11 αμινοξέα), διότι τα άκρα της σχισμοειδούς θήκης συγκλίνουν, με αποτέλεσμα η θήκη να κλείσει (Garcia et al.1998, Bjorkman et al. 1987, Rammensee et al. 1997).



Σχήμα 3: Η τρισδιάστατη δομή των HLA μορίων τάξης I και II μετά από μελέτες κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X.

Οι περισσότερες από τις πολυμορφικές θέσεις των μορίων τάξης I εντοπίζονται στα τοιχώματα και τον πυθμένα της σχισμοειδούς θήκης. Έτσι, κάθε μόριο τάξης I έχει τη δικιά του ειδικότητα για σύνδεση με αντιγονικά πεπτίδια, ειδικότητα που καθορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων στα τοιχώματα και τον πυθμένα της θήκης. Βέβαια, ο βαθμός εξειδίκευσης στη σύνδεση αντιγόνου-HLA μορίου τάξης I είναι μικρότερος σε σχέση με την αντίστοιχη ειδικότητα στη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Άρα, κάθε HLA μόριο τάξης I μπορεί να συνδεθεί μ' ένα αρκετά μεγάλο φάσμα πεπτιδίων (Rammensee 1995, Falk et al. 1991).

Υπάρχουν περί τα 20 γονίδια τάξης I στην HLA περιοχή, τρία από τα οποία, τα HLA-A, B και C κωδικοποιούν για τα κλασσικά τάξης I μόρια ή αντιγόνα μεταμόσχευσης, όπως είθισται να αποκαλούνται. Τα HLA-E,-F, και -G κωδικοποιούν επίσης για λειτουργικά μόρια, γνωστά ως μη-κλασσικά τάξης I μόρια. Στην ίδια περιοχή αναγνωρίστηκαν και 11 ψευδογονίδια, από τα οποία καλύτερα χαρακτηρισμένα είναι τα HLA-H και -J, που έχουν δομή παρόμοια με τα HLA-A αλλά είναι ανενεργά (ψευδογονίδια: γονίδια που έχουν ομόλογες δομές με άλλα γονίδια, δεν είναι όμως σε θέση να εκφραστούν) (Klein et al. 2000).

2.2 Δομή HLA τάξης II μορίων

Τα γονίδια τάξης II κωδικοποιούν για τις α και β -πολυπεπτιδικές αλυσίδες των μορίων τάξης II (Σχήμα 2). Κάθε μία από τις α και β αλυσίδες έχει τέσσερις περιοχές: την περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου ($\alpha 1$ ή $\beta 1$), την περιοχή με δομή ανοσοσφαιρίνης ($\alpha 2$ ή $\beta 2$), την διαμεμβρανική περιοχή και την κυτοπλασματική ουρά. Οι περιοχές που βρίσκονται πιο κοντά στη μεμβράνη ($\alpha 2$ και $\beta 2$) παρουσιάζουν έντονη ομολογία των αλληλουχιών τους με τις σταθερές περιοχές των ανοσοσφαιρινών και γι' αυτόν ακριβώς το λόγο, και τα HLA μόρια τάξης II

συγκαταλέγονται στη μεγάλη οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Brown et al. 1993, Jones 1997).

Όμοια με τις $\alpha 1$ και $\alpha 2$ περιοχές της βαριάς αλυσίδας των μορίων τάξης I, οι $\alpha 1$ και $\beta 1$ περιοχές των μορίων τάξης II σχηματίζουν μια σχισμή όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο (Σχήμα 3). Στα HLA μόρια τάξης II ο πολυμορφισμός εντοπίζεται στην $\alpha 1$ αλυσίδα για τα DQ και DP και στη $\beta 1$ αλυσίδα για τα DQ, DP και DR. Δηλαδή, τα HLA- DQ και -DP μόρια εμφανίζουν πολυμορφισμό και στις δύο αλυσίδες τους, ενώ στην περίπτωση των HLA- DR ο πολυμορφισμός εντοπίζεται στα τοιχώματα και τον πυθμένα της σχισμής. Τα άκρα της σχισμοειδούς θήκης δε συγκλίνουν και έτσι επιτρέπεται η πρόσδεση μεγαλύτερων πεπτιδίων (12-25 αμινοξέα) (Rienherz et al. 1999, Rammensee 1995).

Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η άποψη ότι η HLA τάξης II περιοχή περιλαμβάνει μόνο γονίδια τάξης II. Νεότερες όμως μελέτες έφεραν στο φως νέα γονίδια που εντοπίζονται στην ίδια περιοχή, μερικά από τα οποία ενέχονται στην παρουσίαση του αντιγόνου. Αυτά είναι γονίδια που κωδικοποιούν προϊόντα που παίζουν ρόλο στη μεταφορά των αντιγονικών πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο για να συναντήσουν τα HLA μόρια (Transport Associated with Antigen-Processing, TAP1 και TAP2) ή που παίρνουν μέρος στην επεξεργασία του αντιγόνου (Large Multifunctional Proteosome molecules, LMP2 και LMP7) (Klein et al. 2000).

3. Ονοματολογία των HLA μορίων

Τα αλληλία κάθε γονιδιακής θέσης καθορίζονται από το γράμμα της γονιδιακής θέσης ακολουθούμενο από μια σειρά τεσσάρων αριθμών αφού προηγηθεί αστερίσκος. Οι δύο πρώτοι αριθμοί υποδηλώνουν το αλληλίο όπως το αναγνωρίζει η ορολογική τυποποίηση και οι δύο τελευταίοι καθορίζουν το αλληλίο από την αλληλουχία των αμινοξέων του, π.χ B*2701, B*2702 κτλ. για το HLA-B*27 αντιγόνο και HLA-DRB1*0401 για το αλληλίο 0401 του γονιδίου DRB1*, το οποίο κωδικοποιεί για τη β αλυσίδα των τάξης II μορίων και ανήκει στην οικογένεια R. Η γονιδιακή θέση των HLA μορίων τάξης II έχει καθιερωθεί να συμβολίζεται με τρία γράμματα: το πρώτο (D) υποδεικνύει την τάξη, το δεύτερο (P, Q ή R) την οικογένεια και το τρίτο (A ή B) την αλυσίδα (α ή β , αντίστοιχα). Για παράδειγμα, HLA-DRB* συμβολίζονται τα γονίδια τάξης II, που ανήκουν στην οικογένεια R και κωδικοποιούν για τη β αλυσίδα. Για αντιγόνα που δεν έχουν επίσημα αναγνωριστεί, μεταξύ της γονιδιακής θέσης και του αριθμού μεσολαβεί το γράμμα 'w' (από την αγγλική λέξη 'workshop'), ενώ για άγνωστα αντιγόνα χρησιμοποιείται το γράμμα 'x' στη θέση του αριθμού (Marsh et al. 2002).

4. Κυτταρική κατανομή και έκφραση των HLA μορίων

Τα HLA τάξης I γονίδια εκφράζονται σχεδόν σε όλα τα εμπύρνηνα σωματικά κύτταρα, αν και το επίπεδο έκφρασης ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό. Επίσης, το επίπεδο έκφρασης αυξάνει κατά τη διάρκεια μιας ανοσιακής απάντησης και ιδιαίτερα παρουσία κυτοκινών, όπως ιντερλευκίνες και ιντερφερόνες. Δεδομένου του ρόλου των HLA μορίων τάξης I στην παρουσίαση ενδογενών αντιγόνων, αυξημένα επίπεδα έκφρασης αυτών συμβάλλουν στην εξόντωση του μολυσματικού ιού (So 1994).

Αντίθετα, τα γονίδια τάξης II εκφράζονται μονάχα σε κύτταρα του ανοσοποιητικού, όπως B κύτταρα, ενεργοποιημένα T κύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά και επιθηλιακά κύτταρα του θυμοαδένα. Όλα τα παραπάνω κύτταρα αποκαλούνται Αντιγονοπαρουσιαστικά (Antigen-Presenting Cells, APCs), διότι έχουν την ικανότητα να 'επεξεργάζονται' εξωγενή αντιγόνα και να τα παρουσιάζουν στα T λεμφοκύτταρα. Τα HLA μόρια τάξης II ανευρίσκονται επίσης στο αγγειακό ενδοθήλιο, στο επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα και στα νεφρικά σπειράματα. Παρουσία ιντερφερόνης- γ , επάγεται η έκφραση τάξης II μορίων και από άλλα κύτταρα, όπως ινοβλάστες κ.ά. Ακόμη, ο TNF α αυξάνει την έκφραση των τάξης II μορίων στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα και δρα συνεργατικά με την γ -INF (Begobich et al. 1992).

Γενικά, αυξημένη έκφραση των HLA μορίων τάξης I αυξάνει την τύχη των αντιγονικών πεπτιδίων να αναγνωριστούν και να 'θανατωθούν' από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, ενώ αυξημένη έκφραση των HLA μορίων τάξης II κινητοποιεί τα κύτταρα που παρουσιάζουν το αντιγονικό πεπτίδιο στα T βοηθητικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της ανοσιακής απάντησης (Dawkins et al. 1999).

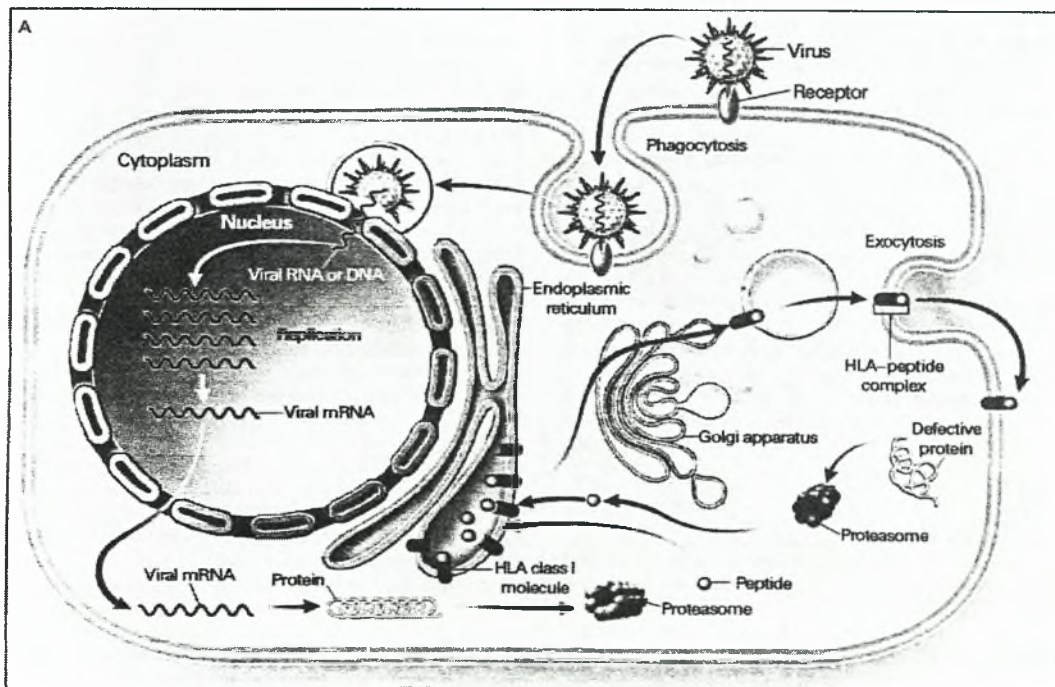
Η λειτουργία πάντως τόσο των μορίων τάξης I όσο και των τάξης II είναι να παρουσιάζουν μικρά πεπτίδια προερχόμενα από παθογόνα στα T κύτταρα, μια διαδικασία που δίνει το έναυσμα της ανοσιακής απάντησης.

5. Η Επεξεργασία και Παρουσίαση του αντιγόνου

Υπάρχουν δύο μονοπάτια επεξεργασίας και παρουσίασης των αντιγόνων: ο δρόμος των HLA μορίων τάξης I με την επεξεργασία αντιγόνων που συντίθενται μέσα στο κύτταρο (ενδογενή αντιγόνα, ιικά, νεοπλασματικά) και ο δρόμος των HLA μορίων τάξης II που αφορά στην παραλαβή διαλυτών αντιγόνων από το εξωκυττάριο περιβάλλον (εξωγενή αντιγόνα, μικροβιακά) (Parkin et al 2001). Οποιοδήποτε όμως μονοπάτι και αν ακολουθηθεί, είναι απαραίτητη η συνεργασία των αυτόλογων HLA μορίων με τον TcR για την παρουσίαση του αντιγόνου προς όλα τα T λεμφοκύτταρα. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως MHC ή HLA περιορισμός (Garboczi et al. 1999).

A) Κυτοσολικό μονοπάτι

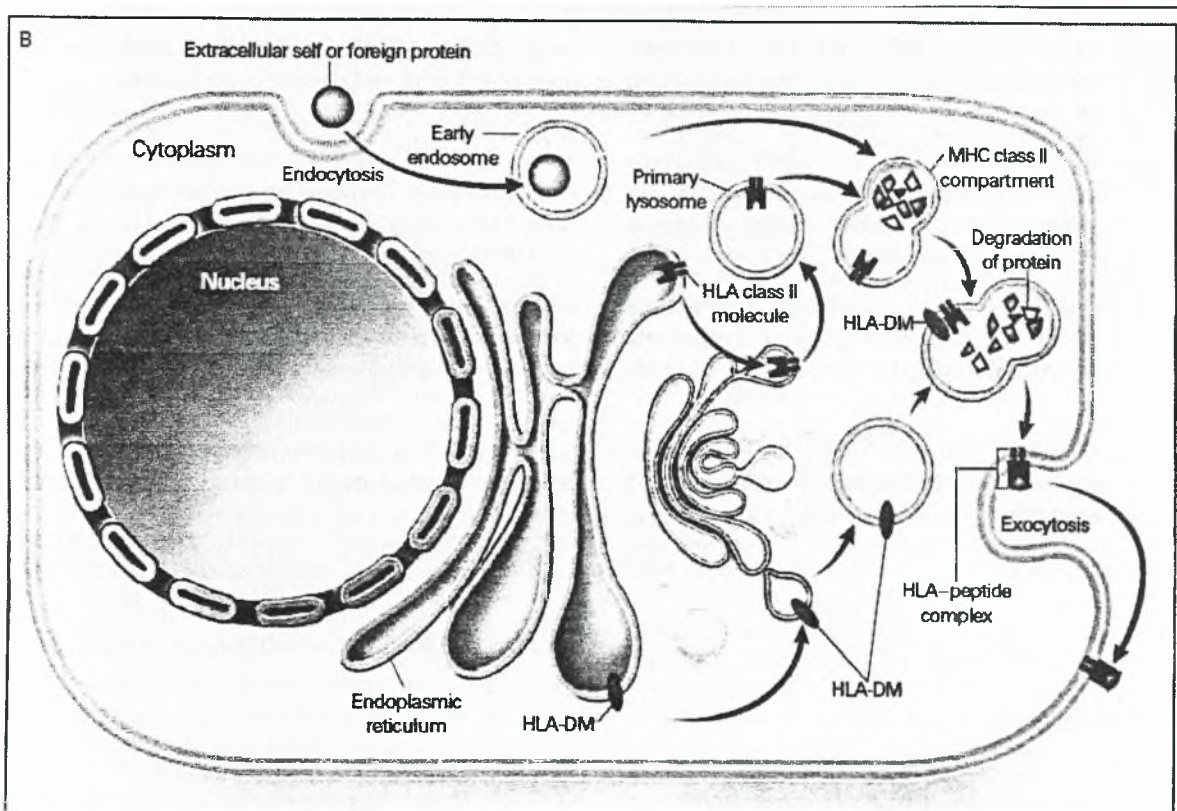
Αυτή η διαδικασία επεξεργασίας των ενδογενών αντιγόνων μέσω των HLA τάξης I συμβαίνει συνεχώς στα περισσότερα κύτταρα, διότι ελαττωματικές πρωτεΐνες συνεχώς αποικοδομούνται και αντικαθίστανται από άλλες μέσα στο κύτταρο. Στη συνέχεια αυτές 'μαρκάρονται' από το ένζυμο ουβικουιτίνη, ξεδιπλώνονται με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών συνοδών για να μπουν τελικά σε ειδικές δομές, τα πρωτεοσώματα, όπου αποικοδομούνται σε μικρότερα πεπτίδια. Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις, η αποικοδόμηση γίνεται στο κυτόπλασμα από διαλυτά ένζυμα και όχι στα πρωτεοσώματα (Pamer et al. 1998). Από την άλλη, στα πρωτεοσώματα αποικοδομούνται και πρωτεΐνες προερχόμενες από ιούς (Townsend et al. 1989). Συγκεκριμένα, όταν ένας ιός φτάσει στην κυτταρική επιφάνεια, εισέρχεται με φαγοκύτωση και το DNA του εισχωρεί στον πυρήνα του κυττάρου, όπου πολλαπλασιάζεται και μεταγράφεται (Σχήμα 4A). Έπειτα, το ιικό mRNA μεταφέρεται στο κυτόπλασμα όπου μεταφράζεται, παράγοντας ικές πρωτεΐνες. Κάποιες από αυτές αποικοδομούνται στα πρωτεοσώματα και τα πεπτίδια που προκύπτουν έχουν την ίδια τύχη με τα πεπτίδια που προήλθαν από την αποικοδόμηση των ελαττωματικών πρωτεϊνών του κυττάρου. Μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο Ε.Δ, όπου συνδέονται με τα μόρια τάξης I και τα σύμπλοκα που προκύπτουν περνώντας από το σύστημα Golgi ξεκινούν το 'ταξίδι' τους για την επιφάνεια του κυττάρου. Έχει βρεθεί ότι δύο μόρια συμμετέχουν στη μεταφορά των πεπτιδίων στο Ε.Δ, τα TAP1 και TAP2 (Ortmann et al. 1994, Suh et al. 1994). Αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα κανάλι για τη μεταφορά των πεπτιδίων κατά μήκος της μεμβράνης του Ε.Δ. Από την άλλη, οι δύο αλυσίδες α και β 2-μικροσφαιρίνης των HLA τάξης I συντίθενται χωριστά, αλλά με τη βοήθεια ειδικών μορίων, όπως της καλνεξίνης, της ταπασίνης κ.ά, συναντώνται την κατάλληλη στιγμή (Diedrich et al. 2001, Androlewicz 1999, Mayer et al. 2001). Έπειτα, η σχισμοειδής θήκη προσδένει το πεπτίδιο και το σύμπλοκο Ag-MHC I αγκυροβολείται στη μεμβράνη.



Σχήμα 4A: Το μονοπάτι μεταφοράς των ενδογενών αντιγόνων στα HLA μόρια τάξης I.

B) Ενδοκυτταρικό μονοπάτι

Τα εξωγενή αντιγόνα εισέρχονται με ενδοκύτωση ή φαγοκύτωση σε 'σάκους' προερχόμενους από τη μεμβράνη, τα ενδοσώματα. Από την άλλη, οι δύο αλυσίδες των HLA μορίων τάξης II συντίθενται όπως και πριν χωριστά και με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών συνοδών συνδυάζονται στην επιφάνεια του Ε.Δ (Σχήμα 4B). Η διαφορά με τα τάξης I όμως είναι ότι τα τάξης II μόρια συνδέονται με μια τρίτη αλυσίδα γνωστή ως Ii-αλυσίδα ή CLIP (class II-associated invariant-chain peptide) η οποία εμποδίζει τα αντιγόνα που έχουν υποστεί επεξεργασία να προσδεθούν στα μόρια τάξης II στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Έτσι, τα σύμπλοκα αυτά εσωκλείονται σε κατάλληλα 'οχήματα' και μέσω του Golgi φτάνουν στα πρωτογενή λυσοσώματα, τα οποία περιέχουν πρωτεάσες. Έπειτα, τα ενδοσώματα συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα, οι πρωτεάσες αποικοδομούν τις αντιγονικές πρωτεΐνες ενώ η Ii-αλυσίδα αποσπάται από το HLA τάξης II γεγονός που επιτρέπει τη σύνδεση των πεπτιδίων στη θήκη των HLA τάξης II και τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα πεπτιδίου-HLA εξάγονται τελικά στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα μόρια HLA-DM (μη-κλασσικά) που επίσης συντίθενται στο Ε.Δ μεταφέρονται με κατάλληλα κυστίδια και βοηθούν ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο Ag-HLA τάξης II. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Van Kaer 2001, Brocke et al. 2002).



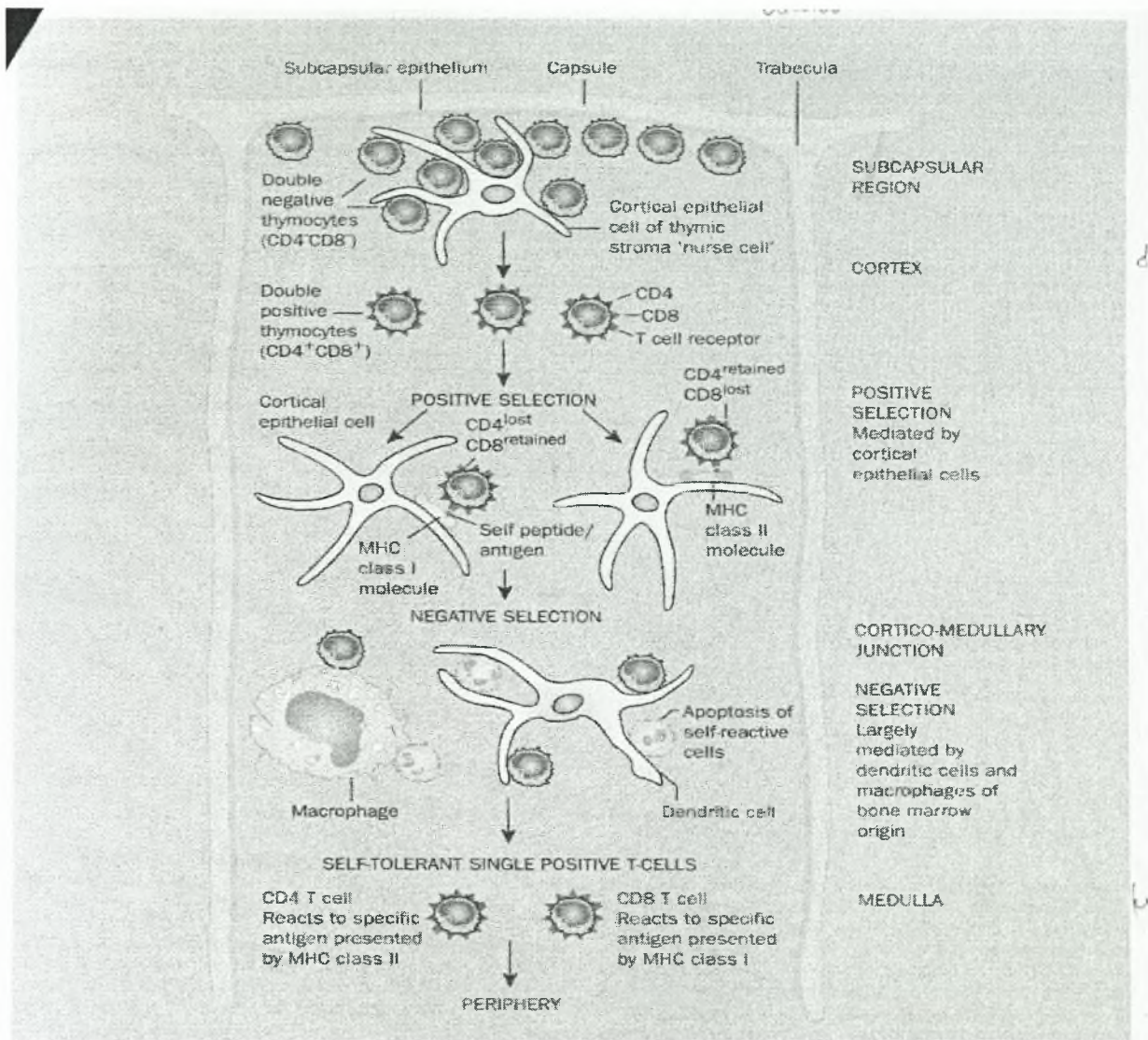
Σχήμα 4B: Το μονοπάτι μεταφοράς των εξωγενών αντιγόνων στα HLA μόρια τάξης II.

6. HLA και Επιλογή στο Θυμοαδένα

Τα πρόδρομα κύτταρα των λεμφοκυττάρων που εισέρχονται στο θυμοαδένα είναι προγραμματισμένα να πεθάνουν, εκτός αν δεχτούν τα κατάλληλα σήματα που θα τους οδηγήσουν στην περαιτέρω διαφοροποίησή τους (Sebzda et al. 1999). Τα σήματα αυτά προέρχονται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο σύμπλοκο HLA-πεπτίδιο, τον TcR και τους συνυποδοχείς CD4-CD8.

Συγκεκριμένα, καθώς το πρόδρομο κύτταρο εισέρχεται στο θυμοαδένα και κινείται προς το κέντρο, διαιρείται και διαφοροποιείται, εκφράζοντας τα γονίδια του TcR κατά τέτοιον τρόπο ώστε κάθε κλώνος να παράγει έναν υποδοχέα ειδικό για ένα συγκεκριμένο ligand. Καθώς εισέρχονται στο φλοιό του θυμοαδένα, τα περισσότερα κύτταρα δε βρίσκουν το αντίστοιχο ligand τους και οδηγούνται στην απόπτωση. Κάποια ωστόσο βρίσκουν το αντίστοιχο ligand τους και καταφέρνουν να προσδέσουν στους υποδοχείς τους τα σύμπλοκα HLA-πεπτίδιο. Αυτά τα κύτταρα υφίστανται αυτό που ονομάζουμε **θετική επιλογή** και δεν οδηγούνται σε απόπτωση (Σχήμα 5). Παρ' όλα αυτά, επειδή η αλληλεπίδραση δεν είναι ισχυρή αρκετά ώστε να 'κρατήσει' το θυμοκύτταρο στα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού, αυτό μετακινείται ακόμη βαθύτερα, στο μυελό. Εκεί, τα θυμοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα και δένδριτικά κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλες ποσότητες του συμπλόκου HLA-πεπτίδιο. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά παρέχουν συνδιεγερτικά σήματα για την ωρίμανση των θυμοκυττάρων, τα οποία μάλιστα διαφέρουν από τα αντίστοιχα που παράγονται στο φλοιό, ενώ παράλληλα εκφράζουν διαφορετικές πρωτεάσες στα λυσοσώματά τους. Όλα αυτά συνηγορούν στο ότι παράγεται μια ισχυρότερη αλληλεπίδραση ανάμεσα στον TcR υποδοχέα και το σύμπλοκο HLA-πεπτίδιο, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός σήματος που οδηγεί τα κύτταρα στην απόπτωση (**αρνητική επιλογή**) (Palmer 2003). Τα κύτταρα που θα επιζήσουν από τη θετική και την αρνητική επιλογή αφήνουν το θυμοαδένα και εισέρχονται στην περιφέρεια ως πρόδρομα T κύτταρα. Εκεί παραμένουν ζωντανά λόγω χαμηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεων με τα σύμπλοκα HLA-πεπτίδια. Κατά τη διάρκεια όμως μιας μόλυνσης, όπου οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρές, τα T κύτταρα διεγείρονται για να εκκινήσουν την ανοσιακή απόκριση του οργανισμού. Από όλα τα πρόδρομα κύτταρα που εισέρχονται στο θυμοαδένα, λιγότερα από 1% ωριμάζουν σε T κύτταρα (Starr et al. 2003).

Όταν κάποιες εκατοντάδες υποδοχέων από τους 10000 ενός και μόνο T κυττάρου δεσμευτούν με το ligand τους, τότε το T κύτταρο διαφοροποιείται είτε σε CD8+ T κυτταροτοξικό (αν το ligand είναι μόριο τάξης I) ή σε CD4+ T βοηθητικό (αν το ligand είναι μόριο τάξης II) (Werlen GN et al. 2003).



Σχήμα 5: Θετική και αρνητική επιλογή των T λεμφοκυττάρων στον θύμο.

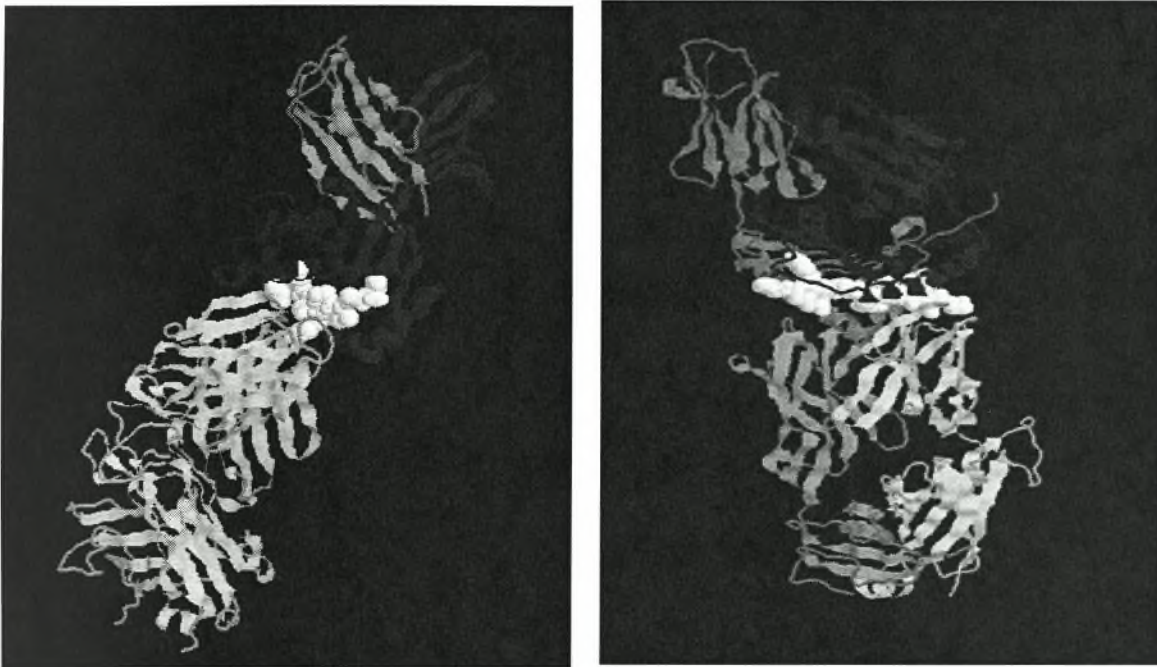
7. Αλληλεπίδραση του TcR και του συμπλόκου HLA-πεπτιδίου

Ο TcR αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, τις α και β , καθεμιά από τις οποίες διαθέτει μία σταθερή και μία μεταβλητή περιοχή. Στη μεταβλητή περιοχή, μεγαλύτερη ποικιλομορφία παρατηρείται συγκεκριμένα στις υπερμεταβλητές περιοχές CDR1, CDR2 και CDR3. Μετά από τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου, φάνηκε ότι αυτές οι περιοχές σχηματίζουν θηλιές οι οποίες εκβάλλουν ως δάχτυλα ενός χεριού για να προσελκύσουν τα σύμπλοκα HLA-πεπτιδίου με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας (Sim et al. 1996).

Τη στιγμή της αλληλεπίδρασης μεταξύ TcR και συμπλόκου HLA-πεπτιδίου, η σχισμοειδής θήκη παρουσιάζει μία επίπεδη επιφάνεια οριοθετημένη από τι α έλικες του HLA μορίου, με το πεπτίδιο στη μέση. Με αυτήν την επιφάνεια αλληλεπιδρά ο TcR, ο οποίος περιστρέφεται διαγωνίως πάνω στην επιφάνεια. Κατά αυτόν τον τρόπο, οι πιο μεταβλητές CDR3 θηλιές έρχονται σε επαφή με το πιο μεταβλητό τμήμα του πεπτιδίου, καθορίζοντας έτσι την εξειδίκευση στην αλληλεπίδραση, ενώ οι λιγότερο μεταβλητές CDR1 και CDR2 θηλιές αλληλεπιδρούν με τα συντηρημένα κατάλοιπα αμινοξέων των HLA α ελίκων, καθορίζοντας έτσι την περιστροφή και γενικότερα τη στερεοχημική δομή της αλληλεπίδρασης (Σχήμα 6) (Sette 2002).

α

β



Σχήμα 6: Τρισδιάστατη απεικόνιση της αλληλεπίδρασης του TcR με τα σύμπλοκα πεπτίδιο-HLA I (α) και HLA II (β).

8. Βιολογικός ρόλος των HLA μορίων

Ιστορικά, ο βιολογικός ρόλος των MHC μορίων διευκρινίστηκε για τα τάξης II μόρια τα οποία έχουν περιορισμένη έκφραση πάνω σε κύτταρα επιφορτισμένα με την παρουσίαση των ξένων πρωτεϊνικών αντιγόνων. Λίγο αργότερα έγινε γνωστό ότι οι ίδιες αρχές εφαρμόζονται και στην αναγνώριση από τα τάξης I ιικά αντιγόνα, με τη διαφορά ότι η παρουσίαση του αντιγόνου με ένα τάξης I μόριο απαιτεί το αντιγόνο να έχει συντεθεί μέσα στο κύτταρο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Benacerraf 1993).

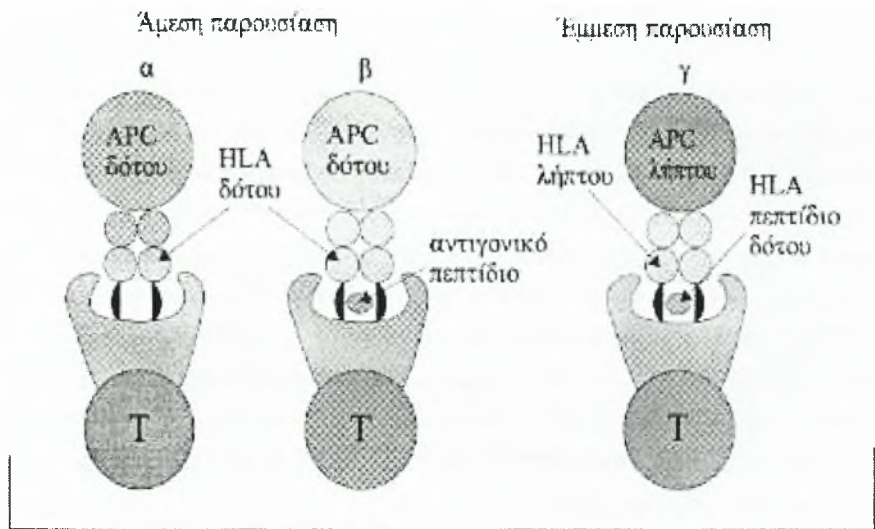
8.1 Σύνδεση των HLA τάξης I και II μορίων με αντιγονικά πεπτίδια

Οι δύο τάξεις των μορίων έχουν ιδιαίτερες αλλά ανάλογες λειτουργίες. Και τα δύο συνδέονται με επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια για την παρουσίασή τους στα T λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, τα τάξης II που εκφράζονται επιλεκτικά πάνω σε κύτταρα με την ιδιότητα να επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα για να ξεκινήσει η ανοσιακή απάντηση, είναι ικανά να αποχωρίζονται και να επανασυνδέονται με πεπτίδια, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των πεπτιδίων στα οποία εκτίθενται, ώστε να γίνει πιο αποτελεσματική η χρήση του περιορισμένου αριθμού των διαθέσιμων για παρουσίαση HLA μορίων. Αυτό αποδείχθηκε από το μεγάλο συναγωνισμό μεταξύ διαφόρων πεπτιδίων να συνδεθούν με το ίδιο τάξης II μόριο (Benacerraf 1993).

Αντίθετα, τα τάξης I μόρια που εκφράζονται πάνω σε όλα τα κύτταρα, με τα αυτόλογα και ενδογενώς συντεθειμένα πεπτίδια, αποτελούν με μία έννοια 'το δελτίο ταυτότητας' του κυττάρου που θα ελεγχθεί από το σύστημα των T λεμφοκυττάρων. Έτσι, ένα κύτταρο που φέρει ένα 'εαυτό' (self peptide) θα παραμείνει άθικτο, ενώ ένα μολυσμένο από ιό κύτταρο θα εκθέσει τα πεπτίδια του που συνέθεσε κάτω από τις οδηγίες των ιικών νουκλεϊκών οξέων με αποτέλεσμα να επιστρατεύσει τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα εναντίον του (Salter et al. 1990).

8.2 Άμεση και έμμεση οδός παρουσίασης των HLA μορίων στη μεταμόσχευση

Τα T κύτταρα αναγνωρίζουν τα ξένα HLA αντιγόνα (τα HLA αντιγόνα του δότη) με δύο ξεχωριστές οδούς, είτε άμεσα ως άθικτα μόρια ή έμμεσα ως πεπτίδια που προκύπτουν από την αντιγονική επεξεργασία (Whitelegg et al. 2004). Σύμφωνα με την **άμεση οδό παρουσίασης**, τα αντιγονοπαρουσιαστικά (APCs) κύτταρα του δότη παρουσιάζουν τα HLA αντιγόνα του δότη κατευθείαν στον TcR υποδοχέα ενός T κυττάρου του λήπτη (Σχήμα 7). Τα HLA αντιγόνα του δότη μπορεί τη στιγμή της παρουσίασής τους στον TcR του λήπτη να έχουν κενή τη σχισμοειδή τους θήκη (Σχήμα 7α) ή να επεξεργάζονται ένα πεπτίδιο (Σχήμα 7β) (Benichou et al. 1999). Από πειράματα σε επίμυες, η άμεση οδός παρουσίασης ενοχοποιείται για την επιταχυνόμενη απόρριψη των νεφρικών μοσχευμάτων σε πρόσφατα μεταμοσχευμένους επίμυες, όχι όμως και για την απόρριψη των νεφρών που 'επιβίωσαν' πάνω από 50 ημέρες (Braun et al. 1993). Για την αναγνώριση με την **έμμεση οδό**, τα αλλογενή HLA μόρια (του δότη) αφού επεξεργαστούν, μετατραπούν δηλαδή σε μικρότερα πεπτίδια από τα APCs κύτταρα του λήπτη, παρουσιάζονται από τα APCs κύτταρα του λήπτη και αναγνωρίζονται κατά τον ίδιο τρόπο με τον οποίο τα T κύτταρα αναγνωρίζουν ένα οποιοδήποτε αντιγόνο (Σχήμα 7γ) (Fangmann et al. 1992).



T κύτταρα του λήπτη

Σχήμα 7: Άμεση και έμμεση οδός παρουσίασης των HLA μορίων στη μεταμόσχευση.

Η θεωρία λοιπόν αυτή υποστηρίζει ότι ενώ φυσιολογικά άτομα δεν αντιδρούν κατά των δικών τους (αυτόλογων) ιστών, μια σφοδρή απάντηση μπορεί να δημιουργηθεί έναντι ξένων (αλλογενών) ιστών που να οδηγήσει στην απόρριψη του μοσχεύματος. Η απάντηση αυτή αποτελεί τις *in vivo* εκδηλώσεις της αλλοδραστικότητας ή αλλοαπάντησης (Liu et al. 1993). Τρεις διαφορετικές εξηγήσεις έχουν προταθεί για την ερμηνεία της σφοδρότητας της αλλοδραστικότητας: α) μία γενετική τάση που ευνοεί γονίδια T κυτταρικών υποδοχέων με ειδικότητα για τα HLA αντιγόνα., β) μεγαλύτερη πυκνότητα των αλλογενών HLA καθοριστών πάνω στην επιφάνεια των αλλογενών APCs και γ) μεγαλύτερη συχνότητα των διάφορων αλλογενών HLA καθοριστών πάνω σ' αυτά τα APCs. Βέβαια, οι παραπάνω θεωρίες ισχύουν μόνο για την άμεση οδό παρουσίασης, διότι στην περίπτωση της έμμεσης οδού, η αναγνώριση των αλλογενών HLA αντιγόνων από τους TcRs του λήπτη ακολουθεί όμοιο δρόμο με αυτόν οποιουδήποτε αντιγόνου. Συνοψίζοντας, η αδυναμία αποδοχής ενός μοσχεύματος οφείλεται στους περίπλοκους μηχανισμούς που έχει αναπτύξει ο ανθρώπινος οργανισμός για τη διάκριση του ίδιου από το μη ίδιο.

Ωστόσο, τα HLA μόρια δεν έχουν, σύμφωνα με την παραπάνω θεωρία, τα ίδια την ικανότητα να διακρίνουν μεταξύ πεπτιδίων προερχόμενων από την αποικοδόμηση ιδίων πρωτεϊνών και αυτών που προέρχονται από ξένες πρωτεΐνες. Τα περισσότερα πεπτίδια που μπορούν να απορροφηθούν από τα HLA μόρια των φυσιολογικών κυττάρων προέρχονται από την αποικοδόμηση αυτόλογων πρωτεϊνών που έχουν επεξεργαστεί από τα ίδια τα APCs ή αποκτηθεί από το άμεσο κυτταρικό περιβάλλον. Η 'ανικανότητα' αυτή του συστήματος παρουσίασης να αντεπεξέλθει στη διάκριση μεταξύ εαυτού και ξένου προϋποθέτει ότι το T κυτταρικό σύστημα διαθέτει τους δικούς του μηχανισμούς εκπαίδευσης, πώς δηλαδή να διακρίνει μεταξύ συμπλεγμάτων από αυτόλογα και ξένα πεπτίδια συνδεδεμένα με HLA μόρια ώστε να αποφεύγονται καταστροφικές αυτοάνοσες ασθένειες (Germain 1993). Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της εκμάθησης προς διάκριση λαμβάνει χώρα μέσα στο θύμο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των T κυττάρων με δύο σημαντικές διεργασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω: τη θετική επιλογή και την αρνητική επιλογή. Σαν αποτέλεσμα, τα T κύτταρα θα δείχνουν ανοχή στα συνδεδεμένα με τα αυτόλογα HLA

αυτόλογα πεπτίδια, ενώ θα απαντούν, κυρίως, στα συνδεδεμένα με τα αυτόλογα HLA ξένα πεπτίδια. Με την καθοριστική λοιπόν αυτή επίδραση των HLA μορίων, ο θύμος καταστρέφει τα επικίνδυνα αυτοαντιδρώντα κύτταρα, αγνοεί τα άχρηστα κύτταρα με τη χαμηλότερη συγγένεια ως προς τα HLA μόρια και επιλέγει τα χρήσιμα κύτταρα (T κύτταρα) με την ενδιάμεση συγγένεια προς τα αυτόλογα HLA μόρια (Petrie 2002).

Μέρος Β'

Μέθοδοι HLA Τυποποίησης

1. Εισαγωγή

Για την ανίχνευση των HLA αντιγόνων χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τεχνικές συγκόλλησης λευκών αιμοσφαιρίων. Το 1964 έκανε την εμφάνισή της η τεχνική της μικρολεμφοκυτταροτοξικότητας (*Terasaki και McClelland, 1964*), ο θάνατος δηλαδή των κυττάρων στόχων από ειδικά αντι-HLA αντισώματα. Η τεχνική αυτή συνεχίζει να είναι σήμερα μέθοδος ρουτίνας για την τυποποίηση των HLA τάξης I και την άμεση διασταύρωση δότη-λήπτη. Σε μια απλή εφαρμογή της τεχνικής αυτής, αντι-HLA ορός αναμιγνύεται με ζωντανά λεμφοκύτταρα. Έτσι, συγκεκριμένα αντισώματα αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αντιγόνα στην επιφάνεια του κυττάρου, ενώ ταυτόχρονα η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο κυτταρικό τοίχωμα οδηγεί στη λύση των κυττάρων στα οποία προσδέθηκαν HLA αντισώματα. Για τον εντοπισμό της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος γίνεται χρήση ειδικής χρωστικής. Τροποποιήσεις της τεχνικής αυτής έγιναν αρκετές, κυρίως αλλάζοντας τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των νεκρών κυττάρων ή αλλάζοντας τους χρόνους και τις θερμοκρασίες επώασης. Παρ' όλα αυτά, η αρχή της μεθόδου παραμένει η ίδια. Κύρια μειονεκτήματα της ορολογικής τυποποίησης είναι η απαίτηση σε ζωντανά λεμφοκύτταρα, η περιορισμένη ποσότητα αντι-ορού που είναι συνήθως διαθέσιμη και η αδυναμία της μεθόδου να αναγνωρίζει συγκεκριμένα αλληλία (*Chen et al. 1996*). Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των μονοκλωνικών αντισωμάτων (monoclonal antibodies, MoAb) υποσχέθηκε καλύτερη ποιότητα μονοειδικών αντι-ορών, όχι όμως για όλα τα HLA αντιγόνα (*Dyer και Middleton 1993*).

Στα μέσα της δεκαετίας του '80 άρχισαν να εφαρμόζονται μοριακές τεχνικές τυποποίησης HLA αντιγόνων. Αυτές δεν απαιτούν ζωντανά λευκά αιμοσφαίρια, αλλά χρησιμοποιούν συνθετικούς ιχνηλάτες και εκκινητές, οι οποίοι δεν 'αντιδρούν' με αντιγόνα που εκφράζονται στα λευκά αιμοσφαίρια ενός ατόμου, αλλά με το DNA, το οποίο καθορίζει ποια αντιγόνα εκφράζονται. Γενικότερα, η μοριακή τυποποίηση θεωρείται ακριβέστερη της ορολογικής τυποποίησης, αφού αναγνωρίζει μια πληθώρα HLA αλληλίων. Η μέθοδος της ανάλυσης των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs) εφαρμόστηκε πρώτη. Το 1987, η μέθοδος μεγέθυνσης του DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) έκανε την εμφάνιση της. Αργότερα, με την εμφάνιση και άλλων τεχνικών, όπως της PCR με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών (Sequence Specific Primers, PCR-SSP), του υβριδισμού με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μετά από μεγέθυνση με PCR (Sequence Specific Oligonucleotides, PCR-SSO) και άλλων που θα αναλυθούν

παρακάτω, έγινε πλέον εφικτός ένας ακριβέστερος καθορισμός των γονιδιακών πολυμορφισμών των HLA αντιγόνων, χρησιμοποιώντας μικροποσότητες DNA από οποιοδήποτε σχεδόν είδος ιστού.

Προτού περιγραφούν οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ιστοσυμβατότητας, παρακάτω συνοψίζονται οι βασικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας.

2. Βασικές τεχνικές μοριακής βιολογίας

2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Με τον όρο γονιδιωματικό DNA εννοούμε το χρωμοσωμικό DNA απαλλαγμένο από τις πρωτεΐνες (ιστόνες), οι οποίες συμμετέχουν στο 'πακετάρισμα' του DNA στο χρωμόσωμα. Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA γίνεται κυρίως από εμπύρηννα κύτταρα του οργανισμού (συνήθως λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος) αλλά μπορεί να γίνει και από δείγματα ιστών, αμνιακά κύτταρα και χοριακές λάχνες. Η διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως χρήση απορρυπαντικών για τη λύση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και πρωτεολυτικών ενζύμων (πρωτεΐνάση K) για τη διάσπαση των ιστονών. Ακολουθεί απομάκρυνσή τους με οργανικούς διαλύτες ή πυκνό διάλυμα άλατος και κατακρήμνιση του DNA σε διάλυμα αλκοόλης παρουσία άλατος. Στο τέλος γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός του μακρομοριακού DNA φασματοφωτομετρικά (Miller et al.1988).

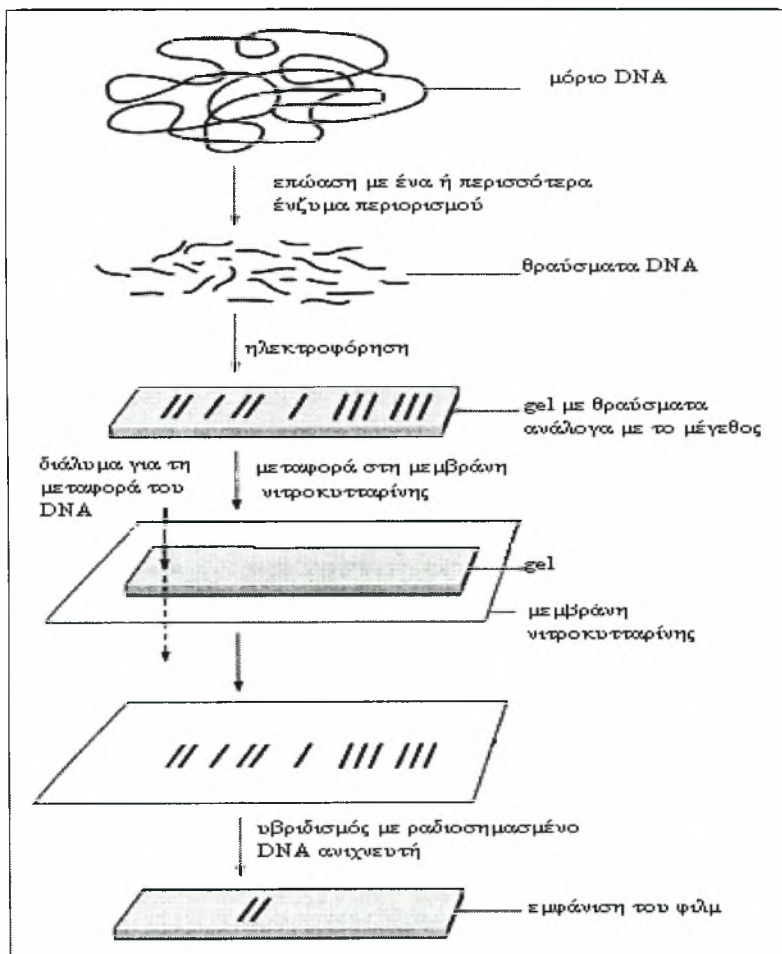
2.2 Υβριδισμός-Μετουσίωση

Ο υβριδισμός βασίζεται στο γεγονός ότι μονές αλυσίδες DNA έχουν την τάση να σχηματίζουν μεταξύ τους περιοχές διπλοελικωμένου DNA στα τμήματα στα οποία οι αλληλουχίες των βάσεων είναι συμπληρωματικές. Ο υβριδισμός μπορεί να γίνει μεταξύ μορίων DNA/DNA, DNA/RNA και RNA/RNA, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μορίων υβριδίων. Η τεχνική της υβριδοποίησης χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως για την ανίχνευση συμπληρωματικών αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος απαιτεί ένα καθαρό μονόκλωνο τμήμα DNA που έχει συμπληρωματική αλληλουχία με το επιθυμητό νουκλεϊνικό οξύ (DNA ή RNA). Αυτό το τμήμα του DNA μπορεί να προκύψει με κλωνοποίηση, ή αν η αλληλουχία είναι μικρή, μπορεί να συντεθεί με χημικό τρόπο. Και στις δύο περιπτώσεις, το τμήμα του DNA πρέπει να περιέχει ένα μοναδικό δείκτη (είτε ραδιοϊσότοπο είτε χημική ομάδα), ώστε η ενσωμάτωσή του σε δίκλωνο μόριο να μπορεί να παρακολουθηθεί κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υβριδισμού. Το μονόκλωνο μόριο που χρησιμοποιείται ως δείκτης ονομάζεται DNA ιχνηλάτης

Η τεχνική της υβριδοποίησης πραγματοποιείται πάνω σε στερεό υπόστρωμα που τις περισσότερες φορές είναι μία μεμβράνη νάυλον ή νιτροκυτταρίνης και σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Οι *in situ* τεχνικές υβριδισμού εντοπίζουν εξειδικευμένες αλληλουχίες νουκλεϊνικών οξέων σε κύτταρα ή χρωμοσώματα.

2.3 Υβριδισμός κατά Southern (Southern blotting)

Ιχνηλάτες DNA συχνά χρησιμοποιούνται έπειτα από ηλεκτροφόρηση πηκτής, για να ανιχνευτούν μόρια νουκλεϊνικών οξέων με αλληλουχίες συμπληρωματικές με ολόκληρο τον ιχνηλάτη ή ένα μέρος του. Η τεχνική αυτή αναλύει DNA. Το απομονωμένο DNA πρώτα κόβεται σε διακριτά τμήματα με νουκλεάσες περιορισμού, τα οποία κλασματώνονται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε μια σειρά ζωνών με ηλεκτροφόρηση πηκτής (Δ. Α. Κυριακίδη 2000). Αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση τα δίκλινα μόρια μετατρέπονται σε μονόκλινα με έκθεση σε αλκαλικό περιβάλλον. Αυτό είναι απαραίτητο για να μπορεί να γίνει κατόπιν η αντίδραση υβριδισμού με τον ιχνηλάτη. Έπειτα, για να γίνουν τα μόρια DNA προσιτά στους ιχνηλάτες, φτιάχνεται ένα αντίγραφο του μοτίβου των DNA ζωνών της πηκτής με μεταφορά ('αποτύπωση') των κλασματωμένων DNA μορίων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Τα μόρια DNA που πρόκειται να υβριδιστούν με τον επισημασμένο ιχνηλάτη εντοπίζονται στη συνέχεια με επώαση της μεμβράνης με ένα διάλυμα που περιέχει τον ιχνηλάτη και ανίχνευση του υβριδισμένου ιχνηλάτη με αυτοραδιογραφία ή με χημικό τρόπο. Το μέγεθος των DNA μορίων κάθε ζώνης που συνδέονται με τον ιχνηλάτη μπορεί να προσδιοριστεί με αναφορά σε ζώνες DNA μορίων γνωστού μεγέθους (DNA πρότυπα) που ηλεκτροφορούνται δίπλα στο πειραματικό δείγμα. Η αρχή της μεθόδου φαίνεται στο σχήμα 8.



Σχήμα 8: Τεχνική αποτύπωσης κατά Southern και υβριδισμός.

2.4 Υβριδισμός κατά Northern (Northern blotting)

Η μέθοδος του υβριδισμού Northern αναλύει RNA. Είναι παρόμοια με τη μέθοδο υβριδισμού κατά Southern, με τη διαφορά ότι τα RNA μόρια δε χρειάζεται να γίνουν μονόκλιωνα πριν από την αντίδραση υβριδισμού με τον ιχνηλάτη, διότι είναι μονόκλιωνα (Δ. Α. Κυριακίδη 2000).

2.5 Αποτύπωση κηλίδας (Dot blot υβριδισμός)

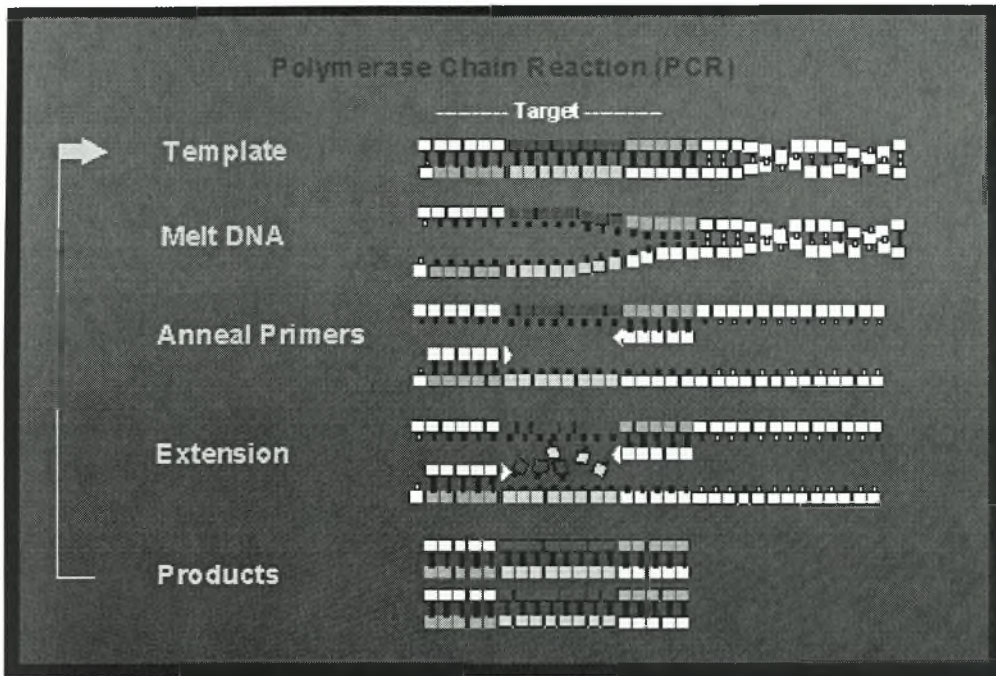
Στην αρχική της μορφή η μέθοδος περιλάμβανε απευθείας τοποθέτηση μικρής ποσότητας δείγματος (συνήθως RNA) σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης, ξήρανση και υβριδισμό με τον κατάλληλο σημασμένο ανιχνευτή (συνήθως τμήμα γονιδιωματικού DNA). Η τεχνική βελτιώθηκε κυρίως με τη χρήση κατάλληλων μικροσυσκευών που επιτρέπουν την καλύτερη τοποθέτηση της κηλίδας με τη χρησιμοποίηση κενού ώστε να διευκολύνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός του νουκλεϊνικού οξέος από την ένταση του σήματος του υβριδισμού. Για την ανίχνευση συχνά χρησιμοποιούνται συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που επιτρέπουν μεγαλύτερη ευαισθησία. Σήμερα η τεχνική χρησιμοποιείται πολύ συχνά για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων της PCR (Yadeti 2004).

2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Ένα μεγάλο μειονέκτημα των μεθόδων υβριδισμού ήταν η απαίτησή τους για μεγάλες ποσότητες DNA δείγματος ώστε να αντισταθμίσουν την χαμηλή τους ευαισθησία. Το πρόβλημα αυτό ξεπεράστηκε με την ανάπτυξη της ενζυμικής τεχνικής PCR, η οποία έχει την ικανότητα να μεγεθύνει με σχετικά απλό τρόπο μια επιθυμητή αλληλουχία χωρίς τη χρήση ζωντανών κυττάρων.

Η τεχνική της PCR εκμεταλλεύεται δύο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA : η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλιωνα DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση του ενός συμπληρωματικού κλώνου. Όμως για να μπορέσει να αρχίσει την σύνθεση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Αυτό σημαίνει ότι αν διαχωριστούν οι δύο κλώνοι ενός δίκλωνου μορίου DNA και χρησιμοποιηθεί ένα ολιγονουκλεοτίδιο που υβριδίζεται σε ένα σημείο του ενός κλώνου, τότε θα αρχίσει η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου από το σημείο που υβριδίστηκε το ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητήρας (primer). Επομένως μπορεί να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA επιλέγοντας δύο εκκινητήρες που υβριδίζονται εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας, έτσι ώστε ο καθένας σαν είναι συμπληρωματικός με τον ένα κλώνο και οι δύο μαζί να καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος (Erllich 1989). Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν πρέπει ο κύκλος αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί πολλές φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια (Σχήμα 9): αρχικά γίνεται διαχωρισμός των δύο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος στους 94°C περίπου. Το αντιδρών μίγμα περιέχει το δίκλιωνα DNA, τους εκκινητήρες, τους τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες (dNTP's), ιόντα Mg, ρυθμιστικό διάλυμα και τέλος το ένζυμο DNA πολυμεράση. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, έτσι ώστε να μη μειώνεται η δράση της κατά τους διάφορους κύκλους εξαιτίας της θέρμανσης. Έπειτα ακολουθεί ψύξη του μίγματος για να υβριδιστούν οι εκκινητήρες με τους δύο κλώνους. Η θερμοκρασία ψύξης είναι καθοριστική για την εξειδίκευση της μεθόδου, γι' αυτό η ακριβής θερμοκρασία (30-65°C) και ο απαιτούμενος χρόνος ψύξης ποικίλλουν ανάλογα με το

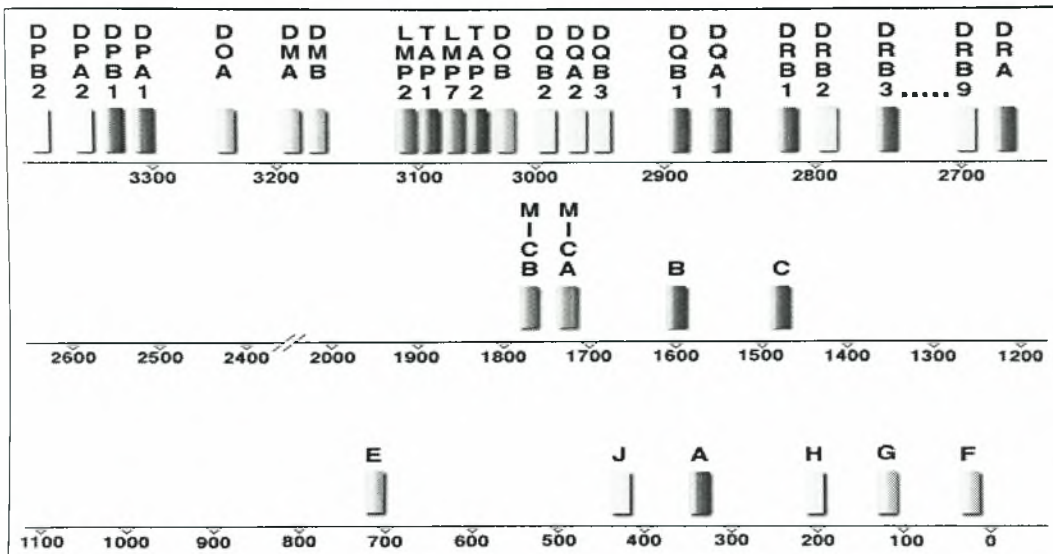
μέγεθος της πολλαπλασιαζόμενης ακολουθίας. Τέλος γίνεται θέρμανση του μίγματος στους 72°C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της συγκεκριμένης πολυμεράσης, οπότε λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA (Δ. Α. Κυριακίδη 2000). Οι εναλλαγές στις θερμοκρασίες στα διάφορα στάδια της PCR αντίδρασης επιτελούνται μέσα σε ειδικά αυτοματοποιημένες συσκευές που κυκλοφορούν στο εμπόριο και ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές (Thermocyclers).



Σχήμα 9: Μεγέθυνση του DNA με την τεχνική της PCR.

3. Έλεγχος Ιστοσυμβατότητας με μοριακές τεχνικές

Οι μέθοδοι τυποποίησης των HLA αντιγόνων χαρακτηρίζονται από το είδος του DNA και τον τύπο του πολυμορφισμού που ανιχνεύουν. Το είδος του DNA είναι είτε γονιδιωματικό (genomic) είτε το μεγεθυσμένο προϊόν της PCR αντίδρασης. Οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύονται είναι είτε ειδικοί για αλληλουχίες μοναδικές ενός δεδομένου HLA αλληλίου (allele-specific), είτε ειδικοί για αλληλουχίες μικρομεταβλητών περιοχών των HLA γονιδίων (sequence-specific). Οι μοριακές τεχνικές αναγνωρίζουν κατ' αρχήν τα HLA αντιγόνα της ορολογικής τυποποίησης καθώς και τους υποτύπους των αλληλίων, όπως αυτοί καθορίστηκαν με την απευθείας ανάγνωση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων (Colombe 1994). Πάνω από 1250 αλληλία έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής με εφαρμογή μοριακών μεθόδων και τα οποία αντιπροσωπεύουν αλληλία των γονιδιακών θέσεων τάξης I και II (Σχήμα 10) (Gerlach 2001).



Σχήμα 10: Τα HLA αλληλία για κάθε γονιδιακή θέση.

Η αναγνώριση της πλήρους αλληλουχίας των βάσεων των HLA γονιδίων για κάθε άτομο αποτελεί ασφαλώς την πιο διαφωτιστική μέθοδο τυποποίησης (Sequence-based Typing, SBT). Οι μέθοδοι τυποποίησης των HLA γονιδίων τάξης I διαφέρουν από τις μεθόδους τυποποίησης των HLA γονιδίων τάξης II. Το εξώνιο με μεγάλο βαθμό πολυμορφισμού είναι για τα HLA τάξης II το εξώνιο 2, ενώ για τα HLA τάξης I τα εξώνια 2 και 3. Συνεπώς, η αλληλούχιση των HLA γονιδίων τάξης I είναι πιο περίπλοκη. Πάντως, η συγκεκριμένη μέθοδος τυποποίησης είναι υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (high-resolution), ενώ η ανάπτυξη αυτοματοποιημένων συσκευών υπόσχεται πολλά στο μέλλον (Gerlach 2001, Adams 2004).

Οι μοριακές τεχνικές στο ξεκίνημά τους εφαρμόστηκαν κυρίως για την τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων, αφενός λόγω του μεγαλύτερου πολυμορφισμού που τα διακρίνει σε σχέση με τα HLA τάξης I, αφετέρου λόγω της δυσκολίας αναγνώρισής τους με τις κλασσικές ορολογικές δοκιμασίες. Η πρώτη μοριακή μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι η ανίχνευση των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (RFLP).

3.1 Ανίχνευση Πολυμορφισμών Μήκους Θραύσματος από Περιοριστικό ένζυμο (RFLP).

Πρόκειται για μία τεχνική που αναγνωρίζει όλες τις γνωστές ορολογικές ειδικότητες των DR και DQ αντιγόνων. Σ' αυτήν γίνεται κατάτμηση του DNA των υπό μελέτη ατόμων με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα και έπειτα ακολουθεί υβριδισμός με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές. Τα περιοριστικά ένζυμα έχουν την ικανότητα να 'κόβουν' το DNA σε συγκεκριμένα σημεία. Κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία, συνήθως 4,5,6 ή σπανιότερα 8 βάσεων. Αυτό σημαίνει ότι αλλαγή σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο (π.χ λόγω κάποιας μετάλλαξης) που βρίσκεται σε μια θέση κοπής από περιοριστικό ένζυμο αρκεί για να καταστείλει τη δράση του ενζύμου ώστε να μη μπορεί πλέον να 'κόψει' το DNA στο συγκεκριμένο σημείο. Έτσι, τα θραύσματα που προκύπτουν διαφέρουν ως προς το μήκος. Με την RFLP διαφορετικοί οργανισμοί τυποποιούνται μετά από ανάλυση των θραυσμάτων που προκύπτουν μετά το κόψιμο του DNA τους από περιοριστικά ένζυμα. Εάν δύο οργανισμοί διαφέρουν ως προς την απόσταση ανάμεσα

στα σημεία περιορισμού για μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση, τότε διαφέρουν και τα θραύσματα DNA που θα προκύψουν μετά από κοπή από το συγκεκριμένο ένζυμο.

Το περιοριστικό ένζυμο που προτιμάται συνήθως για αναλύσεις με RFLP είναι η *Taq* I πολυμεράση, διότι η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο αυτό πάνω στο DNA (5'-TCGA-3') περιέχει το δινουκλεοτίδιο CpG (νουκλεοτίδιο κυτοσίνης ακολουθούμενο από νουκλεοτίδιο γουανίνης). Οι θέσεις που περιέχουν τα CpG διμερή παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα πολυμορφισμού στο ανθρώπινο DNA απ' ότι άλλες θέσεις, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων που συμβαίνουν περισσότερο στις περιοχές αυτές, οπότε με την *Taq* I RFLP τυποποίηση ανιχνεύονται περισσότεροι πολυμορφισμοί. Ως ανιχνευτές προτιμώνται μικρά τμήματα cDNA που προέρχονται από mRNA μεταγραφώματα της γονιδιακής υποπεριοχής DRB, DQB και DQA ή των εξονίων τους (Vaughan 2003).

3.2 Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μετά από μεγέθυνση με PCR (*Sequence Specific Oligonucleotides, PCR-SSO*).

Η τυποποίηση των HLA τάξης II αντιγόνων με την τεχνική αυτή ήταν η πρώτη με βάση την PCR μέθοδο που έδωσε σημαντική βελτίωση στην RFLP ανάλυση. Βασική αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-24 νουκλεοτιδίων συμπληρωματικά των γνωστών πολυμορφικών αλληλουχιών των HLA αλληλίων. Συνήθως, απαιτείται μεγάλος αριθμός ολιγονουκλεοτιδίων λόγω των κοινών πολυμορφικών αλληλουχιών. Πριν τον υβριδισμό, προηγείται PCR αντίδραση, που περιλαμβάνει μετουσίωση του DNA-στόχου, σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδικών αφητηριών (primers) εκατέρωθεν του στόχου και σύνθεση νέου DNA. Έπειτα, το προϊόν της PCR αντίδρασης μεταφέρεται πάνω σε μεμβράνη (αποτύπωση κηλίδας, Dot blot υβριδισμός), όπου ακινητοποιείται και υβριδίζεται με ειδικά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια για το κάθε HLA αλληλίο, σημασμένα ισοτοπικά ή χημικά. Μια εναλλακτική και απλούστερη μέθοδος ολιγονουκλεοτιδικής τυποποίησης περιλαμβάνει την ακινητοποίηση όλων των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων πάνω σε στερεό υπόστρωμα (ανάστροφος υβριδισμός, reverse dot blot hybridization). Η μέθοδος προϋποθέτει οι συνθήκες υβριδισμού να είναι ίδιες για όλα τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, πράγμα που δεν είναι πάντα εφικτό για όλες τις γονιδιακές θέσεις (Gerlach 2001, Balas et al.2000).

3.3 PCR με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αφητηριών (*Sequence Specific Primers, PCR-SSP*).

Πρόκειται για μία μέθοδο που χρησιμοποιεί ειδικές ολιγονουκλεοτιδικές αφητηρίες (primers) με βάση τις γνωστές αλληλουχίες-στόχους, ώστε κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες υβριδισμού να παράγεται μεγεθυμένο προϊόν μόνο όταν έχει επιτευχθεί απόλυτο ταιρίασμα με το υπό εξέταση δείγμα DNA. Όταν δεν παράγεται μεγεθυμένο προϊόν, το δείγμα DNA δεν φέρει την υπό αναζήτηση αλληλουχία. Έτσι η HLA τυποποίηση γίνεται σε επίπεδο PCR αντίδρασης, χωρίς να απαιτούνται νέοι υβριδισμοί με ειδικά ολιγονουκλεοτίδια, όπως συμβαίνει με την PCR-SSO τεχνική. Μετά την μεγέθυνση, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του δείγματος και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία ή απουσία του PCR προϊόντος. Η μέθοδος αυτή αναγνωρίζει όλα τα ορολογικώς ανιχνευόμενα αλληλία καθώς και τους πολυάριθμους υποτύπους αυτών (Gerlach 2001, Zhang et al.2001).

Μέρος Γ'

Κλινική Σημασία της HLA Τυποποίησης

1. Μεταμόσχευση

Η μεταμόσχευση οργάνων και ιστών παρείχε και παρέχει την κινητήρια δύναμη για την εκτεταμένη έρευνα του HLA συστήματος. Έτσι, τα εργαστήρια Ιστοσυμβατότητας συνεχίζουν περισσότερο από 30 χρόνια να τροφοδοτούν με γνώσεις και στατιστικές ανοσογενετικές μελέτες με θέμα τα HLA αντιγόνα.

Λόγω της στενής μεταξύ τους σύνδεσης, τα HLA αλληλία κάθε γονιδιακής θέσης ενός χρωμοσώματος κληρονομούνται σε συνδυασμό σαν μία μονάδα. Ο συνδυασμός αυτός των HLA μορίων που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του ενός χρωμοσώματος αναφέρεται ως απλότυπος. Επειδή κάθε άτομο κληρονομεί ένα χρωμόσωμα από κάθε γονέα, φέρει δύο HLA απλοτύπους. Αδέλφια που κληρονόμησαν τους ίδιους δύο απλοτύπους από τους γονείς τους, καλούνται HLA ταυτόσημα. Όταν λήπτης και δότη μοιράζονται έναν HLA απλότυπο, αποκαλούνται απλοταυτόσημοι και τέτοια είναι συνήθως η περίπτωση του πατρικού μοσχεύματος. Ωστόσο, τα αδέλφια μπορούν να διαφέρουν και ως προς τους δύο απλοτύπους, οπότε καλούνται ασύμβατα αδέλφια.

Λόγω του μεγάλου βαθμού πολυμορφισμού των HLA μορίων, τα περισσότερα μη συγγενή άτομα διαφέρουν και ως προς τους δύο απλοτύπους. Ωστόσο, τα άτομα αυτά μπορεί να μοιράζονται ή να διαφέρουν σε ένα ή περισσότερα HLA γονίδια που φέρουν οι απλοτύποι τους και επομένως σε ένα ή περισσότερα αντίστοιχα HLA μόρια.

1.1 Μεταμόσχευση νεφρού

Η μεταμόσχευση νεφρού αποτελεί θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Η προέλευση του δότη νεφρικού μοσχεύματος μπορεί να είναι: α) από ζώντες συγγενείς (γονείς ή αδέλφια), β) από πτωματικούς δότες και γ) από ζώντες μη συγγενείς δότες (σύζυγοι). Στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες και στις ΗΠΑ το 80% των νεφρικών μοσχευμάτων προέρχεται από πτωματικούς δότες, στην Ελλάδα όμως η κυριότερη πηγή εξακολουθεί να είναι η από ζώντες συγγενείς δότες.

Ο ρόλος των HLA αντιγόνων στην επιβίωση του νεφρικού μοσχεύματος αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα νεφρικής μεταμόσχευσης από HLA ταυτόσημα αδέλφια. Ενώ είναι γενικά αποδεκτή η σημασία της ιστοσυμβατότητας στις μεταμοσχεύσεις από ταυτόσημο αδερφό, εξακολουθεί να αμφισβητείται η σημασία της για τις πτωματικές μεταμοσχεύσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό μεταμοσχεύσεων που αναλύθηκαν, τον χαμηλό αριθμό πλήρως συμβατών με τον λήπτη μοσχευμάτων που μεταμοσχεύτηκαν και τη βελτίωση άλλων σημαντικών παραμέτρων που ίσως ελαττώνουν τη σημασία της ιστοσυμβατότητας. Η θετική επίδραση των κοινών HLA-A και -B στις πτωματικές μεταμοσχεύσεις αναφέρθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του '60 (Terasaki et al.1966) ενώ μόλις το 1978 που έγινε εφικτή η ανίχνευσή τους με την ορολογική μέθοδο, αναλύθηκε και η συμμετοχή των HLA-DR αντιγόνων στην επιβίωση των νεφρικών μοσχευμάτων (Ting and Morris 1979). Σε μερικές μάλιστα μελέτες, η επίδραση της HLA-DR συμβατότητας αποδείχτηκε ισχυρότερη από αυτήν για τα HLA-A και -B αντιγόνα (Albrechtsen et al.1979, Moen et al.1980).

Πριν από την εισαγωγή της κυκλοσπορίνης (CyA) στη βασική ανοσοκατασταλτική θεραπεία, οι περισσότερες κλινικές μελέτες είχαν δείξει σημαντική βελτίωση της επιβίωσης πλήρως συμβατών για τα HLA αντιγόνα μοσχευμάτων σε σύγκριση με τα ασύμβατα μοσχεύματα. Μετά την εισαγωγή της CyA, ωστόσο, η επίδραση της HLA συμβατότητας δεν ήταν τόσο εκσημασμένη, παρά το γεγονός ότι υπήρχε ελάττωση των επεισοδίων οξείας απόρριψης σε συμβατά μοσχεύματα. Σε μεγαλύτερες όμως πολυκεντρικές μελέτες η ευεργετική επίδραση της HLA συμβατότητας στην επιβίωση του μοσχεύματος εδραιώθηκε, ανεξάρτητα από το είδος της ανοσοκαταστολής που χρησιμοποιήθηκε. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία από το UCLA και την UNOS (United Network for Organ Sharing) η ετήσια επιβίωση μοσχευμάτων με πλήρη ταυτότητα (δύο HLA απλότυποι κοινοί) ήταν 94%. Όταν, ο δότης γονέας ή αδερφός ήταν συμβατός για τον έναν HLA απλότυπο, η ετήσια επιβίωση ανέρχονταν σε 89% και 90% αντίστοιχα (Takemoto et al. 2003).

Το πλεονέκτημα της καλής συμβατότητας γίνεται περισσότερο εμφανές στη μακροχρόνια επιβίωση των μοσχευμάτων. Έτσι, η προβλεπόμενη ημιπερίοδος ζωής (ο χρόνος δηλαδή που χρειάζεται για την απόρριψη του 50% των μοσχευμάτων που λειτούργησαν τον πρώτο χρόνο μετά τη μεταμόσχευση) είναι 26,9 χρόνια για μοσχεύματα πλήρους ταυτότητας στο σύστημα HLA και 12,2 και 10,8 χρόνια για μοσχεύματα από απλοταυτόσημο αδερφό ή γονέα αντίστοιχα. Τα ευνοϊκά αυτά αποτελέσματα από την ανάλυση των μεταμοσχεύσεων από ζώντες δότες οδήγησαν στην αλλαγή του τρόπου κατανομής των πτωματικών μοσχευμάτων, από τοπική σε εθνική κλίμακα με βάση την καλύτερη δυνατή ιστοσυμβατότητα μεταξύ δότη-λήπτη.

Η βελτίωση της επιβίωσης του μοσχεύματος ήταν περισσότερο εμφανής όταν η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα λεγόμενα σχιστά αντιγόνα (split HLA antigens) για τα HLA-A και -B και στα κυρίως αντιγόνα (broad antigens) για τα HLA-DR (Opelz et al.1993). Αυτό σημαίνει ότι αν ο δότης είχε HLA-A24 ενώ ο λήπτης είχε HLA-A23 (και τα δύο αντιγόνα είναι σχιστά του κυρίως αντιγόνου HLA-A9) αυτό θεωρήθηκε ως μη συμβατότητα. Μελέτες από τη Μ. Βρετανία έδειξαν ότι όταν πτωματικοί νεφροί μεταμοσχεύονται με διαφορά το πολύ σε ένα HLA-A ή -B αντιγόνο και καμία διαφορά στα HLA-DR (beneficially matched) έχουν μεγαλύτερη επιβίωση όταν συγκριθούν με μοσχεύματα με περισσότερες από δύο διαφορές. Από ελληνικές μελέτες φάνηκε ότι όταν συγγενής δότης και λήπτης μοιράζονται τους απλότυπους A*1B*8, A*2B*12, A*3B*7, A*11B*5, A*11B*35 και A*9B*12, η μακροχρόνια επιβίωση των μοσχευμάτων είναι πολύ μεγαλύτερη. Επίσης, η επιβίωση του μοσχεύματος από πτωματικό δότη με 1-3 μη κοινά HLA-A, B αντιγόνα και 1 μη κοινό DR ήταν μεγαλύτερη από αυτήν με 4 μη κοινά HLA-A, B και 2 μη κοινά DR αντιγόνα (Adam et al. 1992).

Η συμβολή της HLA συμβατότητας στην επιτυχή έκβαση της μεταμόσχευσης είναι ιδιαίτερα θεαματική σε περιστατικά προϋπάρχουσας ευαισθητοποίησης του υποψήφιου λήπτη. Έτσι, άτομα που δέχονται δεύτερη και τρίτη μεταμόσχευση, επωφελούνται σαφώς από τη λήψη ενός ιδιαίτερα συμβατού μοσχεύματος. Όσο μεγαλύτερος ο βαθμός ευαισθητοποίησης, τόσο μεγαλύτερη είναι η επίδραση της ιστοσυμβατότητας στην επιβίωση του μοσχεύματος.

Τα τελευταία χρόνια μια πληθώρα νέων τεχνικών που βασίζονται αποκλειστικά στην ανάλυση του DNA προσφέρουν τη δυνατότητα λεπτομερέστερης ανάλυσης του HLA συστήματος, με άμεση συνέπεια την ακριβέστερη συσχέτισή του με την έκβαση των μεταμοσχεύσεων. Από τα υπάρχοντα δεδομένα, δε διαφαίνεται επίδραση του HLA-C γενετικού τύπου στην επιβίωση του μοσχεύματος, ενώ η συμβατότητα στα HLA-DQ αντιγόνα φαίνεται να είναι ευνοϊκή. Επίσης, καμία διαφορά δε βρέθηκε όταν δότης και λήπτης διαφέρουν ως προς τα HLA-DP αντιγόνα.

Σήμερα, η κατανομή των νεφρικών μοσχευμάτων με συμβατότητα μικρότερη από την ιδανική, βασίζεται σε ένα σύστημα επιλογής που περιλαμβάνει την ομάδα αίματος, το επίπεδο των προσχηματισμένων αντι-HLA αντισωμάτων (αρνητική άμεση και έμμεση δοκιμασία διασταύρωσης, cross-match και panel test αντίστοιχα), την ποιότητα της HLA συμβατότητας, τον χρόνο αναμονής στη λίστα και την ηλικία του υποψήφιου λήπτη (Laux and Opelz 2004).

1.2 Μεταμόσχευση παγκρέατος

Πολυπαραγοντική ανάλυση των προγνωστικών παραγόντων σε ασθενείς που αναφέρθηκαν στη διεθνή υπηρεσία για μεταμόσχευση παγκρέατος, παρουσιάζει μια θετική επίδραση των ορολογικά τυποποιημένων κοινών HLA-DR στην επιβίωση του μοσχεύματος. Η σημασία της HLA-A και -B συμβατότητας δεν έχει ακόμα αποδειχτεί (Gruessner et al.2001).

1.3 Μεταμόσχευση καρδιάς

Η ιστοσυμβατότητα στη μεταμόσχευση καρδιάς δε λαμβάνεται καθόλου υπόψη διότι ο ανώτατος χρόνος ψυχρής ισχαιμίας δεν επιτρέπει την εκτενή τυποποίηση. Παρ' όλα αυτά, σύμφωνα με τα στοιχεία της CHTS (Collaborative Heart Transplant Study) είναι σαφής η σημασία της ιστοσυμβατότητας στη μεταμόσχευση του οργάνου αυτού. Μοσχεύματα με 0-2 διαφορές στα HLA-A, -B και -DR αντιγόνα δείχνουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης και ελάττωση των επεισοδίων απόρριψης σε σύγκριση με περιστατικά με 3-6 διαφορές. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η HLA συμβατότητα ελαττώνει τη συχνότητα και σοβαρότητα της οξείας απόρριψης του καρδιακού μοσχεύματος και βελτιώνει την επιβίωση του μοσχεύματος για πάνω από 10 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση (Ouwehand et al.1992).

1.4 Μεταμόσχευση ήπατος

Όπως και με τη μεταμόσχευση καρδιάς, έτσι και στη μεταμόσχευση ήπατος ο περιορισμένος χρόνος ψυχρής ισχαιμίας δεν αφήνει περιθώρια για HLA τυποποίηση και μεταφορά του οργάνου στον καταλληλότερο λήπτη. Πρόσφατα στοιχεία από την CLTS (Collaborative Liver Transplant Study) εξηγούν την ύπαρξη ή απουσία ευνοϊκής επίδρασης της HLA συμβατότητας για τα DR αντιγόνα ανάλογα με την πρωτοπαθή νόσο που οδήγησε στη μεταμόσχευση ήπατος. Σύμφωνα με αυτά, σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων από χολική κίρρωση η DR συμβατότητα δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο, ενώ μεταμόσχευση λόγω ηπατίτιδας B ή C η DR συμβατότητα οδηγεί σε καλύτερη επιβίωση του μοσχεύματος (Grassi et al. 2004, Calmus 2004).

1.5 Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών καθιερώθηκε εδώ και πολλά χρόνια ως θεραπεία της απλαστικής αναιμίας, της οξείας και χρόνιας λευχαιμίας, των λεμφωμάτων και των αιμοσφαιρινοπαθειών (μεσογειακή αναιμία), του πολλαπλού μυελώματος και των βαριών αυτοάνοσων παθήσεων. Ο ιδιόμορφος περιορισμός της μεταμόσχευσης μυελού των οστών είναι η ανάγκη προφύλαξης από την ανοσολογική αντίδραση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή καθώς επίσης και ο έλεγχος της

αντίστασης του ξενιστή στο μόσχευμα. Οι περιορισμοί αυτοί είναι τόσο σοβαροί ώστε να απαιτείται πλήρης συμβατότητα ως προς το HLA σύστημα για επιτυχημένη έκβαση σε όλες τις περιπτώσεις. Μέχρι πρόσφατα, οι HLA-συμβατοί δότες έπρεπε να αναζητηθούν μεταξύ των αδερφών και συγγενών των ασθενών, η εξέλιξη όμως των ανοσολογικών τεχνικών που διευκόλυνε τη διερεύνηση του πολυμορφισμού του HLA συστήματος, επέτρεψε τη διεύρυνση της δεξαμενής των δοτών και έξω από τους ταυτόσημους συγγενείς. Ωστόσο, ο πολυμορφισμός των HLA είναι τόσο μεγάλος, ώστε να απαιτείται μια τράπεζα από 100000 πιθανούς δότες για να βρεθεί ένας ταυτόσημος δότης για το 43% μόνον των ασθενών (Schaffer et al.2003, Petersdorf et al.2003, Sasazuki et al. 1998, Petersdorf et al.1997, Petersdorf et al. 1998, Kuliev 2004, Pallera 2004) .

2. Συσχέτιση των HLA αντιγόνων με νοσήματα

Η συχνότητα ορισμένων HLA αντιγόνων ή και απλοτύπων έχει ανευρεθεί, με πληθυσμιακές και οικογενειακές μελέτες, αυξημένη σε ορισμένα νοσήματα, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (πίνακας 1). Χαρακτηριστικά των νοσημάτων αυτών είναι ότι (α) είναι άγνωστης αιτιοπαθολογίας, (β) παρουσιάζουν κάποιας μορφής κληρονομικότητα αλλά η διαπερατότητά τους είναι ασθενής, με αποτέλεσμα να μη συνδέονται απόλυτα με ένα συγκεκριμένο HLA αντιγόνο, (γ) παρουσιάζουν ανοσολογικές διαταραχές, (δ) δεν έχουν καμία επίδραση στην αναπαραγωγή. Η πλειονότητα των σχέσεων με νοσήματα αφορά τα τάξης II HLA αντιγόνα. Αν και έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις για την ερμηνεία αυτών των σχέσεων, τα πιο πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι αλλαγές σε ένα και μόνο αμινοξύ, που κατέχει βασικής σημασίας θέση στο HLA μόριο, είναι ικανές να μεταβάλλουν την προδιάθεση σε κάποιο νόσημα, καθώς και ότι περιοχές με την ίδια αμινοξική αλληλουχία, που βρίσκονται σε διαφορετικά HLA μόρια μπορεί να είναι υπεύθυνες για την προδιάθεση αυτή (Γερμενής 2000).

Πίνακας 1: Η σχέση των HLA αντιγόνων με ορισμένα νοσήματα.

Νόσημα	HLA αντιγόνα
Αγκυλωτική σπονδυλίτιδα	B27
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	DR4
Ινσουλινοεξαρτόμενος διαβήτης τύπου I	DR3, DR4
Κοιλιοκάκη	DR3
Κοινή ή χρόνια κακοήθης πέμφιξ	DR4
Χρόνια ενεργός ηπατίτιδα	DR3

Η συνήθης μέτρηση της έντασης μιας συσχέτισης είναι ο σχετικός κίνδυνος, ο οποίος αναφέρεται στη συχνότητα εμφάνισης κάποιου νοσήματος σε άτομα που φέρουν έναν HLA δείκτη σε σχέση με άτομα που δε φέρουν το συγκεκριμένο δείκτη. Ουσιαστικά ο σχετικός κίνδυνος (Relative Risk, RR) εκφράζει την πιθανότητα να εμφανίσει το νόσημα κάποιο άτομο που φέρει το σχετιζόμενο με το νόσημα HLA αντιγόνο σε σχέση με εκείνο που δεν το φέρει. Όταν ο σχετικός κίνδυνος έχει τιμή

άνω της μονάδας, τότε συνεπάγεται ότι είναι αυξημένος ο κίνδυνος για αυτούς που φέρουν το αντιγόνο να εμφανίσουν το νόσημα (θετική συσχέτιση). Σχετικός κίνδυνος κοντά της μονάδας υποδηλώνει ότι τα άτομα που φέρουν το αντιγόνο δεν έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν το νόσημα (αρνητική συσχέτιση).

3. Φυλογενετική ανάλυση πληθυσμών

Με τον όρο φυλογενετική ανάλυση πληθυσμών εννοούμε τον προσδιορισμό των φυλετικών τύπων αλλά και των προσμίξεων μιας ομάδας ατόμων κατά τη διάρκεια της εξελικτικής τους πορείας. Υπάρχουν τρεις μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης : η ιστορική, η γλωσσολογική και η ανθρωποβιολογική (Πολυμενίδης 1987). Η HLA τυποποίηση αποτελεί μία από τις βασικότερες βιολογικές μεθόδους εξαιτίας του ευρέως φάσματος πολυμορφισμού του συστήματος. Η κλινική σημασία του προσδιορισμού των συχνοτήτων των HLA αλληλίων τάξης I και II στην φυλογενετική ανάλυση έγκειται στο ότι προκύπτουν συμπεράσματα σε σχέση με την εξέλιξη, τη μετανάστευση πληθυσμών και την εύρεση κατάλληλων δοτών σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης μυελού των οστών αλλά και ατόμων με ευαισθησία έναντι συγκεκριμένων ασθενειών.

4. Έλεγχος πατρότητας

Τα HLA αντιγόνα εμφανίζονται για πρώτη φορά κατά τη γέννηση ενός ατόμου και παραμένουν σταθερά σε όλη τη διάρκεια της ζωής του. Κληρονομούνται με γνωστό και σταθερό τρόπο (ως συγκυρίαρχα αντιγόνα) και αποτελούν έναν από τους πλέον χρησιμοποιούμενους τρόπους ελέγχου πατρότητας. Από τις γονιδιακές θέσεις του HLA απλοτύπου χρησιμοποιούνται κυρίως οι HLA-A,B,C και DR με μεγάλο μάλιστα ποσοστό ακρίβειας σε σχέση και με τις υπόλοιπες μεθόδους ελέγχου πατρότητας.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή δύο μοριακών τεχνικών HLA τυποποίησης, της PCR-SSP και PCR-SSO LIFEMATCH τυποποίησης, σε δείγμα 278 υγιών ατόμων που ανήκουν στον επίμικτο Θεσσαλικό πληθυσμό, και η σύγκριση των αποτελεσμάτων που θα επέτρεπε τη χρήση της μιας εκ των δύο ή και των δύο μοριακών τεχνικών σε διαφορετικά ερευνητικά και κλινικά πεδία.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικό και Μέθοδοι

Υλικό

Για την εργασία αυτή τυποποιήθηκαν με τις δύο τεχνικές μοριακής βιολογίας, PCR-SSP και PCR-SSO LIFEMATCH, ως προς τα HLA-A*, HLA-B* και HLA-DRB1* αντιγόνα, 278 υγιή άτομα που ανήκουν στον επίμικτο Θεσσαλικό πληθυσμό, με απώτερο σκοπό την πραγματοποίηση μεταμοσχεύσεων αλλά και μελέτες Πληθυσμιακής Γενετικής του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας.

Μέθοδοι

Για την τυποποίηση των HLA τάξης I και II αντιγόνων εφαρμόστηκαν δύο μοριακές τεχνικές:

1. Μεγέθυνση του DNA με PCR και χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers, PCR-SSP).

Η μέθοδος περιλαμβάνει απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα, PCR αντίδραση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων (Orelup και Schaffer 2001).

1.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα

Το DNA των ατόμων της μελέτης απομονώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις από τα λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος 1.5ml με αντιπηκτικό EDTA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/ λεπτό (rpm) για 20min αποχωριζόταν η στιβάδα των λευκών (buffy coat) και φυλασσόταν στους -20°C, όταν η απομόνωση του DNA δε γινόταν την ίδια μέρα.

Σε ένα πλαστικό μικροσωληνάριο τύπου erpendorf των 1,5ml προσθέτονταν 500μl από τη στιβάδα των λευκών (αντιστοιχούσε σε ένα άτομο) και έπειτα γινόταν προσθήκη 1ml κρύου (0-5°C) *Αντικού Διαλύματος Ερυθρών Αιμοσφαιρίων* για την αιμόλυση των εναπομεινάντων ερυθρών κατά την συλλογή της στιβάδας των λευκών. Ακολουθούσε δονητική ανάδευση (vortex) για 30sec και φυγοκέντρηση για 1min στις 13000 rpm για να καθιζάνουν τα εμπύρνηνα κύτταρα. Στη συνέχεια απομακρυνόταν το αιμολυμένο υπερκείμενο και ακολουθούσε άλλη μια πλύση με προσθήκη και πάλι 1ml κρύου (0-5°C) *Αντικού Διαλύματος Ερυθρών Αιμοσφαιρίων*, ήπια ανακίνηση επί 5min και φυγοκέντρηση για 1min στις 13000 rpm.

Μετά την απομάκρυνση και πάλι του υπερκείμενου, ακολουθούσε πρωτεόλυση πυρηνικών μεμβρανών με προσθήκη 125μl του ενζύμου *Πρωτεϊνάση K*

που περιέχονταν σε *Λυτικό Διάλυμα Πυρηνικών Μεμβρανών* (4mg/ml) και ανακίνηση για 5min.

Η διαδικασία αυτή γινόταν συνήθως σε 10-12 δείγματα από διαφορετικά άτομα ταυτόχρονα. Τα δείγματα στη συνέχεια επωάζονταν στο προθερμασμένο στους 65°C υδατόλουτρο για 12min, ενώ κάθε 3min γινόταν ανακίνηση. Πρέπει να αναφερθεί ότι σ' αυτό το σημείο τα δείγματα θα μπορούσαν να φυλαχτούν στους -4°C όλη τη νύχτα ή στους -20°C για διάστημα μιας εβδομάδας ή και παραπάνω.

Ακολούθως, γινόταν προσθήκη 280μl *Διαλύματος Απομάκρυνσης των Πρωτεϊνών* στα δείγματα για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών των συνδεδεμένων με το DNA, ήπια ανακίνηση για 5sec και επώαση για 10min στους 0-5°C. Μετά την επώαση, τα δείγματα τοποθετούνταν στη φυγόκεντρο για 5min στις 13000 rpm.

Το σημείο αυτό χρίζει ιδιαίτερης προσοχής διότι το υπερκείμενο που περιείχε το DNA δεν απομακρύνονταν αλλά μεταφέρονταν σε ένα άλλο καθαρό μικροσωληνάριο των 2ml, ενώ το ίζημα ήταν πλέον άχρηστο. Έπειτα, στα δείγματα προσθέτονταν 500μl κρύα (0-5°C) 90% αιθανόλη, οπότε τα μικροσωληνάρια ανακινούνταν ήπια 6-10 φορές, έως ότου το DNA εμφανιστεί να αιωρείται στο υγρό διάλυμα του σωληναρίου. Εάν το DNA δεν ήταν ορατό σ' αυτή τη φάση, τότε τοποθετούνταν στην κατάψυξη (-20°C) για 10min, οπότε μπορούσε εύκολα να παρατηρηθεί.

Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 rpm για 5min και βεβαίως απομάκρυνση του υπερκείμενου, μιας και το DNA ευρίσκετο στον πυθμένα των σωληνίσκων. Γινόταν στη συνέχεια προσθήκη 70% αιθανόλης, ήπια ανακίνηση για 5min στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 90sec. Απομακρύνονταν το υπερκείμενο και τα σωληνάρια αφήνονταν να 'στεγνώσουν' για 10min, τοποθετημένα με κάποια κλίση, ώστε να εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη.

Τέλος, στα δείγματα προσθέτονταν 100-500μl απεσταγμένο H_2O (η ποσότητα του προστιθέμενου νερού ήταν ανάλογη της ποσότητας του παρατηρούμενου DNA στη φάση μετά την προσθήκη 90% αιθανόλης), ακολουθούσε επώαση στο υδατόλουτρο στους 65°C για 15min και ήπια ανακίνηση στο vortex για να επαναδιαλυθεί το DNA στα δείγματα.

Σε κάθε δείγμα DNA γινόταν ποσοτικός προσδιορισμός φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 260 και 280nm μετά από αραιώση ποσού δείγματος σε H_2O . Από την οπτική πυκνότητα (OD) στα 260nm υπολογίζονταν η συγκέντρωση του DNA σε μg/μl, με βάση τον τύπο $C_{DNA} = O.D_{260} \times 50 \times 20$ (αραιώση) = $O.D_{260} \times 1000$. Η τελική συγκέντρωση γενωμικού DNA για την PCR-SSP θα έπρεπε να είναι 50-100ng/μl. Ο λόγος της O.D 260/280nm υπολογιζόταν για να αξιολογηθεί η καθαρότητα του DNA απουσία πρωτεϊνικών προσμίξεων (λόγος $\leq 1,8$ υποδηλώνει δείγμα ικανοποιητικής καθαρότητας, ενώ $< 1,2$ υποδηλώνει ακατάλληλο δείγμα).

1.2 Προετοιμασία των δειγμάτων της PCR για την HLA-A*, -B*, -DRB1* τυποποίηση (Sintasath et al. 1997, Orelup et al. 1992).

1. Αρχικά, τα *Διαλύματα D* και *Y* (που φυλάσσονταν στους -20°C) τοποθετούνταν πάνω στην ειδική γυάλινη πλάκα (PCR workstation).
2. Η ειδική για τα συγκεκριμένα γονίδια *Cyclerplate* πλάκα των 96 φρεατίων, που περιείχε καθηλωμένα στον πυθμένα των φρεατίων της όλους τους ειδικούς εκκινητές (primers) σημασμένους και η οποία φυλάσσονταν στους 4°C, τοποθετούνταν επίσης στη γυάλινη πλάκα, ώστε η διαδικασία να γίνεται όσο τα αντιδραστήρια παραμένουν κρύα.

3. Γινόταν προετοιμασία του αρχικού κύριου μίγματος (pre master mix) για κάθε δείγμα DNA (δηλαδή για κάθε άτομο) ως εξής:

Protrans Cyclerplate πλάκα HLA-A*, -B*, -DRB1*	Διάλυμα D	Διάλυμα Y	Ταq πολυμεράση 5U/μl
	280μl	560μl	6,5μl

- Ακολουθούσε ήπια ανακίνηση του αρχικού κύριου μίγματος με δονητικό αναδευτήρα και γρήγορη φυγοκέντρηση για να καθιζάνει ότι είχε απομείνει στα τοιχώματα του σωληναρίου.
- Για τον αρνητικό μάρτυρα (**negative control**), προσθέτονταν 10μl του αρχικού κύριου μίγματος (χωρίς το DNA) στο πηγαδάκι 12A, στη θέση 96 της Cyclerplate πλάκας (Σχήμα 11).
- Στη συνέχεια, προσθέτονταν 200μl δείγματος DNA, το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί αραίωση με νερό ώστε να αποκτήσει συγκέντρωση 50-100ng/μl, μέσα στο αρχικό κύριο μίγμα.
- Ακολουθούσε ανακίνηση του κύριου μίγματος (master mix), όπως ονομαζόταν τώρα, με δονητικό αναδευτήρα και μία γρήγορη φυγοκέντρηση.
- Μοιράζονταν 10μl από το κύριο μίγμα (με το DNA) σε κάθε ένα από τα 95 πηγαδάκια με γρήγορες κινήσεις, τοποθετούνταν τα ειδικά καπάκια (strips) και ακολουθούσε PCR μεγέθυνση στον θερμικό ανακυκλωτή. Η μικροπλάκα μπορούσε επίσης να παραμείνει ως έχει στους 4°C για 8h.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν λοιπόν 10μl (σε κάθε πηγαδάκι) ενώ το PCR πρόγραμμα που εκτελείτο περιλάμβανε τα εξής στάδια:

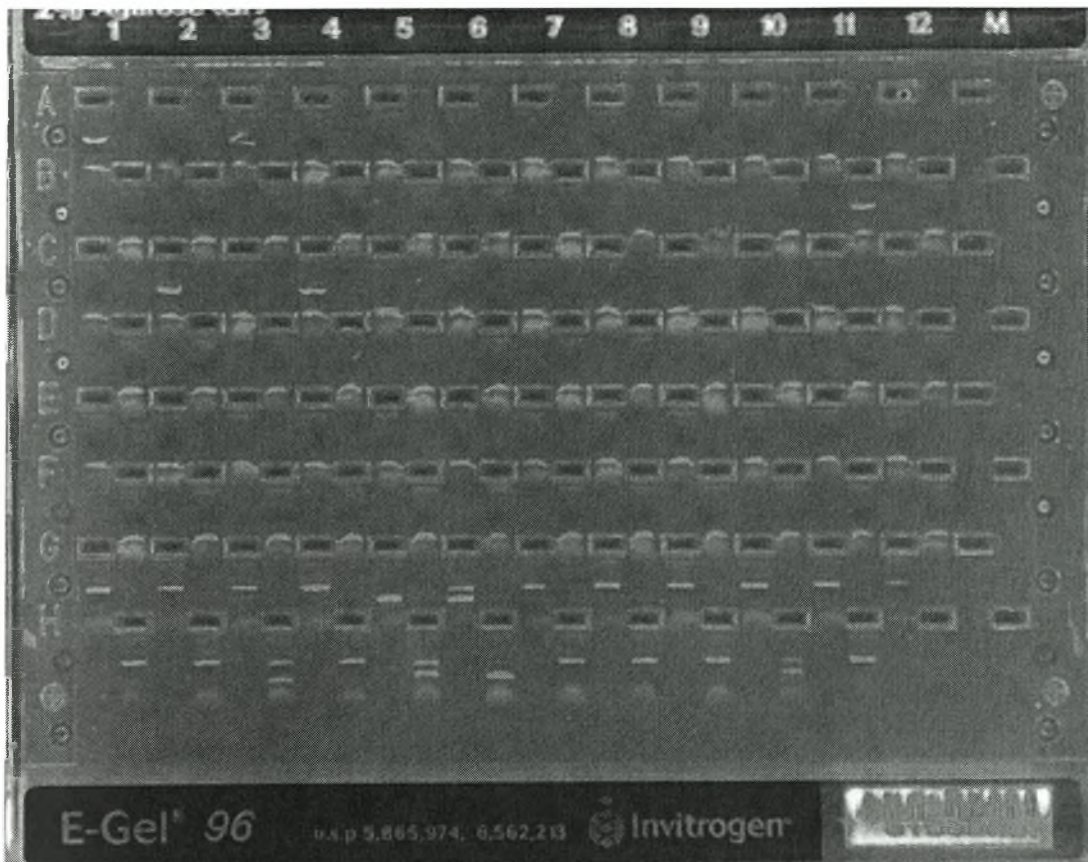
Αρχική Μετουσίωση	94°C	2min	} 10 κύκλοι
Μετουσίωση (Denaturation)	94°C	10sec	
Σύνδεση αφετηριών και Σύνθεση νέου DNA	65°C	60sec	
Μετουσίωση	94°C	10sec	} 20 κύκλοι
Σύνδεση αφετηριών (Annealing)	61°C	50sec	
Σύνθεση νέου DNA (Extension)	72°C	30sec	
Συντήρηση (Hold)	4°C	για πάντα	

	HLA-A			HLA-B						HLA-DR		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
B	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
C	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
D	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
E	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
F	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
G	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
H	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89

Σχήμα 11: Η ειδική Cyclerplate πλάκα των 96 φρεατίων.

1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η παρουσία ή απουσία του προϊόντος PCR ανιχνεύεται με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η πηκτή αγαρόζης (η οποία παρεχόταν στο εργαστήριο και δε χρειαζόταν να παρασκευαστεί) τοποθετούνταν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθέτονταν αρχικά 15μl νερό σε όλες τις σχισμές και έπειτα 5μl PCR προϊόντος επίσης σε κάθε σχισμή της πηκτής. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διαρκούσε μόλις 10min στα 170V, οπότε η πηκτή μεταφερόταν σε μία τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για την ανάγνωση και φωτογράφιση των αποτελεσμάτων. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων γινόταν χρήση του προγράμματος **PROTRANS HLA typing software Helmborg SCORE**, το οποίο μας έδινε απευθείας τα HLA-A*, -B*, -DRB1* αλληλία κάθε ατόμου, ανάλογα με το συνδυασμό μπαντών στην πηκτή αγαρόζης (σχήμα 12) (Bunce et al.1999). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα HLA τάξης I αλληλία είχαν μέγεθος πάνω από 125 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp), ενώ τα HLA τάξης II είχαν μέγεθος κάτω από 280 bp. Επίσης, ο εσωτερικός μάρτυρας για τα HLA τάξης I έδινε μάντα στην πηκτή μεγέθους 90 bp, ενώ ο εσωτερικός μάρτυρας των HLA τάξης II αλληλίων έδινε μάντα μεγέθους 440bp.



Σχήμα 12: Απεικόνιση HLA-A*, -B*, -DRB1* τυποποίησης ενός ατόμου με την PCR-SSP μέθοδο.

2. Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μετά από μεγέθυνση του DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση της μικροσφαιριδιακής κυτταρομετρικής τεχνολογίας LIFEMATCH (LIFEMATCH HLA-SSO).

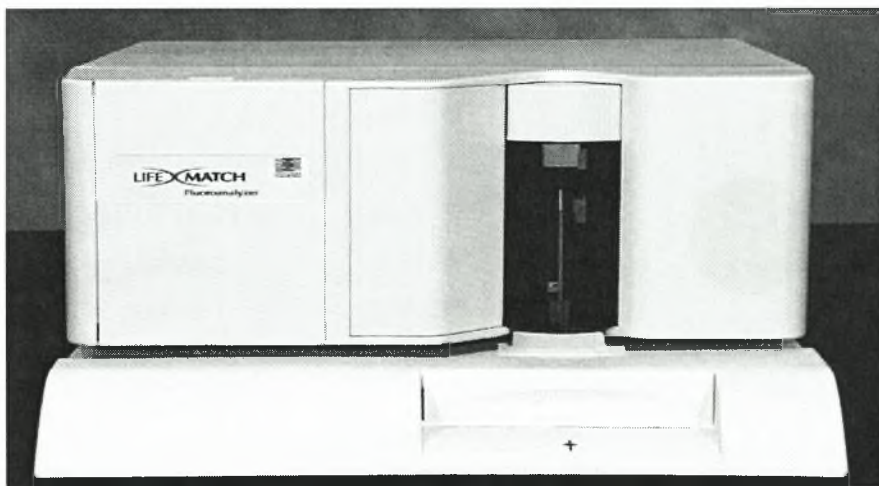
2.1 Αρχές της διαδικασίας-Λειτουργία LIFEMATCH

Η διαδικασία εξακρίβωσης LIFEMATCH HLA-SSO βασίζεται στον υβριδισμό ιχνηθετημένου μονόκλωνου προϊόντος PCR σε ιχνηλάτες SSO. Η ενίσχυση του DNA με χρήση PCR συνήθως χρησιμοποιεί ισομοριακές ποσότητες πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή για την παραγωγή δίκλωνου προϊόντος DNA. Ωστόσο, αν η ποσότητα του ενός εκκινητή είναι σε περίσσεια σε σχέση με τον άλλο, η αντίδραση παράγει, εκτός από το δίκλωνο DNA, μια ποσότητα μονόκλωνου DNA. Κατά τους αρχικούς κύκλους του βήματος ενίσχυσης LIFEMATCH παράγεται δίκλωνο DNA. Αφού εξαντληθεί ο περιοριστικός εκκινητής, ο υπόλοιπος εκκινητής χρησιμοποιεί το δίκλωνο προϊόν ως εκμαγείο για την παραγωγή μονόκλωνου DNA. Η μέθοδος αυτή παράγει δίκλωνο και μονόκλωνο προϊόν τα οποία, αφού μετουσιωθούν,

θα συμμετάσχουν και τα δύο στην αντίδραση υβριδισμού (Cesbron-Gautier et al.2004).

Καθένας από τους διαφορετικούς ιχνηλάτες μπορεί να είναι ομόλογος προς μία αλληλουχία στο ενισχυμένο DNA η οποία είναι μοναδική σε ένα αλληλόμορφο ή μια ομάδα αλληλομόρφων. Με άλλα λόγια, οι ιχνηλάτες είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε κάθε ιχνηλάτης να υβριδοποιεί κατά προτίμηση μια συμπληρωματική περιοχή που μπορεί να είναι ή να μην είναι παρούσα στο ενισχυμένο DNA. Επιπρόσθετα, το ενισχυμένο DNA επίσης υβριδοποιείται σε έναν ή περισσότερους συναινετικούς ιχνηλάτες ομόλογους προς αλληλουχίες παρούσες σε όλα τα αλληλόμορφα ενός γενετικού τύπου. Η εξακρίβωση SSO μπορεί να επηρεαστεί από τον τύπο του βιολογικού υλικού, τη μέθοδο καθαρισμού, την ποσότητα και την ακεραιότητα του γενωμικού DNA. Επομένως, το σήμα που λαμβάνεται για τον(ους) συναινετικό(ούς) ιχνηλάτη(τες) μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης της επιτυχίας των διαδικασιών ενίσχυσης και υβριδισμού. Επίσης, το σήμα που λαμβάνεται με το συναινετικό ιχνηλάτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών για αλληλόμορφα ιχνηλατών και τη διόρθωση των διακυμάνσεων στην ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος στην αντίδραση υβριδισμού. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από την εξακρίβωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξακριβώσει την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA σε ενισχυμένο DNA και για να προσδιορίσει τα πιθανά αλληλόμορφα στο δείγμα.

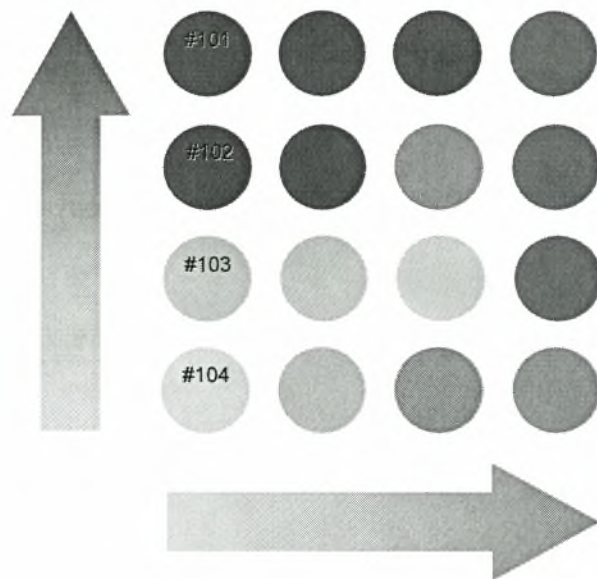
Για τη διαδικασία εξακρίβωσης LIFEMATCH HLA-SSO, οι ιχνηθέτες προσαρτώνται σε μικροσφαίρες Luminex¹⁰⁰ (beads) πολυστυρενίου διαμέτρου 5,6μm που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για χρήση με το Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH (σχήμα 13).



Σχήμα 13: Ο Φθοριοαναλυτής LIFEMATCH.

Ομάδες σφαιριδίων είναι αναγνωρίσιμες σε έναν κώδικα χρωμάτων όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικές αναλογίες (100 αναλογίες) 2 φθορίζουσών χρωστικών (ερυθρή & υπέρυθη). Έτσι, έως και 100 διαφορετικοί πληθυσμοί μικροσφαιρών Luminex¹⁰⁰ μπορούν να αναμιχθούν και να αναλυθούν από το Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH επειδή κάθε πληθυσμός μικροσφαιρών ξεχωρίζει από τη μοναδική φθορίζουσα υπογραφή του ή το χρώμα του (σχήμα 14).

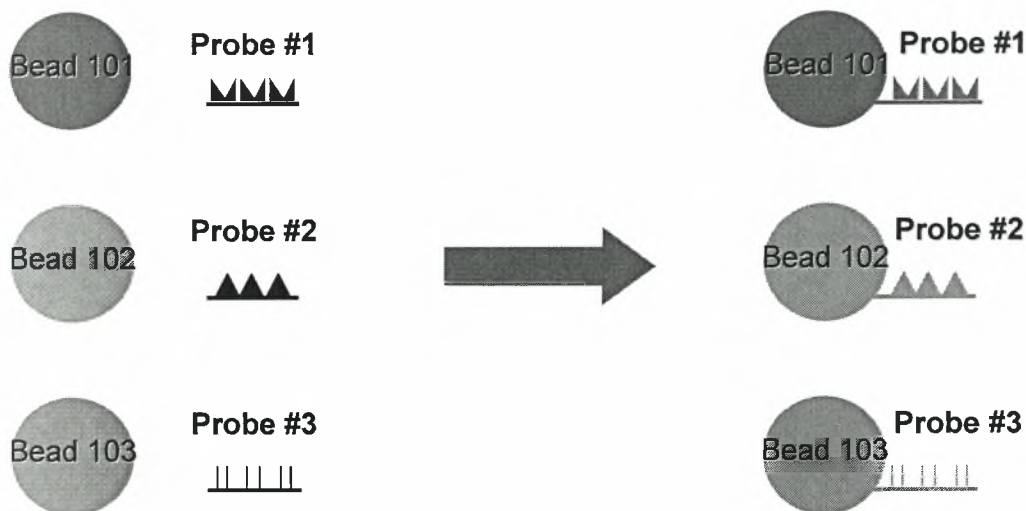
Αναγνώριση των σφαιριδίων



Χαρακτηριστικός εσωτερικός φθορισμός

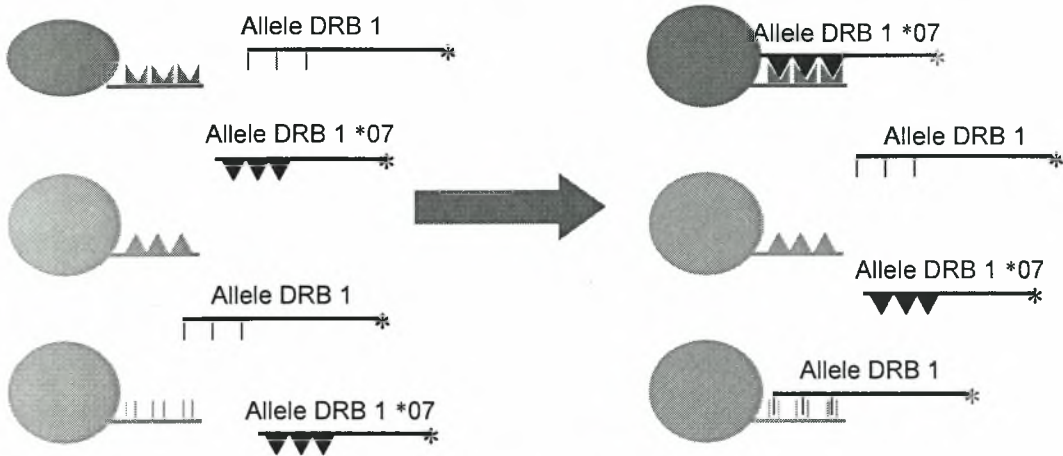
Σχήμα 14: Παραγωγή διαφορετικών σετ σφαιριδίων.

Σε κάθε έγχρωμη μικροσφαίρα μπορεί να προσαρτηθεί διαφορετικός ιχνηλάτης SSO. Επομένως, ένα μίγμα διαφόρων ιχνηλατών μπορεί να διαχωριστεί μέσω της προσάρτησής τους σε διαφορετικές έγχρωμες μικροσφαίρες, όπως φαίνεται και στο σχήμα 15.



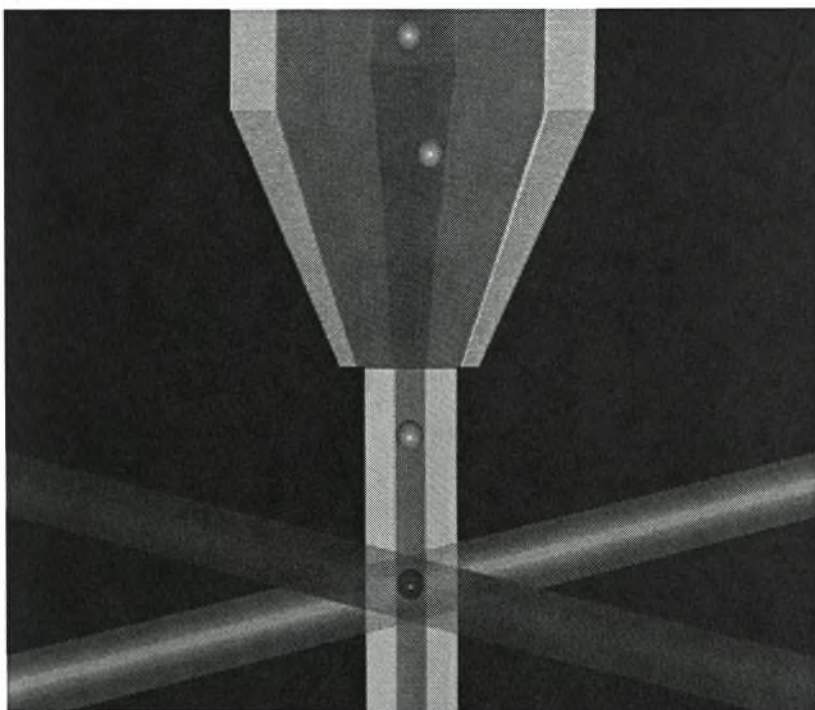
Σχήμα 15: Σφαιρίδια που ενώνονται με τους αντίστοιχους ιχνηλάτες.

Η αντίδραση υβριδισμού του προς ανάλυση DNA με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες γίνεται ως εξής:



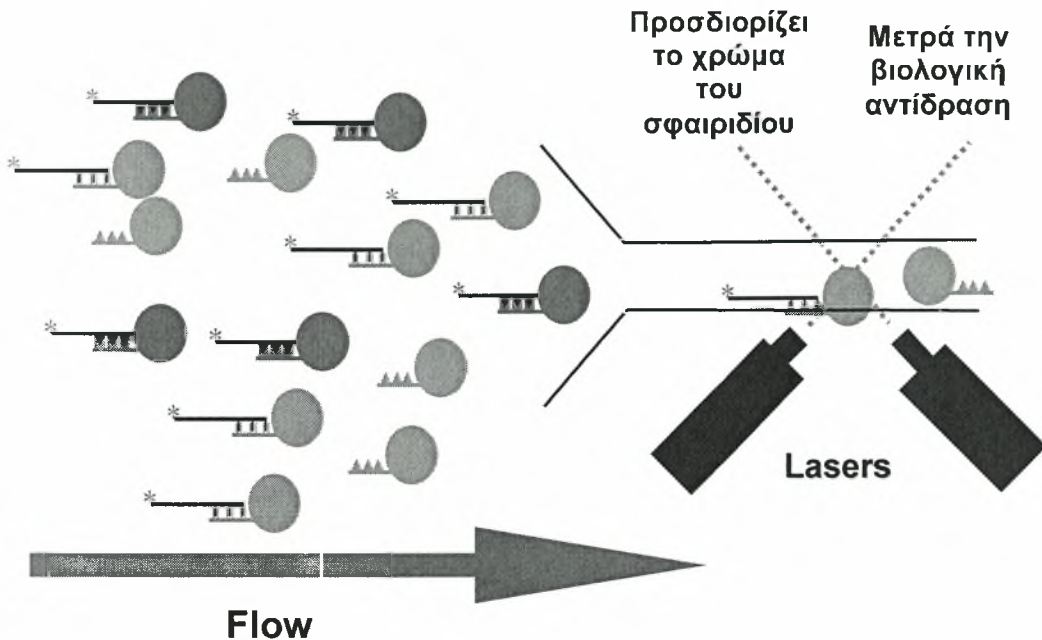
Σχήμα 16: Αντίδραση του προς ανάλυση DNA με το σφαιρίδιο.

Η ανίχνευση της αντίδρασης γίνεται με δύο lasers : ένα laser πράσινο ικανό να ξεχωρίζει τα διαφορετικά σφαιρίδια και ένα laser κόκκινο για να ποσοτικοποιεί τα φθορίζοντα μόρια.



Σχήμα 17: Κόκκινο και πράσινο laser.

Καθώς το δείγμα DNA κινείται προς μία συγκεκριμένη κατεύθυνση ροής και περνάει από τα laser, ο Φθοριοαναλυτής LIFEMATCH ανιχνεύει την αντίδραση και ταυτόχρονα ποσοτικοποιεί τις σχετικές ποσότητες ιχνηθετημένου προϊόντος PCR με υβριδισμό σε κάθε μικροσφαίρα.



Σχήμα 18: Ανίχνευση Σήματος.

Επομένως, το σχετικό σήμα που λαμβάνεται με τους ιχνηλάτες SSO στον προσδιορισμό LIFEMATCH, όπως και με άλλες μεθόδους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό των ιχνηλατών σαν να έχουν θετική ή αρνητική αντιδραστικότητα με το δείγμα ενισχυμένου DNA. Αυτό, με τη σειρά του, παρέχει τις πληροφορίες που απαιτούνται για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου HLA του δείγματος.

2.2 Η Διαδικασία

Στη συγκεκριμένη μέθοδο τυποποίησης ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

A. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA γινόταν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην ανάλυση της PCR-SSP τεχνικής, με τη διαφορά ότι η τελική συγκέντρωση γενωμικού DNA για τη LIFEMATCH HLA-SSO έπρεπε να είναι 10-200ng/μl.

B. Μεγέθυνση του DNA (PCR)

Το ρυθμιστικό διάλυμα 10x PCR (BF), τα dNTP's και οι εκκινητές (PR) για τους κατάλληλους γενετικούς τόπους αφήνονταν να θερμανθούν σε θερμοκρασία

δωματίου. Αναμιγνύονταν απαλά με δονητικό αναδευτήρα τα αντιδραστήρια για 10sec περίπου, ώστε να διασφαλιστεί ότι τα άλατα είναι στο διάλυμα. Με βάση τον Πίνακα 2, παρασκευαζόταν ένα κύριο μίγμα (master mix) για n+1 αντιδράσεις ή αλλιώς για n+1 άτομα (διότι πάντα υπάρχουν απώλειες), χρησιμοποιώντας την κατάλληλη ποσότητα καθενός συστατικού ανά αντίδραση (εκτός από το DNA που προσθέτονταν κάθε φορά τελευταίο). Ο τελικός όγκος ανά αντίδραση δείγματος με νερό χωρίς νουκλεάση ήταν 50μl. Τελικά, το κύριο μίγμα αναμειγνυόταν απαλά, φυγοκεντρούνταν μέχρι τις 4500rpm και μεταφερόταν στον πάγο, ώστε να μη χαλάσουν τα συστατικά του. Με μια πιπέτα, μεταφερόταν η κατάλληλη ποσότητα γενωμικού DNA (~200ng) στα σωληνάρια PCR. Έπειτα, χωριζόταν σε κλάσματα το κύριο μίγμα στα σωληνάρια PCR που περιείχαν το γενωμικό DNA, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος του κύριου μίγματος και του γενωμικού DNA να είναι ίσος με 50μl για κάθε αντίδραση δείγματος. Τα καπάκια των σωληναρίων PCR σφιγγόταν καλά ώστε να μη συμβεί εξάτμιση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, οπότε τα δείγματα ήταν έτοιμα να εκτελέσουν το αντίστοιχο πρόγραμμα στον θερμικό ανακυκλωτή (Πίνακας 3).

Πίνακας 2: Συστατικά αντίδρασης για ενίσχυση

Συστατικό	Ποσότητα ανά αντίδραση δείγματος PCR
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x PCR	5μl
10x dNTPs	5μl
Μίγμα εκκινητή LIFEMATCH	5μl
Γενωμικό DNA 10-200ng/μl	Συνολικά 3μl
TAQ πολυμεράση	0,5μl
Νερό χωρίς νουκλεάση	Τελικός όγκος 50μl

Πίνακας 3: Συνθήκες θερμικού ανακυκλωτή για ενίσχυση

95°C για 5min

Αριθμός κύκλων: 1

95°C για 30sec

60°C για 45sec

72°C για 45sec

Αριθμός κύκλων: 8

95°C για 30sec

63°C για 45sec

72°C για 45sec

Αριθμός κύκλων: 32

72°C για 15min

Γ. Υβριδισμός

Το ενισχυμένο προϊόν της PCR τοποθετούνταν στη συντήρηση ώσπου να γίνει η προετοιμασία των κατάλληλων αντιδραστηρίων του υβριδισμού. Εάν δεν επρόκειτο να ακολουθήσει αμέσως υβριδισμός, θα μπορούσε να διατηρηθεί έως και ένα μήνα στους -20°C .

Πριν την έναρξη της διαδικασίας υβριδισμού, τα σφαιρίδια εναιωρούνταν πλήρως αλλά και τα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού του μίγματος ιχνηλατών LIFEMATCH έπρεπε να είναι διαλυτοποιημένα.

Αρχικά λοιπόν, γινόταν εκκίνηση του Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH ούτως ώστε να προθερμανθούν τα σφαιρίδια για 30min. Ακολουθούσε θέρμανση του μίγματος ιχνηλατών σε θερμοαντική πλάκα στους $55-60^{\circ}\text{C}$ για τουλάχιστον 5-10min, χρήση της συσκευής υπερήχων για λίγο (περίπου 15sec) και ανακίνηση σε δονητικό αναδευτήρα για 15sec με σκοπό να διαλυτοποιηθούν πλήρως τα συστατικά του (σφαιρίδια).

Σε μια ειδική 96-φρεατίων πλάκα, δημιουργούνταν κλάσματα των 5ml προϊόντος για κάθε ειδικό γενετικό τόπο (με χρήση ειδικής 8-κάναλης πιπέτας για συντόμευση της διαδικασίας), στα οποία τοποθετούνταν έπειτα από 15ml μίγματος ιχνηλατών σε κάθε πηγαδάκι. Κατά την κλασμάτωση μίγματος ιχνηλατών σε περισσότερα από 8 πηγαδάκια, αναμιγνύονταν απαλά το μίγμα ιχνηλατών με δονητικό αναδευτήρα κάθε φορά που συμπληρώνονταν ομάδα των 8 φρεατίων.

Τέλος, η πλάκα σφραγιζόταν με μια ειδική μεμβράνη και τα δείγματα τοποθετούνταν στον θερμικό ανακυκλωτή, έτοιμα να ακολουθήσουν το ειδικό πρόγραμμα υβριδοποίησης υπό τις ακόλουθες συνθήκες επώασης:

Πίνακας 4: Συνθήκες θερμικού ανακυκλωτή για υβριδισμό

97°C για 5min

47°C για 30min

56°C για 10min

56°C ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ

Κατά τον υβριδισμό των δειγμάτων, γινόταν η παρασκευή ενός μίγματος 1:200 διαλύματος αραιώσης/PE-Στρεπταβιδίνης. Συγκεκριμένα, συνδυαζόταν 170ml διαλύματος αραιώσης (DS) και 0,85ml PE-Στρεπταβιδίνης (SA-PE) ανά δείγμα. Βεβαίως θα έπρεπε να παρασκευαστεί αρκετή ποσότητα μίγματος διαλύματος αραιώσης για $n+1$ δείγματα ώστε να αντισταθμιστούν οι απώλειες κατά τη μεταφορά με πιπέτα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Όγκοι παρασκευής διαλύματος αραιώσης

Αριθμός δειγμάτων	Διάλυμα αραιώσης(DS)	PE-Στρεπταβιδίνη (SA-PE)
1	170	0,85
5	850	4,25
10	1700	8,5
15	2550	12,75
20	3400	17
25	4250	21,25

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι λόγω φωτοευαισθησίας της PE-Στρεπταβιδίνης, το μίγμα διαλύματος αραιώσης/PE-Στρεπταβιδίνης φυλασσόταν σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αραιώσης μπορούσε να θερμανθεί στους 45°C για 5min και να αναμιχθεί με δονητικό αναδευτήρα μόλις παραληφθεί, κάτι που διασφάλιζε σαφώς ότι όλα τα συστατικά του ήταν διαλυμένα.

Στους 56°C με διατήρηση(hold), με την πλάκα στο θερμικό ανακυκλωτή, κάθε δείγμα αραιωνόταν (με χρήση της επαναληπτικής πιπέτας) με 170μl από το παρασκευασμένο μίγμα διαλύματος αραιώσης/PE-Στρεπταβιδίνης. Απομακρυνόταν η πλάκα των δειγμάτων από το θερμικό ανακυκλωτή και τοποθετούνταν στο Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH.

Δ. Ανάλυση των δειγμάτων με χρήση του Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH

Για βέλτιστα αποτελέσματα τα δείγματα προσδιορίζονταν αμέσως χρησιμοποιώντας τον Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH. Τα δείγματα μπορούσαν να μετρηθούν έως και 30min μετά την αραιώση και αν δεν μετρούνταν αμέσως, έπρεπε να προστατευτούν απαραίτητως από το φως.

Κατ' αρχήν, γινόταν όπως προαναφέρθηκε, εκκίνηση του Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH 30min έως 4h πριν από τον προσδιορισμό των δειγμάτων. Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων στο Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH ετοιμαζόταν μια ανάλυση παρτίδας (Batch Run) με την οποία θα αναλύονταν τα δείγματα.

Συγκεκριμένα, επιλέγονταν το **Create a new batch** (Δημιουργία νέας παρτίδας) από το μενού File (Αρχείο). Για παράδειγμα, αν γινόταν ανάλυση που αφορούσε στα HLA-A, προσθέτονταν παρτίδα για HLA-A. Το εκμαγείο παρτίδας (Batch Template) ονομαζόταν στη συγκεκριμένη περίπτωση HLA-A. Έπειτα, ακολουθούσαν τα βήματα των οδηγιών δημιουργίας ομάδων που εμφανίζονταν στην οθόνη. Κάθε φορά που ονομαζόταν η παρτίδα, δεν έπρεπε να συμπεριληφθούν κόμματα στο όνομα, διότι οι πληροφορίες μετά το κόμμα χάνονταν κατά την εξαγωγή των δεδομένων.

Έπειτα, έπρεπε να κάνουμε κλικ στο κουμπί εκτίναξης ώστε να εκτιναχθεί η βάση συγκράτησης της θερμαντικής πλάκας XYP, όπου μπορούσε να τοποθετηθεί η πλάκα του θερμικού ανακυκλωτή με τα 96 φρεάτια, η οποία περιέχει τα δείγματα. Μετά από κλικ που γινόταν στο εικονίδιο Retract (Απόσυρση), τα δείγματα ήταν πια έτοιμα για ανάλυση. Μετά την ανάλυση των δειγμάτων από το όργανο, έπρεπε να εκτελεστεί ένα βήμα καθαρισμού με 70% Ισοπροπανόλη ή απεσταγμένο H₂O και στη συνέχεια να ακολουθήσουν δύο βήματα πλύσης. Τελικά, αφού ολοκληρωνόταν η ανάλυση μιας παρτίδας, τα δεδομένα εξάγονταν ως αρχείο τιμών διαχωρισμένων με κόμμα (csv). Τα αρχεία αυτά έφεραν το όνομα 'OUTPUT.CSV' και παρέμεναν αποθηκευμένα σε ένα φάκελο με το όνομα παρτίδας καταχωρισμένο στο Luminox 100 IS. Τα δεδομένα αυτά ήταν κατόπιν διαθέσιμα για την εκτέλεση διαφόρων εξακριβώσεων.

2.3 Αποτελέσματα

Η εξακρίβωση των δειγμάτων εκτελούνταν ως εξής :

Τα παραγόμενα αρχεία CSV ανοίγονταν και τα δεδομένα μπορούσαν να υποστούν επεξεργασία με συνηθισμένα προγράμματα λογιστικών φύλλων όπως το Microsoft Excel, Lotus 123. Corel Quattro Pro ή παρόμοιο λογισμικό.

Κατ' αρχάς, επαληθευόταν ο **Number of Events** (Αριθμός συμβάντων) για κάθε SSO σε κάθε δείγμα, πληροφορίες οι οποίες βρίσκονταν στην ενότητα **Data Type: Count** (Τύπος δεδομένων: Καταμέτρηση) του αρχείου CSV. Έπειτα εξακριβωνόταν ότι οι τιμές για τους συναινετικούς ιχνηλάτες ήταν μεγαλύτερες από τη **διάμεση ένταση φθορισμού ή MFI**. Τα ελάχιστα κατώφλια ήταν ειδικά της κάθε παρτίδας και μπορούσαν να βρεθούν στον Πίνακα κατωφλιών¹. Στη συνέχεια, αφαιρούνταν η τιμή του Background Control (Μάρτυρα θορύβου) για κάθε ιχνηλάτη από τις τιμές των δειγμάτων , έτσι ώστε να προκύψει το διορθωμένο ως προς το θόρυβο σετ δεδομένων. Οι τιμές των μαρτύρων θορύβου ήταν ειδικές της παρτίδας και μπορούσαν να βρεθούν στον Πίνακα κατωφλιών. Οι τιμές θορύβου ήταν οι μέσες τιμές MFI για κάθε σφαιρίδιο με τις οποίες αντισταθμιζόταν ο θόρυβος του υπόβαθρου που οφείλονταν στις διακυμάνσεις των σφαιριδίων. Ακολούθως, για κάθε δείγμα, διαιρούνταν τα διορθωμένα για θόρυβο δεδομένα για κάθε ιχνηλάτη με τη διορθωμένη για θόρυβο τιμή του αντίστοιχου συναινετικού ιχνηλάτη για να προκύψει το κανονικοποιημένο σετ δεδομένων.

MFI (Ιχνηλάτης) – MFI (Τυφλός μάρτυρας για ιχνηλάτη)

MFI (Συναινετικός) - MFI (Τυφλός μάρτυρας για συναινετικό)

Έπειτα, για κάθε ιχνηλάτη, καταγράφονταν η κανονικοποιημένη τιμή στο Φύλλο εργασίας με τον Πίνακα κατωφλιών και αφού αντιστοιχίζονταν όλες οι τιμές, το μοτίβο δραστηριότητας των ιχνηλατών (δηλαδή ο συνδυασμός όλων των θετικών και αρνητικών αντιστοιχίσεων για ένα συγκεκριμένο δείγμα) μπορούσε να συγκριθεί με τον παρεχόμενο Πίνακα δραστηριότητας ιχνηλατών. Όπως φαίνεται στο σχήμα 19, τα 'πράσινα κουτάκια' αποτελούσαν τιμές που υποδείκνυαν ανάμεσα στην κατώτερη θετική και υψηλότερη αρνητική τιμή για τον συγκεκριμένο ιχνηλάτη. Οι δύο αυτές τιμές προέκυπταν 'τεστάροντας' 100 θετικά και 100 αρνητικά δείγματα γι' αυτόν τον ιχνηλάτη. Όταν η τιμή του εν λόγω ανιχνευτή έτεινε προς την κατώτερη θετική τιμή, την 'τικάραμε' ως θετική, ενώ όταν έτεινε προς την κατώτερη αρνητική, τη δεχόμασταν ως αρνητική (χωρίς 'τικ').

¹ Σε ότι αφορά τους Πίνακες κατωφλιών, πρέπει να ειπωθεί ότι είναι ειδικοί της κάθε παρτίδας, ενώ σε κάθε γενετικό τόπο αντιστοιχεί χωριστός πίνακας κατωφλιών. Αν μια κανονικοποιημένη τιμή για ένα συγκεκριμένο ιχνηλάτη βρίσκεται πάνω από το μέγιστο 'κατώφλι' για μια αρνητική αντιστοίχιση και κάτω από την ελάχιστη τιμή για μια θετική αντιστοίχιση, το δείγμα θα πρέπει να θεωρηθεί απροσδιόριστο για το συγκεκριμένο ιχνηλάτη. Αν είναι επιθυμητό, ο συγκεκριμένος ιχνηλάτης μπορεί να ληφθεί υπόψη ή μπορεί να γίνει εξακρίβωση του δείγματος με την υπόθεση πρώτα ότι η τιμή είναι αρνητική και μετά την υπόθεση ότι η τιμή είναι θετική.

LifeCodes Quicktype 2000 (Lifematch Version) - [Sample Probe Hits]

Panel ID: M042001E Probe Hit Table: GENERIC.DRS

Probe	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	CON
Pos	0.8	2.1	1	1.8	1.3	0.42	0.89	2	0.64	1.73	1.5	3.2	0.7	0.85	0.47	0.25	1.76	2.2	0.14	2.34	0.94	0
Neg	0.25	1.07	0.83	0.5	0.73	0.2	0.36	0.38	0.44	0.42	0.71	0.42	0.59	0.67	0.25	0.19	1.53	1.1	0.11	0.8	0.84	0

Well	Sample ID	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	CON
A1	63660	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0.064	4.479	0.029	0.014	0.029	0.014	0.014	0.014	0.021	2.914	0.057	0.043	0	1.257	0.45	0.021	0.071	3.457	0.271	3.286	0.143	
B1	63856	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0.035	0.028	1.31	2.394	0.014	0.028	1.197	0.007	0.028	0.014	0.014	0.028	-0.013	0.254	0.585	0.366	0.437	0.099	0.38	3.282	0.866	
C1	63850	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0.023	0.061	0.227	2.439	0.03	0.076	1.515	0.061	0.061	0.03	0.03	0.015	1.659	0.258	0.614	0.53	0.485	0.098	0.379	3.477	0.682	
D1	63920	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0.006	3.731	0.038	0	1.865	0.019	1.5	0.026	0.026	0.038	0.038	0.013	0.026	1.769	0.045	0.026	2.705	3.795	0.038	0.038	0.09	
E1	63918	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0.044	0.018	0.044	0.018	0.061	0.009	2.202	3.395	1.316	0	0.018	0.018	2.272	0.07	0	0.07	3.877	0.035	0.605	0.009	0.053	
F1	63967	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0.026	0	1.621	0	2.259	0.043	2.31	0.216	0.121	0.017	0	0.06	0.103	0.052	0.043	0.448	3.534	0.034	0.353	0.017	0.103	
G1	63974	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0.043	0	0	0	0.017	0.009	2.164	0.06	0.034	-0.016	-0.016	0.034	2.052	0.034	0.095	0.034	4.017	0.052	0.569	0.017	0.069	
H1	64018	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0.037	-0.012	1.95	0	0	-0.012	2.862	0.1	0.05	0.013	-0.049	0.025	0.05	0.05	-0.012	0.525	0.725	0.075	0.575	0.025	0.125	
I1	64034	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
		0	0.045	1.424	2.788	0	0.068	1.273	0.121	0.106	-0.014	0	0	0.076	0.258	0.598	0.333	0.652	0.083	0.424	3.409	1.114	

Σχήμα 19 :Ενδεικτικές τιμές ιχνηλατών σε δείγματα που δουλεύτηκαν με τον LIFEMATCH.

Γενικότερα, οι αναμενόμενες τιμές για κάθε ιχνηλάτη ανήκαν σε τρεις κατηγορίες: Αρνητική, Θετική ή Απροσδιόριστη. Μια ‘απροσδιόριστη τιμή’ αντιπροσώπευε ένα εύρος τιμών στο οποίο δεν είχαν παρατηρηθεί ούτε αρνητικές ούτε θετικές τιμές. Αν ένα δείγμα περιλάμβανε απροσδιόριστες τιμές για συγκεκριμένο ιχνηλάτη SSO, η εξακρίβωση του δείγματος έπρεπε να γίνει με την υπόθεση ότι ο ιχνηλάτης ήταν αρνητικός και κατόπιν με την υπόθεση ότι ο ιχνηλάτης ήταν θετικός. Έτσι προέκυπταν τρεις περιπτώσεις:

- Μία από τις επιλογές (δηλαδή η θετική ή η αρνητική) εμφάνιζε ταύτιση, ενώ η άλλη δεν εμφάνιζε.
 - Η υπόθεση που οδηγούσε στην ταύτιση του αλληλομόρφου ήταν πιθανώς σωστή. Το δείγμα μπορούσε να επαναπροσδιοριστεί για επιβεβαίωση.
- Και οι δύο επιλογές εμφάνιζαν ταύτιση.
 - Το δείγμα μπορούσε να επαναπροσδιοριστεί ή μπορούσαν να αναφερθούν τα αλληλόμορφα που ελήφθησαν και από τις δύο εξακριβώσεις.

3. Καμία επιλογή δεν εμφάνιζε ταύτιση.

- Στην περίπτωση αυτή, ήταν πιθανό να υπάρχει λανθασμένη αντιστοίχιση ιχνηλατών. Το δείγμα έπρεπε να επαναπροσδιοριστεί και πιθανώς να ενισχυθεί πάλι.
- Αν υπήρχαν περισσότεροι από δύο ιχνηλάτες με απροσδιόριστη τιμή, το δείγμα έπρεπε να επαναπροσδιοριστεί.
- Αν ένα σχέδιο δραστηριότητας ιχνηλατών δεν παρήγαγε εξακρίβωση HLA, το δείγμα έπρεπε να ενισχυθεί πάλι και να επαναπροσδιοριστεί. Μπορεί επίσης να χρειαζόταν να απομονωθεί πάλι DNA από το δείγμα, να ενισχυθεί πάλι και να επαναπροσδιοριστεί.
- Ωστόσο, όπως έχει αναφερθεί και πριν, η εφαρμογή του πρωτοκόλλου ήταν κρίσιμης σημασίας. Οποιαδήποτε απόκλιση μπορούσε να προκαλέσει αποτυχία εξακρίβωσης του δείγματος.

Παραπάνω περιγράφηκαν τα βήματα που ακολουθούνταν κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Για να προκύψουν όμως αξιόπιστα αποτελέσματα, έπρεπε να συλλέγονται επαρκή δεδομένα κάθε φορά από τον Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί εδώ ότι τα μίγματα ιχνηλατών LIFEMATCH περιείχαν ένα ή περισσότερα SSO (με τις ενδείξεις 200 και 300 για γενετικούς τύπους Τάξης I και Con για τους γενετικούς τύπους Τάξης II) που υβριδοποιούνταν με όλα τα αλληλόμορφα HLA-A Exon 2(200) ή Exon 3(300), HLA-B Exon 2(200) ή Exon 3(300) και Con για την Τάξη II (σχήμα 20). Τα μίγματα αυτά ενεργούσαν ως εσωτερικοί μάρτυρες για να επαληθεύσουν τη σωστή εκτέλεση των αντιδράσεων και υβριδισμών PCR. Αν δε λαμβάνονταν η ελάχιστη τιμή για αυτά τα SSO, το δείγμα μπορεί να μην παρήγαγε τη σωστή εξακρίβωση οπότε ο έλεγχος του δείγματος έπρεπε να επαναληφθεί.

Step 1 - Raw Imported Data
Select Control Blank, Edit Sample Names

Status	LOCATION	SAMPLE	CON	05	13	14	15	21	23	25	27	28
No DNA	1	63680	9.000	3.500	25.500	.000	21.000	7.000	11.000	9.000	22.500	9.000
OK	2	63858	57.500	6.000	24.000	6.000	22.000	11.000	12.000	124.000	25.000	9.000
OK	3	63850	72.000	7.000	170.000	5.500	25.000	8.500	11.000	100.000	28.000	10.000
OK	4	63920	60.500	191.000	23.000	8.000	24.000	9.500	12.000	16.000	27.000	105.500
OK	5	63918	70.000	9.000	174.000	5.500	23.000	8.000	10.000	95.000	25.000	10.000
OK	6	63967	50.000	131.500	21.000	4.000	21.000	8.000	9.500	71.500	23.000	40.000
OK	7	63974	73.000	7.000	183.000	6.000	22.000	8.000	10.000	96.000	27.000	9.000

Σχήμα 20: Ενδεικτικά αποτελέσματα που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία σε δείγματα που δουλεύτηκαν με τον LIFEMATCH και οι τιμές CON.

Τέλος, μετά την κατάλληλη επεξεργασία στις τιμές των ιχνηλατών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα αποτελέσματα της DNA τυποποίησης αποθηκεύονταν και ήταν διαθέσιμα ανά πάσα στιγμή για ανάγνωση ή οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία (σχήμα 21).

Lifecodes Quicktype 2000 [Lifematch Version] - [Final Typing Assignments]

9409 E1 Confirmed To Send

Assignment Info			Reviewer Info			
Locus	Panel ID	Probe Hit Table	AG1	AG2	Msg Sent	Msg Date
HLA A						
HLA B						
H2A C						
DP						
DQ						
DRB1	010227Rd2	GENERIC-DRB	15021	1001		
DRB3						
DRB4						
DRB5	010227Rd2	GENERIC-DRB	01CGF			

Suggested typing: DRB Flip most frequent Allele occurring in 90 % of pairs

Panel ID	Probe Hit Table	Well	DRB1 AG1	DRB1 AG2	DRB3 AG1	DRB3 AG2	DRB4 AG1	DRB4 AG2	DRB5 AG1
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	15021	1001					01CGF
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	15011	1001					01CGF
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	15021	1001					01CGF
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	15023	1001					01CGF
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	15012	1001					01CGF
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	15022	1001					01CGF
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	1507	1001					01CGF
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	1506	1001					01CGF
010227Rd2	GENERIC-DRB	E1	16011	1001					0203

Panel: 010227Rd2 Sample: 9409

Σχήμα 21: Ενδεικτικά αποτελέσματα της LIFEMATCH τυποποίησης στην τελική τους μορφή.

2.4 Περιορισμοί της διαδικασίας

Οι συνθήκες PCR και προσδιορισμού που εφαρμόστηκαν απαιτούσαν επακριβώς ελεγχόμενες συνθήκες. Αποκλίσεις από αυτές τις παραμέτρους μπορούσαν να οδηγήσουν σε αποτυχία του προϊόντος. Όλα τα όργανα έπρεπε να είναι βαθμονομημένα σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή και να χρησιμοποιούνται εντός των παραμέτρων που όριζε ο κατασκευαστής. Τα σφαιρίδια έπρεπε όπως ειπώθηκε να προθερμανθούν και να εναιωρηθούν καλά πριν από τη χρήση τους. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλιζόνταν ότι είναι διαλυμένα τα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού. Ακόμη, οι επώσεις στους 47°C και 56°C κατά τη διάρκεια εκτέλεσης του προγράμματος υβριδοποίησης, απαιτούσαν υψηλό βαθμό ακρίβειας (+/- 0,5°C). Έπρεπε να χρησιμοποιηθεί θερμικός ανακυκλωτής. Η θερμοκρασία μέσα στα φρεάτια και μεταξύ των φρεατίων δεν έπρεπε να παρουσιάζει διακυμάνσεις μεγαλύτερες από +/- 0,5°C.

Ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων στους 56°C ήταν κρίσιμης σημασίας και δεν έπρεπε να υπερβαίνει τα 15min συνολικά. Σε αυτόν τον χρόνο περιλαμβανόταν η δεκάλεπτη επώαση και ο χρόνος 5min το πολύ για την αραίωση όλων των δειγμάτων με μίγμα διαλύματος αραίωσης/PE-Στρεπταβιδίνης. Μετά την αραίωση, τα δείγματα ήταν σταθερά σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα δύο ωρών (αρκεί να προστατεύονται από το φως). Εφόσον μία πλήρης πλάκα 96 φρεατίων μπορεί να χρειάζοταν έως 1,5h για να μετρηθεί στο Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH, η ανάλυση έπρεπε να ξεκινήσει όχι αργότερα από 30min μετά την αραίωση για να διασφαλιστεί ότι και το τελευταίο δείγμα αναλύθηκε εντός του ορίου των δύο ωρών. Τέλος, δε συνίστατο η ανάμιξη συστατικών από διαφορετικά kit και παρτίδες.

2.5 Αντιμετώπιση προβλημάτων κατά την εφαρμογή της PCR-SSO LIFEMATCH.

Πρόβλημα	Πιθανή Αιτία	Αντιμετώπιση	
Χαμηλός αριθμός σφαιριδίων	Το μίγμα ιχνηλατών δεν έχει εναιωρηθεί καλά	Προθέρμανση, χρήση της συσκευής υπερήχων και του δονητικού αναδευτήρα και επανάληψη του προσδιορισμού	
	Το όργανο δε λειτουργεί καλά	Εκτός βαθμονόμησης	Βαθμονόμηση του οργάνου
		Η διαδρομή ροής του δείγματος είναι φραγμένη	Αφαίρεση και τοποθέτηση της βελόνας στη συσκευή υπερήχων. Εκτέλεση αντίστροφης πλύσης.
Αποτυχία κατωφλιού CON	Το δείγμα δεν ενισχύθηκε ή ενισχύθηκε ανεπαρκώς	Χαμηλό DNA	Έλεγχος της συγκέντρωσης και καθαρότητας του DNA.
		Άλατα στο dNTPs και στο ρυθμιστικό δ/μα 10x δεν έχουν διαλυθεί	Θέρμανση του 10x dNTPs και του 10x ρυθμιστικού δ/τος στους 37°C για 5min, χρήση του δονητικού αναδευτήρα και φυγοκέντρωση για λίγο.
		Ανεπαρκής Ταq πολυμεράση	Χρησιμοποίηση μόνο ανασυνδυασμένης Ταq.
	Οι συνθήκες ενίσχυσης δε βρίσκονται εντός των καθορισμένων παραμέτρων	Εκτέλεση του θερμικού προφίλ στο θερμικό ανακυκλωτή για επαλήθευση ότι οι παράμετροι βρίσκονται εντός του καθορισμένου εύρους	
	Χαμηλή διάμεση τιμή έντασης φθορισμού(MFI)		Θέρμανση του διαλύματος αραίωσης στους 45°C για 5min 8πριν από τη χρήση και χρησιμοποίηση δονητικού αναδευτήρα.
Αντικατάσταση της Στρεπταβιδίνης-PE.			

Πολλαπλές αποτυχίες SSO ή το δείγμα δεν μπορεί να παράγει αποτέλεσμα εξακρίβωσης HLA	Ενίσχυση ειδική των αλληλομόρφων	Οι συνθήκες ενίσχυσης δε βρίσκονται εντός των καθορισμένων παραμέτρων	Εκτέλεση του θερμικού προφίλ στο θερμικό ανακυκλωτή για επαλήθευση ότι οι παράμετροι βρίσκονται εντός του καθορισμένου εύρους.
	Το δείγμα DNA έχει μολυνθεί		Απομόνωση πάλι DNA από το δείγμα αίματος
	Το DNA έχει αλλοιωθεί μερικώς		Αν δε χρησιμοποιείται ολόκληρη η πλάκα, αφήνεται μια σειρά άδεια σε κάθε πλευρά των δειγμάτων που θα προσδιοριστούν ώστε να σφραγιστεί καλά η πλάκα.
	Εξάτμιση κατά τη διάρκεια του βήματος υβριδισμού		

3. Εργαστηριακός Εξοπλισμός (όργανα)

Φθοριοαναλυτής LIFEMATCH (Luminex XMAP technologies, Orchid Diagnostics).

ΒΑΣΗ LUMINEX¹⁰⁰ XY(προαιρετικό εξάρτημα για την αυτόματη μέτρηση 96 δειγμάτων στον Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH).

Θερμαντική πλάκα 96 φρεατίων (Fisher Scientific Standard Heatblock).

Θερμικός ανακυκλωτής PTC-200 εφοδιασμένος με θερμαινόμενο κάλυμμα (MJ research DNA Tetrad).

Κατάλληλα προγράμματα θερμικού ανακυκλωτή (οι συνθήκες ενίσχυσης και υβριδισμού φαίνονται στους αντίστοιχους πίνακες).

Σφαιρίδια βαθμονόμησης Luminex (Cal 1, Cal 2, Con 1 και Con 2, Orchid Diagnostics).

Δονητικός αναδευτήρας.

Μικροφυγόκεντρος.

Υδατόλουτρο (Medingen).

Φασματοφωτόμετρο με φάσμα UV.

Κυψελίδες χαλαζίου 1ml.

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (PROTRANS).

Προστατευτικά γυαλιά για την υπεριώδη ακτινοβολία.

Φωτογραφική μηχανή Polaroid με ειδικό φιλμ.

Invitrogen E-base για ηλεκτροφόρηση.

Συσκευή λουτρού υπερήχων (Fisher Scientific).
Τροφοδοτικό(πηγή ηλεκτρικού ρεύματος).
Ειδική γυάλινη πλάκα (PCR workstation) (PROTRANS).

4. Αναλώσιμα Υλικά

Σωληνάρια αιμοληψίας με αντιπηκτικό ηπαρίνη των ml.
Πλαστικά μικροσωληνάρια τύπου erpendorf των 1,5ml.
Πλαστικές πιπέτες Pasteur χωρητικότητας 3ml.
Συσκευές πιπεταρίσματος, 8-κάναλες συσκευές πιπεταρίσματος και ανάλογα ρύγχη όγκου 1-20μl, 20-200μl, 1000μl (Thermo Labsystems).
Επαναληπτική πιπέτα με σύριγγα διανομής 1μl.
Invitrogen E-gel για ηλεκτροφόρηση.
Microseal™ Μεμβράνη (MJ research) ή ταινία (Costar R).
Σωληνάρια και καπάκια PCR (AB Gene^R Thermo Strip).

5. Αντιδραστήρια

~Αντιδραστήρια για την απομόνωση του DNA (PEL-FREEZ DNA Isolation):

Δισαπεσταγμένο νερό ddH₂O
Διάλυμα EDTA PH 7.5
Λυτικό Διάλυμα Ερυθρών Αιμοσφαιρίων
Λυτικό Διάλυμα Πυρηνικών Μεμβρανών
Πρωτεΐνάση K
Διάλυμα Απομάκρυνσης Πρωτεϊνών
90% αιθανόλη
70% αιθανόλη

~Αντιδραστήρια για την **HLA-SSP** τυποποίηση **HLA-A**, **HLA-B** και **HLA-DRB1 (PROTRANS)**:

Δισαπεσταγμένο νερό ddH₂O

Διάλυμα D

Διάλυμα Y

TAQ πολυμεράση (Invitrogen Life Technology)

~Αντιδραστήρια για την **LIFEMATCH HLA-SSO** τυποποίηση **HLA-A**, **HLA-B** και **HLA-DRB1 (Orchid Diagnostics)**:

LIFEMATCH PCR Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)

LIFEMATCH dNTPs (10x) (φυλάσσονται στους 4°C μαζί με PCR Ρυθμιστικό

Διάλυμα, το μίγμα ιχνηλατών και το διάλυμα PE-Στρεπταβιδίνης)

Μίγμα εκκινητή LIFEMATCH** (φυλάσσεται στους -20°C, όπως και η TAQ πολυμεράση)

LIFEMATCH μίγμα ιχνηλατών

LIFEMATCH διάλυμα αραιώσης (φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου)

TAQ πολυμεράση (Invitrogen Life Technology)

LIFEMATCH PE-Στρεπταβιδίνη

Νερό χωρίς νουκλεάση (DEMO S.A. Pharmaceutical Industry)

Luminex XMAP^{MT} sheath fluid (περιέχει χλωριούχο νάτριο και φωσφορικό νάτριο)

} φυλάσσονται
σε θερμοκρασία
δωματίου

70% Ισοπροπανόλη

** Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η τυποποίηση του HLA-DRB1 γονιδιακού τόπου γίνεται **πάντα** σε συνδυασμό με τους HLA-DRB DR52 και HLA-DRB DR2 γονιδιακούς τόπους. Επομένως, εκτός από το **HLA-DRB1 μίγμα γενικού εκκινητή**, όπως ονομάζεται, χρειάζονται επίσης ένα **HLA-DRB1 DR52 μίγμα εκκινητή** καθώς και ένα **HLA-DRB1 DR2 μίγμα εκκινητή**. Όλα τα άλλα αντιδραστήρια παραμένουν τα ίδια.

Αποτελέσματα

Η σύγκριση της PCR-SSP τυποποίησης με την PCR-SSO LIFEMATCH μέθοδο έδειξε ποσοστό συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων σε ποσοστό 88,6% και 95,5% για τον HLA-A και HLA-B γονιδιακό τόπο, αντίστοιχα, στο σύνολο των αλληλίων (556) (Πίνακες 6 και 7). Το 9,5% των αλληλίων τυποποιήθηκαν ως A* x με την PCR-SSO LIFEMATCH μέθοδο και το 3,2% των αλληλίων τυποποιήθηκαν ως B* x με την ίδια μέθοδο. Τέλος, ποσοστό 1,9% των αλληλίων για τον HLA-A γονιδιακό τόπο και 1,3% για τον HLA-B γονιδιακό τόπο αποκάλυψε απόκλιση μεταξύ των δύο μεθόδων που συνίσταται στην αναγνώριση διαφορετικών αντιγόνων.

Η σύγκριση της PCR-SSO LIFEMATCH τυποποίησης με την PCR-SSP τυποποίηση δεν έδειξε **καμία απόκλιση** στα DRB1 αλλήλια.

Πίνακας 6: Σύγκριση PCR-SSP και PCR-SSO LIFEMATCH τυποποίησης για τον HLA-A γονιδιακό τόπο στο σύνολο των αλληλίων.

Σύνολο αλληλίων (556)

Καμία διαφορά	88,6 %
Αλλήλιο /A* x ^α	9,5 %
Αλλήλιο /αλληλίου ^β	1,9 %

^αΑλλήλιο /A* x: δεύτερο αλλήλιο A* με την PCR-SSP τυποποίηση αντί του A* x της PCR-SSO τυποποίησης (π.χ. A*2/A* x με την PCR-SSO, A*2/A*3 με την PCR-SSP τυποποίηση).

^βΑλλήλιο /αλληλίου: η PCR-SSP τυποποίηση αναγνώρισε διαφορετικό αλλήλιο A* από αυτό της PCR-SSO τυποποίησης (π.χ. A*2/A*2 με την PCR-SSO, A*2/A*3 με την PCR-SSP τυποποίηση).

Πίνακας 7: Σύγκριση PCR-SSP και PCR-SSO LIFEMATCH τυποποίησης για τον HLA-B γονιδιακό τόπο στο σύνολο των αλληλίων.

Σύνολο αλληλίων (556)

Καμία διαφορά	95,5 %
Αλλήλιο /B* x ^α	3,2%
Αλλήλιο /αλληλίου ^β	1,3 %

^αΑλλήλιο /B* x: δεύτερο αλλήλιο B* με την PCR-SSP τυποποίηση αντί του B* x της PCR-SSO τυποποίησης (π.χ. B*18/B* x με την PCR-SSO, B*18/B*18 με την PCR-SSP τυποποίηση).

^βΑλλήλιο /αλληλίου: η PCR-SSP τυποποίηση αναγνώρισε διαφορετικό αλλήλιο B* από αυτό της PCR-SSO τυποποίησης (π.χ. B*51/B*18 με την PCR-SSO, B51*/B*51 με την PCR-SSP τυποποίηση).

Από το σύνολο των αλληλίων A^*x και B^*x που έδωσε η PCR-SSO LIFEMATCH μέθοδος και τυποποιήθηκαν με την PCR-SSP μέθοδο, αποκαλύφθηκε ομοζυγωτία για το ήμισυ περίπου των αλληλίων, με ποσοστά 5,1% και 1,3% αντίστοιχα. Για τα υπόλοιπα αλλήλια, το A^*x και το B^*x της PCR-SSO LIFEMATCH τυποποίησης αναγνωρίστηκε ως το δεύτερο A^*x και B^*x αλλήλιο, όπως αναγράφεται στους πίνακες 8 και 9.

Πίνακας 8: PCR-SSO LIFEMATCH A^*x που τυποποιήθηκαν με την PCR-SSP τυποποίηση.

	Σύνολο αλληλίων (9, 5%)
Ομοζυγωτία με την PCR-SSP	5,1 %
Δεύτερο αλλήλιο A^* με την PCR-SSP	4,4 %

Πίνακας 9: PCR-SSO LIFEMATCH B^*x που τυποποιήθηκαν με την PCR-SSP τυποποίηση.

	Σύνολο αλληλίων (3,2%)
Ομοζυγωτία με την PCR-SSP	1,3 %
Δεύτερο αλλήλιο B^* με την PCR-SSP	1,9 %

Στα συγκριτικά αποτελέσματα που παρατίθενται παραπάνω δε συμπεριλαμβάνονται οι περιπτώσεις στις οποίες η PCR-SSO LIFEMATCH μέθοδος δεν κατάφερε να διακρίνει μεταξύ δύο αλληλίων (Πίνακας 10). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει απόλυτη ταύτιση των δύο μεθόδων ως προς το πρώτο αλλήλιο, αλλά αδυναμία της PCR-SSO LIFEMATCH μεθόδου να διακρίνει μεταξύ δύο (αλληλίων) ως προς το δεύτερο αλλήλιο, το οποίο επιβεβαιώνει η PCR-SSP μέθοδος. Για παράδειγμα, B^*18B^*40 ή B^*18B^*41 με την PCR-SSO LIFEMATCH και B^*18B^*41 με την PCR-SSP τυποποίηση.

Πίνακας 10: Αδυναμία της PCR-SSO LIFEMATCH τυποποίησης να διακρίνει μεταξύ δύο αλληλίων.

Περίπτωση 1 ^η :	B*40 B*41
»	2 ^η : B*56 B*78
»	3 ^η : B*14 B*18
»	4 ^η : B*55 B*58
»	5 ^η : B*14 B*50
»	6 ^η : B*14 B*51
»	7 ^η : B*18 B*55
»	8 ^η : A*32 A*33

Η απόκλιση μεταξύ των δύο μοριακών μεθόδων αποδείχθηκε ιδιαίτερα συχνή για μερικά αλληλία. Συγκεκριμένα, τη μεγαλύτερη απόκλιση παρουσίασαν τα HLA-A*03, A*24, B*14, B*18, τα οποία, ενώ αναγνωρίστηκαν από την PCR-SSP τυποποίηση, δεν ανευρέθησαν με την PCR-SSO LIFEMATCH τυποποίηση, είτε διότι αποδόθηκαν με άλλο αλληλίο, είτε διότι χαρακτηρίστηκαν ως A*x ή B*x.

Συζήτηση

Για πάνω από τρεις δεκαετίες, η ορολογική τυποποίηση αποτέλεσε τη βασική τεχνική ανάλυσης των HLA τάξης I και II μορίων στα κλινικά εργαστήρια. Το χαμηλό κόστος εφαρμογής της και η γρήγορη ανάλυση που προσέφερε δεν μπόρεσαν ωστόσο να αντισταθμίσουν τα μειονεκτήματά της, δηλαδή την απαίτηση της μεθόδου για ζωντανά λεμφοκύτταρα και επαρκή ποσότητα ειδικού αντι-ορού και γενικότερα το χαμηλό επίπεδο διαχωριστικής ικανότητας που προσέφερε.

Τα τελευταία χρόνια έκαναν την εμφάνισή τους οι μοριακές τεχνικές, οι οποίες αντικατέστησαν την ορολογική τυποποίηση, αν και σε ορισμένα εργαστήρια η τελευταία εξακολουθεί να εφαρμόζεται. Η εφαρμογή των DNA μεθόδων που βασίζονται στην PCR τεχνική δεν απαιτεί ούτε τη χρήση ζωντανών κυττάρων και ειδικού αντι-ορού, ούτε την επαρκή έκφραση του αντιγόνου στην επιφάνεια των κυττάρων. Όλες οι ορολογικά προβληματικές τυποποιήσεις αποσαφηνίστηκαν και έγινε δυνατή η τυποποίηση όλων των αγνώστων αντιγόνων (αξίζει να σημειωθεί ότι με τις μοριακές τεχνικές έγινε εφικτή η τυποποίηση των λεγόμενων υπερτυπικών αντιγόνων και των σχιστών τους, π.χ τα σχιστά του υπερτυπικού αντιγόνου A*9 είναι τα A*23 και A*24, του B*40 είναι τα B*60 και B*61 και του DR*5 είναι τα DR*11 και DR*12). Επίσης, μετά από μελέτες που έγιναν από διάφορες ερευνητικές ομάδες, οι μοριακές μέθοδοι αποδείχθηκαν πιο ακριβείς και με αυξημένη διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με τις ορολογικές μεθόδους. Βασικό τους μειονέκτημα αποτελεί το μεγαλύτερο κόστος εφαρμογής τους, καθώς και η αδυναμία να διακρίνουν τα μη-λειτουργικά γονίδια από τα εκφραζόμενα αλληλία (Orelup et al. 2001). Πρέπει να σημειωθεί ότι η βελτίωση των αποτελεσμάτων της ορολογικής τυποποίησης έγινε εμφανής μετά το 1992, γεγονός το οποίο εξηγείται τόσο από τις ‘αποδοτικότερες’ τεχνικές απομόνωσης των λεμφοκυττάρων (ανοσομαγνητικά σφαιρίδια, μονοκλωνικά αντισώματα) καθώς και τη χρήση σπληνός ή λεμφαδένα από πτωματικό δότη, όσο και από την παρασκευή καθαρότερων (μονοειδικών) και περισσότερων αντι-ορών.

Η κλινική σημασία της HLA τυποποίησης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έγκειται στη φυλογενετική ανάλυση πληθυσμών, στη συσχέτιση συγκεκριμένων HLA αλληλίων με ασθένειες, στον έλεγχο πατρότητας, αλλά κυρίως στις μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων. Οι τεχνικές της μοριακής βιολογίας παρέχουν σημαντικότερες δυνατότητες στην ανοσολογία των μεταμοσχεύσεων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτήν την εργασία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση συμβατότητας ή μη μεταξύ δότη και λήπτη για τις επικείμενες μεταμοσχεύσεις, αλλά και για διάφορες πληθυσμιακές μελέτες στο συγκεκριμένο δείγμα ατόμων.

Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι οι αναγνωρισμένες HLA-A*, B*, DRB1* συμβατότητες σε επίπεδο γονιδίων μεταξύ δότη και λήπτη σχετίζονται με την καλύτερη επιβίωση του μοσχεύματος από αυτές οι οποίες καθορίζονται από την ορολογική τυποποίηση και ιδιαίτερα στη μεταμόσχευση μυελού των οστών, όπου για την πλήρη αποδοχή του μοσχεύματος από τον οργανισμό του λήπτη απαιτείται απόλυτη ταύτιση των παραπάνω αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (Morishima et al. 2002). Οι μοριακές λοιπόν τεχνικές θεωρούνται αποτελεσματικότερες από τις ορολογικές, στις μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών, και πρέπει να εφαρμόζονται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Πρώτον, για να αναγνωρίσουν ασύμβατα αντιγόνα μεταξύ δότη και λήπτη, εκεί που η ορολογική τυποποίηση τα έχει αναγνωρίσει ως συμβατά. Δεύτερον, για να προτιμηθούν οι δότες που είναι ταυτόσημοι με τον λήπτη και έτσι να περιοριστεί ο κίνδυνος απόρριψης του μοσχεύματος. Τρίτον, όταν δεν υπάρχουν συμβατοί δότες, για να αποφευχθούν οι δότες που είναι ασύμβατοι με τον

λήπτη ως προς δύο ή περισσότερους HLA γονιδιακούς τύπους, κάτι που θα είχε ιδιαίτερα αρνητικές συνέπειες. Κατά συνέπεια, ασθενείς με σοβαρές αιματολογικές διαταραχές θα πρέπει να τυποποιούνται με μοριακές τεχνικές, ενώ στις περιπτώσεις όπου η ορολογική τυποποίηση αναγνωρίζει μόνο μία ειδικότητα αλληλίου, θα πρέπει να εφαρμοστεί επιπρόσθετα και η μοριακή τυποποίηση (Petersdorf et al. 2003).

Από τη σύγκριση της PCR-SSP ανάλυσης και της PCR-SSO LIFEMATCH, προέκυψε πλήρης συμφωνία στα HLA-DRB1* αντιγόνα και υψηλό ποσοστό συμφωνίας στα HLA-A* (88,6%) και HLA-B* (95,5%) αντιγόνα, γεγονός που ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικό δεδομένου του ρόλου των HLA- A*, B*, DRB1* αντιγόνων στην καλύτερη επιβίωση του μοσχεύματος. Η μικρή απόκλιση που παρατηρήθηκε ανάμεσα στις δύο μεθόδους ως προς τα αποτελέσματα που έδωσε η HLA-A* και -B* τυποποίηση οφείλεται στο γεγονός ότι η PCR-SSP είναι μια 'στανταρισμένη' μέθοδος που δε μπορεί να αμφισβητηθεί σε καμία περίπτωση, συγκρινόμενη με την PCR-SSO LIFEMATCH, που είναι μια σχετικά καινούργια τεχνολογία.

Η PCR-SSP τεχνική αποτελεί την κλασική μέθοδο γονιδιακής τυποποίησης στη ρουτίνα ενός εργαστηρίου ιστοσυμβατότητας. Βασικό της πλεονέκτημα είναι η εύκολη και σύντομη ανάγνωση των αποτελεσμάτων και η ελαχιστοποίηση του χρόνου τυποποίησης (όχι περισσότερο από 3 ώρες), γεγονός που την καθιστά μέθοδο επιλογής στις πτωματικές μεταμοσχεύσεις. Στην παρούσα εργασία, η PCR-SSP τεχνική αναγνώρισε τα A*01-*80, B*07-*83 και DR-B1*01-*16, δηλαδή όλα τα ορολογικώς ανιχνεύσιμα HLA τάξης I και II αλληλία καθώς και ορισμένα σχιστά αυτών. Αποτελεί μέθοδο χαμηλής διαχωριστικής ανάλυσης (low resolution), αφού δε μας δίνει υποτύπους (για παράδειγμα, DR-B*11 και όχι DR-B*1104), αλλά διαθέτει υψηλότερη διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με την PCR-SSO LIFEMATCH, η οποία ενίοτε έδινε και τους υποτύπους κάποιων αλληλίων, δηλαδή 4 ψηφία, ανάλογα με το δείγμα (high resolution).

Η PCR-SSO LIFEMATCH τεχνική χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτίδια ειδικά της αλληλουχίας (SSO) για να εξακριβώσει ποια αλληλόμορφα HLA είναι παρόντα σε ένα μεγεθυσμένο με PCR δείγμα. Το σετ των χρησιμοποιούμενων SSO, όχι οι μεθοδολογίες, είναι αυτό που καθορίζει την ικανότητα διάκρισης των διαφόρων αλληλομόρφων που είναι παρόντα στην PCR μεγέθυνση. Ο προσδιορισμός LIFEMATCH είναι ένα ομοιογενές πολυδιάστατο σύστημα. Δηλαδή, όλα τα SSO αναλύονται ταυτόχρονα και ολόκληρος ο προσδιορισμός εκτελείται σε ένα μόνο δοχείο αντίδρασης με την προσθήκη ενός μόνο αντιδραστήριου (Cesbron-Gautier et al.2004).

Η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των δύο μοριακών μεθόδων είναι η εξής: με την PCR-SSP τυποποιούσαμε 1 άτομο για πολλούς γονιδιακούς τύπους (HLA-A*, B*, DRB1* σε μία πλάκα), ενώ με την PCR-SSO LIFEMATCH τυποποιούσαμε πολλά άτομα για έναν γονιδιακό τύπο. Η PCR-SSO LIFEMATCH ανάλυση είναι λοιπόν μια εξαιρετικά γρήγορη μέθοδος. Θεωρητικά, έχει τη δυνατότητα να τυποποιήσει έως και 95 άτομα, αλλά κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της συγκεκριμένης εργασίας, δεν τυποποιούσε πάνω από 25 δείγματα κάθε φορά. Ο μεγάλος αριθμός δειγμάτων ασκούσε μεγάλη πίεση στον LIFEMATCH και αυτό επηρέαζε την έκβαση των αποτελεσμάτων. Επίσης, η PCR-SSO θεωρείται εξαιρετικά γρήγορη μέθοδος διότι ένα σωληνάριο είναι δυνατόν να περιέχει πάνω από 50 διαφορετικούς ιχνηλάτες, ενώ ο μέγιστος χρόνος ανάλυσης που προσφέρει είναι 1λεπτό ανά δείγμα. Άλλο πλεονέκτημα της νέας αυτής τεχνολογίας είναι η μεγάλη ευελιξία που διαθέτει, διότι σε ένα σωληνάριο μπορούν να πραγματοποιηθούν πολλαπλές αντιδράσεις, κάτι που μειώνει σημαντικά το κόστος των καταναλούμενων υλικών, ενώ παράλληλα μας δίνει τη δυνατότητα να παρέμβουμε στα αποτελέσματα και να τα βελτιστοποιήσουμε

(κάνοντας θετικό ή αρνητικό κάποιον ιχνηλάτη, όπου μας επιτρέπεται). Τέλος, η PCR-SSO LIFEMATCH τεχνική δεν εφαρμόζεται μόνο στην γονιδιακή τυποποίηση ενός ευρέως φάσματος HLA μορίων τάξης I και II, όπως τα HLA- A*, B*, C*, DRB1*, DQB1*, αλλά έχει και άλλες εφαρμογές (π.χ ανίχνευση αντισωμάτων).

Στη διάρκεια πραγματοποίησης της συγκεκριμένης εργασίας παρουσιάστηκαν, ιδιαίτερα τον πρώτο καιρό, διάφορα προβλήματα στην εφαρμογή της PCR-SSO LIFEMATCH τεχνικής, κάποια από τα οποία αντιμετωπίστηκαν (βλ. μέθοδοι, § 2.5). Ωστόσο, η εξοικείωση με τη μέθοδο και οι συχνές παρεμβάσεις σε αυτήν οδήγησαν στη βελτιστοποίησή της και στην εξάλειψη πολλών προβλημάτων που παρουσίαζε στην αρχή.

Περίληψη-Συμπεράσματα

Από τις περισσότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια με τη χρήση μοριακών τεχνικών για την τυποποίηση των HLA μορίων τάξης I και II, αποδείχθηκε αναμφίβολα μια σημαντική ποιοτική διαφορά σε σχέση με την κλασική ορολογική τυποποίηση. Όλες οι ορολογικά προβληματικές τυποποιήσεις αποσαφηνίστηκαν και όλα τα άγνωστα αλληλία μπόρεσαν να τυποποιηθούν. Με την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών και στον τομέα των μεταμοσχεύσεων αποδείχθηκε ο ρόλος των HLA-A*, -B*, -DRB1* αντιγόνων στην καλύτερη επιβίωση του μοσχεύματος.

Στη παρούσα εργασία τυποποιήθηκαν για τα HLA-A*, -B*, -DRB1* αλληλία, με DNA τεχνικές, 278 υγιή άτομα, τα οποία ανήκουν στον επίμικτο Θεσσαλικό πληθυσμό, με απώτερο σκοπό την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων τόσο στον τομέα των μεταμοσχεύσεων, όσο και σε διάφορες πληθυσμιακές μελέτες. Οι δύο μοριακές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν ήταν η μεγέθυνση του DNA με PCR και χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers, PCR-SSP) και ο υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μετά από μεγέθυνση του DNA με PCR με χρήση της μικροσφαιριδιακής κυτταρομετρικής τεχνολογίας LIFEMATCH (PCR-SSO LIFEMATCH). Κατ' αρχήν έγινε απομόνωση του DNA από όλα τα άτομα της μελέτης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA περιλάμβανε τη χρήση διαφόρων απορρυπαντικών, πρωτεϊνάσης K και αιθανόλης.

Για την PCR-SSP ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 24 διαφορετικά ζεύγη αφετηριών για κάθε άτομο για την αναγνώριση των A* αλληλίων, 48 ζεύγη αφετηριών για την αναγνώριση των B* αλληλίων και 23 ζεύγη αφετηριών για την αναγνώριση των DRB1* αλληλίων. Με την εμφάνιση ή όχι προϊόντος PCR στην ηλεκτροφόρηση που ακολουθούσε γινόταν η τυποποίηση των HLA τάξης I και II μορίων για κάθε άτομο. Στην PCR-SSO LIFEMATCH ανάλυση, το μεγεθυμένο PCR προϊόν αφήνονταν να υβριδιστεί με ένα μίγμα ιχνηθετημένων ολιγονουκλεοτιδίων, όπου κάθε ολιγονουκλεοτίδιο ήταν ομόλογο προς μία αλληλουχία, μοναδική σε ένα αλληλόμορφο ή μια ομάδα αλληλομόρφων. Η ανάλυση της αντίδρασης γινόταν στον Φθοριοαναλυτή LIFEMATCH καθώς τα

μικροσφαιρίδια, στην επιφάνεια των οποίων ήταν προσαρτημένα τα ολιγονουκλεοτίδια (με ή χωρίς το αλληλίο), περνούσαν ένα-ένα από δύο laser, ένα κόκκινο που ανίχνευε την αντίδραση και ένα πράσινο που μετρούσε την αντίδραση.

Τα κύρια συμπεράσματα που συνάγονται από τη σύγκριση των δύο μοριακών μεθόδων είναι τα εξής:

- Πλήρης συμφωνία μεταξύ PCR-SSP τυποποίησης και PCR-SSO LIFEMATCH ανάλυσης στα DRB1* αλληλίο και υψηλό ποσοστό συμφωνίας στα A* (88,6%) και B* (95,5%)αλληλίο.
- Η εύκολη και γρήγορη ανάγνωση των αποτελεσμάτων και η ελαχιστοποίηση του χρόνου τυποποίησης της PCR-SSP ανάλυσης την καθιστούν μέθοδο επιλογής στις μεταμοσχεύσεις αλλά και για τη ρουτίνα του εργαστηρίου ιστοσυμβατότητας.
- Η PCR-SSO LIFEMATCH αποτελεί μια γρήγορη και αρκετά ευέλικτη μέθοδο τυποποίησης πολλά υποσχόμενη στο μέλλον. Η τελειοποίησή της θα μπορούσε αδιαμφισβήτητα να την κάνει μέθοδο επιλογής στις μαζικές τυποποιήσεις.

Βιβλιογραφία

- Adam K, Polymenidis Z, Papakyriazi L et al. HLA-A, B, DR antigens and renal transplantation from cadaveric donors and living-related donors in Greek patients. *Transplant Proc* 1992;24:6:2449-2450.
- Adams S, Barracchini K, Chen D, Robbins <mailto:frobins@cc.nih.gov> F, Wang L, Larsen P, Luhm R and Stroncek D. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. *Journal of Translational Medicine* 2004, 2:30.
- Albrechtsen D, Arnesen E, Thorsby E. Cell-mediated cytotoxicity directed at HLA-D gene products. *Transplantation* 1979;27:338-341.
- Androlewicz MJ. The role of tapasin in MHC class I antigen assembly. *Immunology Res* 1999;20:79-88.
- Balas A, Santos S, Aviles MJ, Garcia Sanchez F, Lillo R, Vicario JL. Identification by sequencing based typing and complete coding region analysis of three new HLA class II alleles: DRB3*0210, DRB3*0211 and DQB1*0310. *Tissue Antigens* 2000;56(4): 380-4.
- Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, Erlich HA, Klitz W: Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunology* 148:249, 1992.
- Benacerraf B. Biological function of HLA molecules. In Solheim BG, Ferrone S and Moller E, eds. *The HLA system in clinical transplantation*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1993:109-118.
- Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T-cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunology* 1999; 162: 352-8.
- Bjorkman P, Saper M, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 1987; 329:506-12.
- Braun MY, McCormack A, Webb G and Batchelor JR. Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation* 1993; 55: 177-182.
- Brocke P, Garbi N, Momburg F, Hammerling GJ. HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr Opin Immunol* 2002;14:22-9.

- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993;364:33-9.
- Bunce M, Procter J, Welsh KI. A DNA-based detection and screening system for identifying HLA class I expression variants by sequence-specific primers. *Tissue Antigens* 1999;53:498-506.
- Calmus Y. Graft-versus-host disease following living donor liver transplantation: high risk when the donor is HLA-homozygous. *J Hepatol* 2004;41(3):505-7.
- Cesbron-Gautier A, Simon P, Achard L, Cury S, Follea G, Bignon JD. Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities. *Ann Biol Clin* 2004;62:93-8.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98:437-51.
- Chen M, Duffy B, Mohanakumar T. New aspects in histocompatibility testing. *Laboratory Medicine Newsletter* 1996: 4:10-12.
- Colombe BW. Histocompatibility Testing. In: Stites PD, Terr IA, Parslow GT Eds *Basic and Clinical Immunology*, a large medical book, San Francisco 1994:237-255.
- Dawkins R, Lellayuwat C, Gaudieri S, Tay G, Hui J, Cattley S, Martinez P, Kulski J: Genomics of the major histocompatibility complex. *Immunology review* 1999, 167:275-304.
- Diedrich G, Bangia N, Pan M, Cresswell P. A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J Immunology* 2001;166:1703-9.
- Dyer P and Middleton D. Introduction in Dyer P and Middleton D Eds *Histocompatibility Testing, a practical approach*, IRL Press, Oxford 1993:1-11.
- Erlich HA. PCR technology, principles and applications for DNA amplification 1989. Από Πρακτικά Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου με θέμα: Τεχνικές ανάλυσης DNA, PCR εφαρμογές στη διαγνωστική, Οκτώβριος 1993.
- Falk K, Rotzschke O, Strevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290-6.
- Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med* 1992: 175: 1521-9.

- Flavell RA, Hafler DA, Eds. Autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 1999;11:635-707.
- Forbes SA, Trowsdale J. The MHC quarterly report. *Immunogenetics* 1999, 50:152-9.
- Garboczi DN, Biddison WE. Shapes of MHC restriction. *Immunity* 1999;10:1-7.
- Garcia KC, Degano M, Pease LR, et al. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self-peptide-MHC antigen. *Science* 1998;279:1166-72.
- Gerlach J. Human lymphocyte antigen molecular typing, How to identify the 1250⁺ alleles out there. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2001;126:281–284.
- Germain RN. Antigen processing and presentation. In WE Paul Ed, *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York 1993:629-675.
- Γερμενής Α. Ιατρική Ανοσολογία. Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας, εκδόσεις Παπαζήση Αθήνα, 2000:83-96.
- Grassi A, Susca M, Ravaioli M, Grazi GL, D'Errico A, Bontadini A, Zauli D, Pinna A, Bianchi FB, Ballardini G. Detection of recipient's cells in liver graft using antibodies to mismatched HLA class I antigens. *Liver Transpl.* 2004;10(11):1406-1414.
- Gruessner AC, Sutherland DE. Analysis of United States (US) and non-US pancreas transplants reported to the united network for organ sharing (UNOS) and the international pancreas transplant registry (IPTR) as of October 2001. *Clin Transpl* 2001:41-72.
- Jones EY. MHC class I and class II structures. *Current Opinion in Immunology* 1997: 9:75-9.
- Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. New York: John Wiley, 1986.
- Klein J, Sato A. The HLA system. Part 1. *N Engl J Med* 2000, 343: 702-709.
- Klein J, Sato A. The HLA system. Part 2. *N Engl J Med* 2000, 343: 782-786.
- Kuliev A, Verlinsky Y. Preimplantation HLA typing and stem cell transplantation: report of International Meeting, Cyprus, 27-8 March, 2004. *Reprod Biomed Online* 2004;9(2):205-9.

- Κυριακίδη Δ.Α. Βιοτεχνολογία, εκδ. Ζ. Θεσσαλονίκη, 2000:46-49.
- Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995;13:587-622.
- Laux G, Opelz G. Immunological relevance of CREG matching in cadaver kidney transplantation. *Transplantation*. 2004;78(3):442-6.
- Liu Z, Sun YK, Xi YP, Maffei A, Reed E, Harris P et al. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T-cell alloreactivity. *J Exp Med* 1993;177:1643-50.
- Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Blackwell Munksgaard Tissue Antigens* 2002;60:407-464.
- Mayer WE, Klein J. Is tapasin a modified MHC class I molecule? *Immunogenetics* 2001;53:719-23.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11.
- Moen T, Albrechtsen D, Flatmark A et al. Importance of HLA-DR matching in cadaveric renal transplantation: a prospective one-center study of 170 transplants. *N Engl J Med* 1980;303:850-854.
- Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood* 2002; 99:4200-6.
- Opelz G, Wujciak T, Mytilineos J, Scherer S. Revisiting HLA matching for kidney transplantation. *Transplant Proc* 1993;24:173-175.
- Orelup O, Schaffer M. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors and increased resolution compared to serological typing. *Blackwell Munksgaard Tissue Antigens* 2001;58:299-307.
- Orelup 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* 1992;39:225-35.
- Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 1994;368:864-7.

- Ouwehand AJ, Baan CC, Vaessen LM, Jutte NH, Balk AH, Bos E, Claas FH, Weimar W. The influence of HLA-mismatches on phenotypic and functional characteristics of graft infiltrating lymphocytes after heart transplantation. *Transpl Int.* 1992;5 Suppl 1:S673-5.
- Pallera AM, Schwartzberg LS. Managing the toxicity of hematopoietic stem cell transplant. *J Support Oncology* 2004;2(3):223-37.
- Palmer Ed. Negative selection-Clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature* 2003;3:383-391.
- Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunology* 1998;16:323-58.
- Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet* 2001;357:1777-89.
- Petersdorf E.W, Anasetti C, Martin P.J, Hansen J.A. Tissue typing in support of unrelated haematopoietic cell transplantation. *Blackwell Munksgaard Tissue Antigens* 2003;61:1-11.
- Petersdorf E.W, Gooley TA, Anasetti C et al. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* 1998;92:3515-20.
- Petersdorf E.W, Longton GM, Anasetti C et al. Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 1997;89:1818-23.
- Petrie H.T. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunology Review* 2002;189:8-20.
- Ploegh HL, Orr HT and Strominger JL. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, B, C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 1981; 24:287-299.
- Πολυμενίδης Ζ. HLA και ανθρωπολογικές μελέτες. Από εισηγήσεις της προσυνεδριακής ημερίδας του 13^{ου} Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου, Αθήνα 1987:59-65.
- Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Current Opinion in Immunology* 1995: 7:85-96.
- Rammensee HG, Bachmann J, Strevanovic S. MHC ligands and peptide motifs. New York: Springer, 1997.
- Rienherz EL, Tan K, Tang L, et al. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 1999;286:1913-21.
- Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the a3 domain of HLA-A2. *Nature* 1990;345:41-46.

- Sasazuki T, Juji T, Morishima Y et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of haematopoietic stem cells from an unrelated donor. *Jpn Marrow Donor Program N Engl J Med* 1998;339:1177-85.
- Schaffer M, Aldener-Cannava A, Renberger M, Rinngden O, Orelup O. Roles of HLA-B, HLA-C and HLA-DPA1 incompatibilities in the outcome of unrelated stem-cell transplantation. *Blackwell Munksgaard Tissue Antigens* 2003;62:243-250.
- Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS. Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 1999;17:829-74.
- Sette A, Newman M, Livingston B, McKinney D, Sidney J, Ishioka G, Tangri S, Alexander J, Fikes J, Chestnut R. Optimizing vaccine design for cellular processing, MHC binding and TCR recognition. *Tissue Antigens* 2002;59:443-451.
- Sim B, Zerva L, Greene MI, Gascoigne NRJ. Control of MHC restriction by TCR V α CDR1 and CDR2. *Science* 1996;273:963-6.
- Sintasath DM, Bei M, Steiner N et al. Analysis of HLA-A and -B serological typing of bone marrow registry donors using polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotide probes and DNA sequencing. *Tissue Antigens* 1997;50:366-71.
- So A. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. In Lechler R edition, *HLA and disease*, Academic Press, Cambridge 1994:1-34.
- Starr T.K., Jameson S.C., Hogquist K.A. Positive and negative T cell selection. *Annu Rev Immunol* 2003;21:139-176.
- Suh WK, Coden-Doyle MF, Fruh K et al. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 1994;264:1322-6.
- Takemoto SK. HLA matching in the new millennium. *Clin Transpl UCLA Immunogenetics Center, USA* 2003:387-403.
- Terasaki PI and McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998-1000.
- Terasaki PI, Vredevoc DL, Mickey MR, et al. Serotyping for homotransplantations. Selection of kidney donors for thirty-two recipients. *Ann NY Acad Sci* 1966;129:500-520.

- Ting A and Morris RJ. The influence of HLA-DR matching on renal transplant outcome. *Transplant Proc* 1979;11:2:1295-1297.
- Townsend A, Ohlen C, Bastin J et al. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989;340:443-8.
- Van Kaer L. Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res* 2001;23:205-14.
- Werlen G, Hausmann B, Naeher D, Palmer E. Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 2003;299:1859-1863.
- Whitelegg A, Barber L.D. The structural basis of T-cell allorecognition. *Blackwell Munksgaard Tissue Antigens* 2004; 63: 101-108.
- Vaughan RW. HLA typing by restriction fragment length polymorphism analysis. *Methods Mol Biol.* 2003;210:45-59.
- Yadetie F, Sandvik A, Bergum H, Norsett K, Laegreid A. Miniaturized fluorescent RNA dot blot method for rapid quantitation of gene expression. Department of Cancer Research and Molecular Medicine, Norway. 2004; 4: 12.
- Zhang Q, Zhai N, Geng L, Song F. DNA typing system for HLA-A2 alleles by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Chin Med Sci J.* 2001;16(3):161-4.