

COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Dra. Flora Calzadilla Lugo

Laboratorio de Genética Molecular



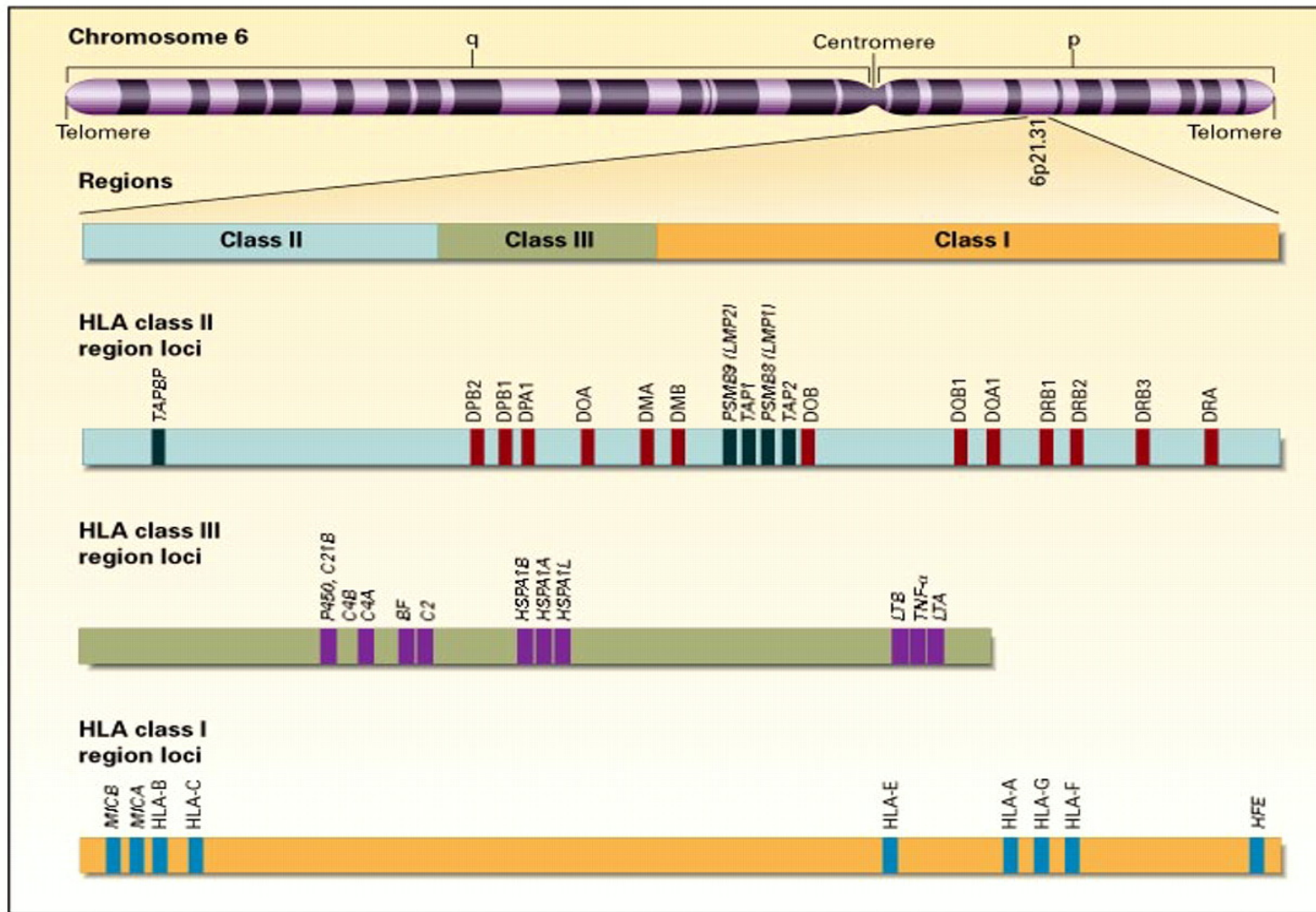
POLIMORFISMO GENETICO

Presencia en una población de múltiples alelos de un gen y que debe estar presente en el 1%.

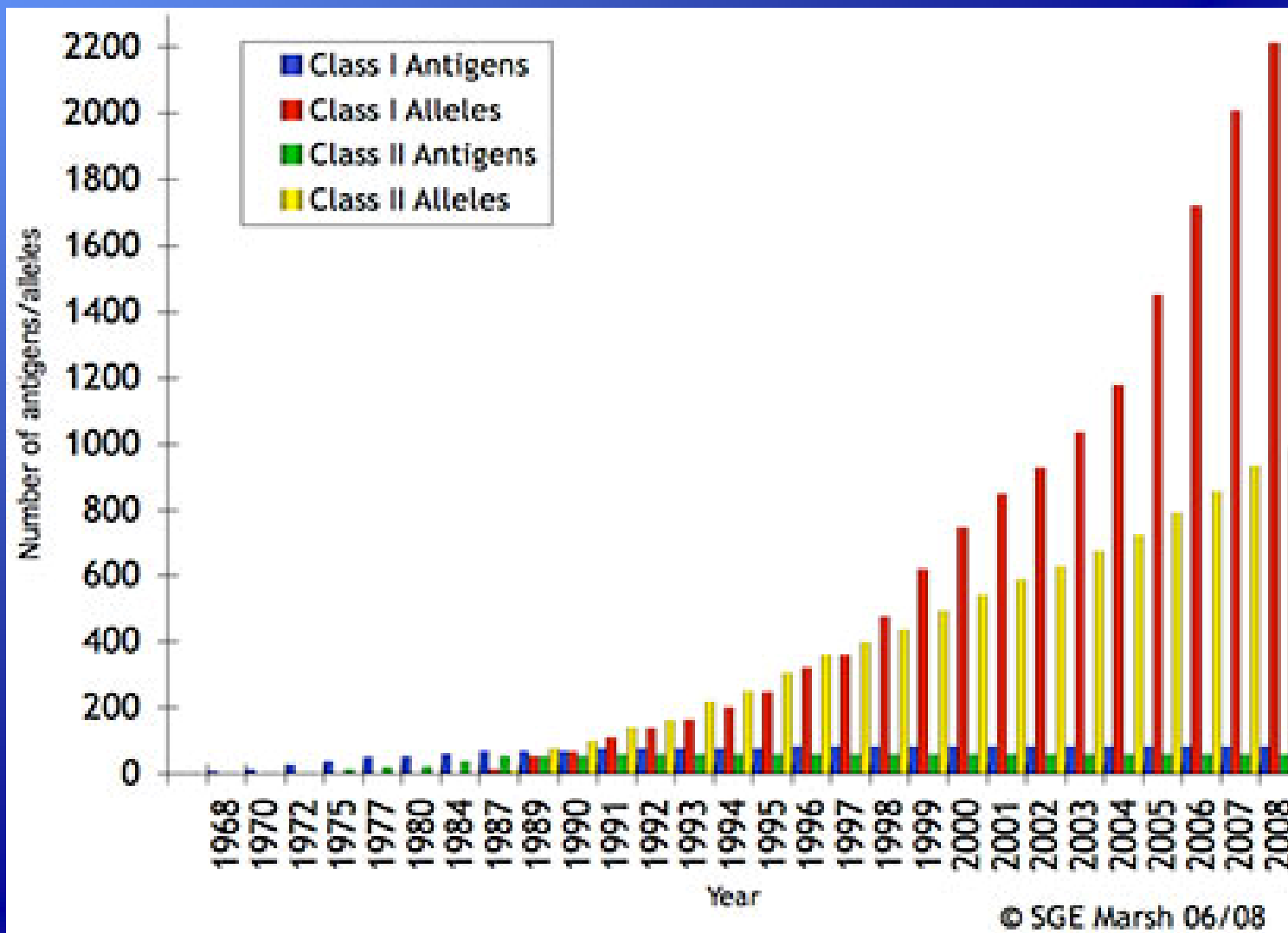
Variación en la secuencia en un sitio determinado del ADN entre los individuos de una población. Aquellos polimorfismos que afectan a la secuencia codificante o reguladora, y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos.

Un polimorfismo puede consistir en la sustitución de una simple base nitrogenada o puede ser más complejo (por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada de ADN, donde un porcentaje de individuos tenga un determinado número de copias de dicha secuencia).

POLIMORFISMO



POLIMORFISMO



POLIMORFISMO



Número de alelos HLA Clase I: 2351

Locus	A	B	C	E	F	G	H	J	K	L	P	T	U	V	W	X
Alelos	733	1115	392	9	21	42	12	9	6	5	4	0	0	3	0	0
Proteína	573	942	307	3	4	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nulos	48	39	9	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

POLIMORFISMO



Número de alelos HLA-DR: 1020

Locus	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$	$\beta 9$
Alelos	608	1	50	13	18	3	2	1	1
Proteína	497	0	40	7	15	0	0	0	0
Nulos	3	0	0	3	2	0	0	0	0

POLIMORFISMO



Número de alelos no-HLA

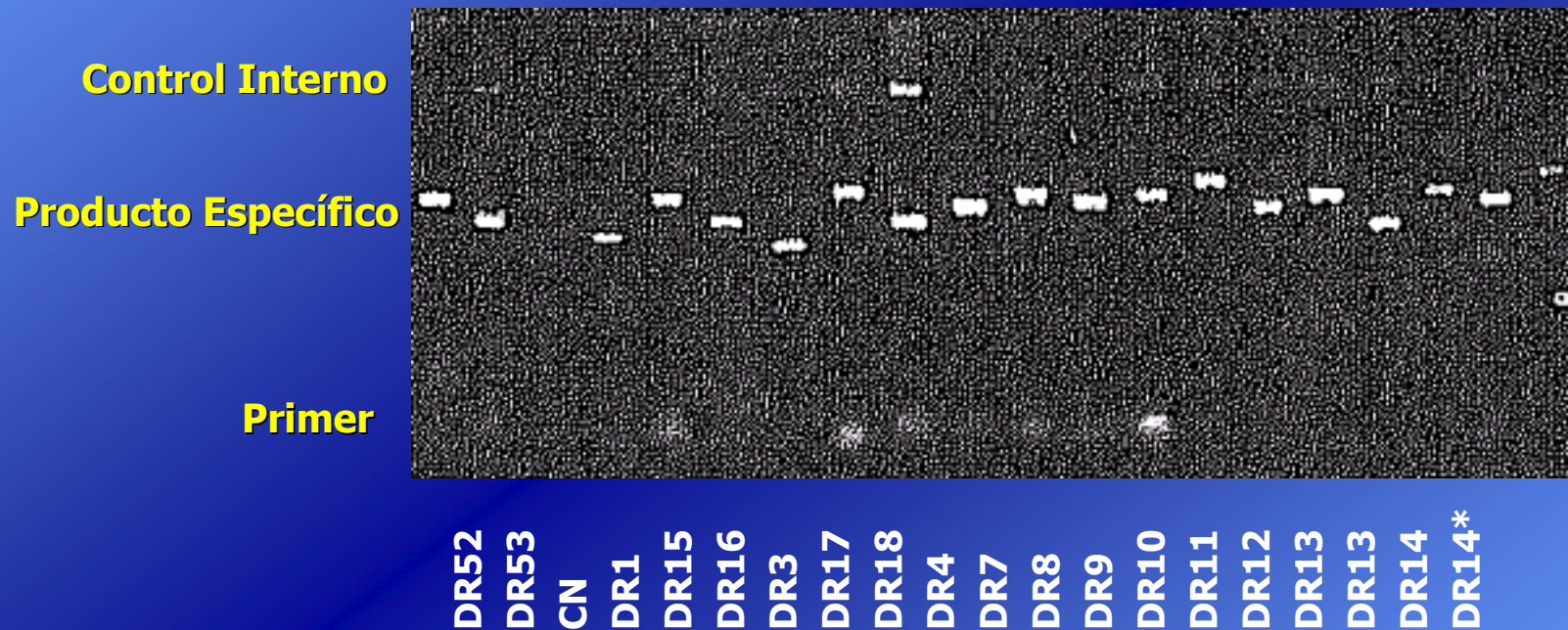
Locus	MICA	MICA	TAP1	TAP2
Alelos	65	30	7	4
Proteína	55	19	5	4
Nulos	0	2	1	0

Formas para evitar y tratar el rechazo

- **Mayor Compatibilidad**
- **Citoquinas**
- **Tratamientos inmunosupresores**

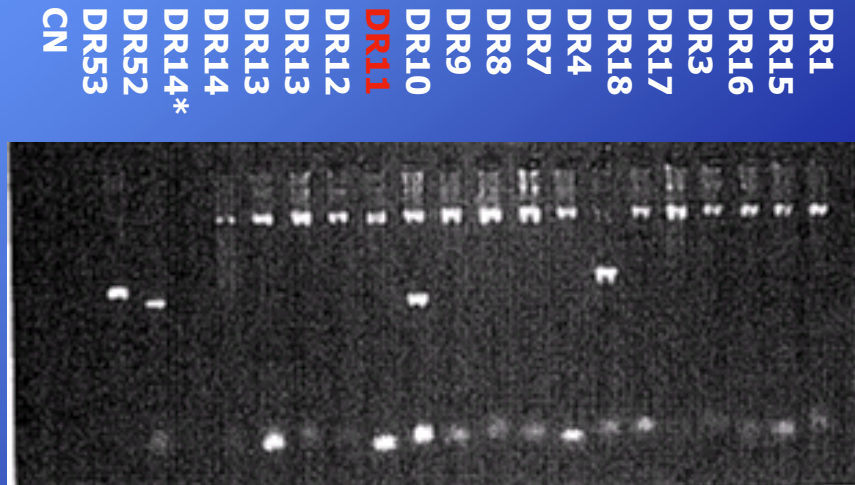
Compatibilidad HLA

- Técnicas serológicas versus moleculares



Olerup, H. Zetterquist. HLA 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 transplantations. *Tissue Antigens* 1992; 39; 225-235.

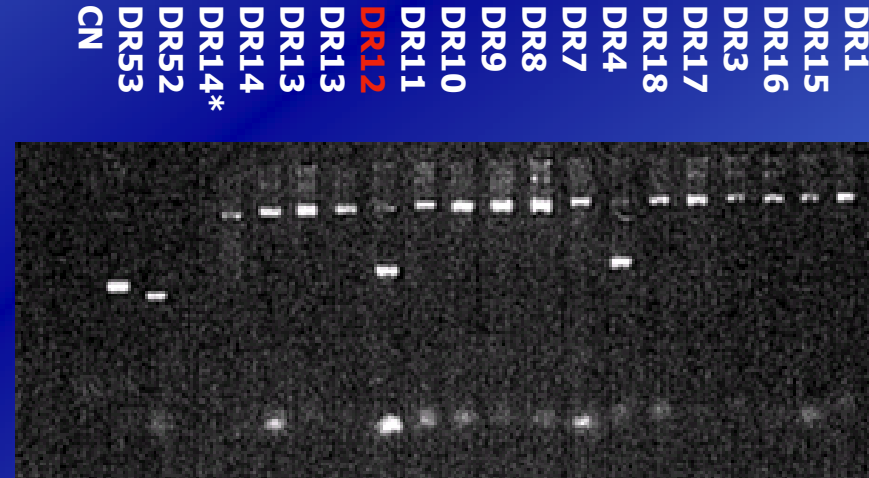
Mayor resolución



Receptor

1: Control interno

2: Fragmento esperado

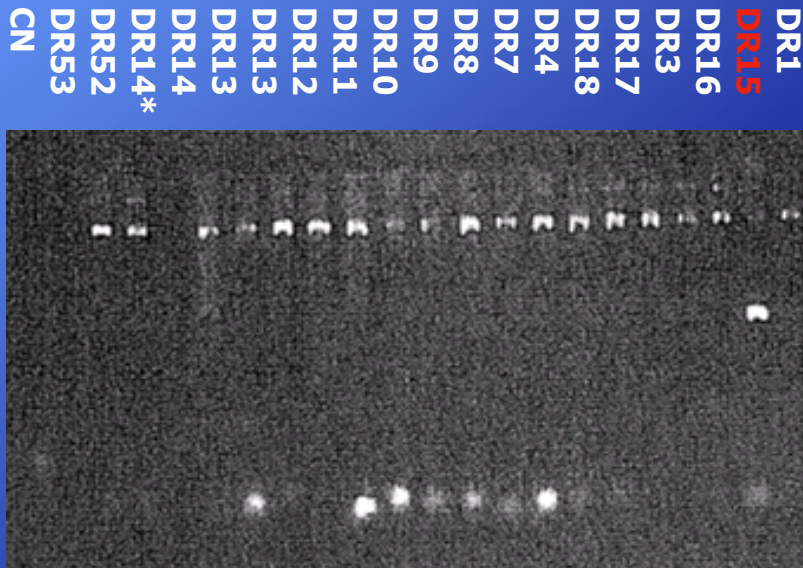


Donante

3: Cebadores

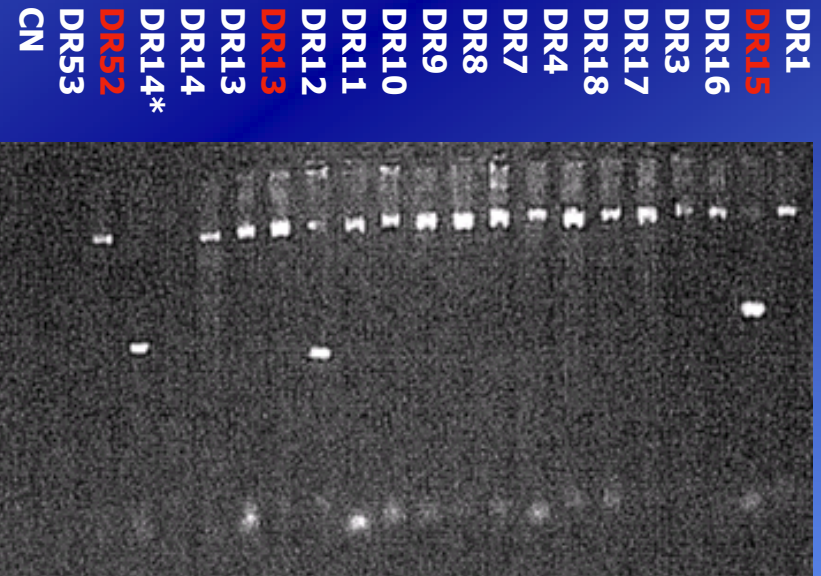
O. Olerup, H. Zetterquist. HLA typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. Tissue Antigens 1992; 39; 225-235.

Homocigótico y Confiabilidad



Receptor

1: Control interno



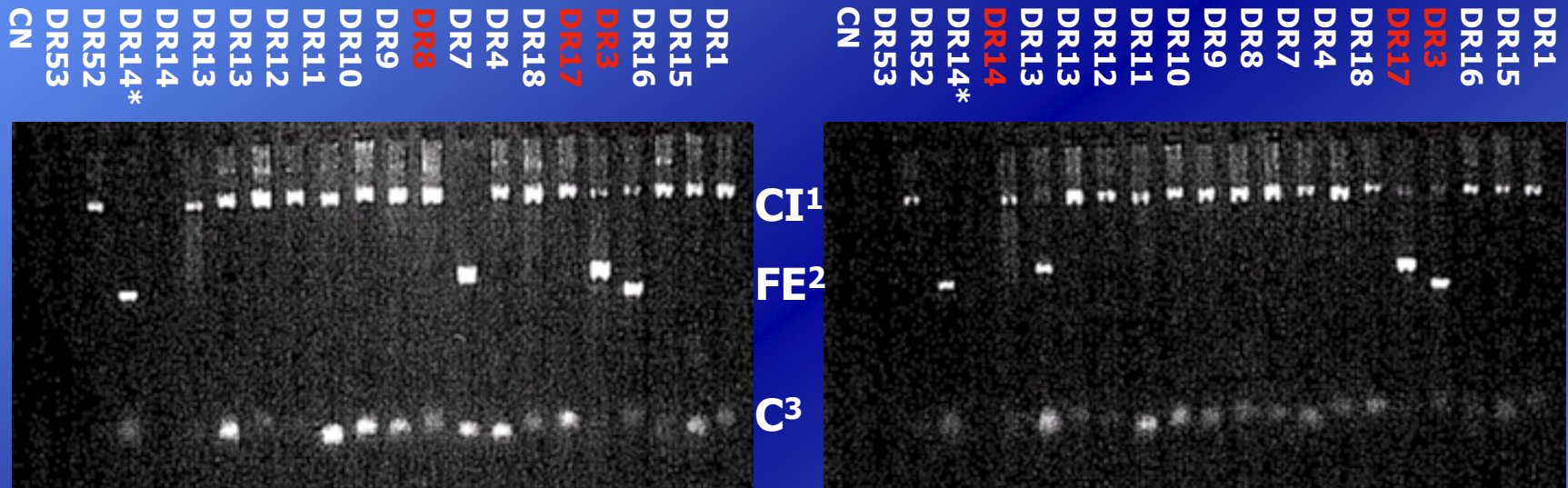
Donante

2: Fragmento esperado

3: Cebadores

O. Olerup, H. Zetterquist. HLA 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 transplantations. Tissue Antigens 1992; 39; 225-235.

Mayor confiabilidad



Receptor

Donante

1: Control interno

2: Fragmento esperado

3: Cebadores

O. Olerup, H. Zetterquist. HLA 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 transplantations. Tissue Antigens 1992; 39; 225-235.

Ventajas de las técnicas moleculares vs serológicas

INHERENTES AL TIPAJE

Homocigóticos

Mayor resolución

Confiabilidad

PRACTICAS

Mayor número de muestras

Intercambio con diferentes laboratorios

Volumen de la muestra

Estudios retrospectivos

ECONOMICAS SOCIALES

Técnicas moleculares para el tipaje HLA

Método	Resolución	Tiempo
PCR-RFLP	> Serología	4-10 días
PCR-ASO	Alta	1-2 días
PCR-SSP	Baja-media	3-4 horas
Secuenciación	Definición de alelo	2 días

Selección

- En función de la relación al tiempo
- Resolución requerida.
- Posibilidad de combinar distintas técnicas

Evaluación de la histocompatibilidad donante-receptor en trasplantes

- Sistema de genotipaje de HLA Clase II compatible con los requerimientos de trasplantes de médula ósea y renal (resolución vs tiempo)
- Método seleccionado: *Bunce* (1999) (modificado según recomendaciones del *National Blood Service, London*)
- Basado en un sistema PCR-SSP para el genotipaje de baja-media resolución



Genotipaje por PCR-SSP

Extracción de ADN leucocitario por el método de “Salting out”



Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores específicos alelos HLA



Electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio

Denaturalización de las Cadenas de DNA

3' GTACTAACTGTTTCCTACGGGTCGTATAAAGCCTGTATG 5'
5' CATGATTGACAAGGATGCCAGCATATTTTCGGGACATAC 3'

95°C  **DENATURALIZACION**

3' GTACTAACTGTTTCCTACGGGTCGTATAAAGCCTGTATG 5'
5' CATGATTGACAAGGATGCCAGCATATTTTCGGGACATAC 3'

Hibridación de los cebadores a la cadena de ADN

3' GTACTAACTGTTCTACGGTCGTATAAAGCCTGTATG 5'

5' GACAAGGA 3'

3' AAAGCCT 5'

5' CATGATTGACAAGGATGCCAGCATATTTTCGGACATAC 3'



Tercer Paso. Elongación de los cebadores

5' GTACTAACTGTTTCCTACGGTCGTATAAAGCCTGTATG 3'

• CATGATT → GACAAGGATGCCAGCATATTTTCGGACATAC 5'

5' GTACTAACTGTTTCCTACGGTCGTATAAAGC CTGTATG

3' CATGATTGACAAGGATGCCAGCATATTTTCGGACATAC 5'

Pool de
dNTPs
dNTPs

Tecnología del PCR

m^n donde: **m** es No. de Moléculas de DNA
n es No. de ciclos del PCR



2^{30} Amplificación de **1×10^9** mil millones de veces

PCR-SSP

3' GTACTAACTGTTTCCTACGGTCGTATAAAGCCTGTATG 5'
5' CATGATT 3'

3' TTGTATG 5'

5' CATGATTGACAAGGATGCCAGCATATTTTCGGACATAC 3'



3' GTACTAACTGTTTCCTACGGTCGTATAAAGCTTGTATG 5'
5' CATGATT 3'

3' TTGTATG 5'

5' CATGATTGACAAGGATGCCAGCATATTTTCGAACATAC 3'

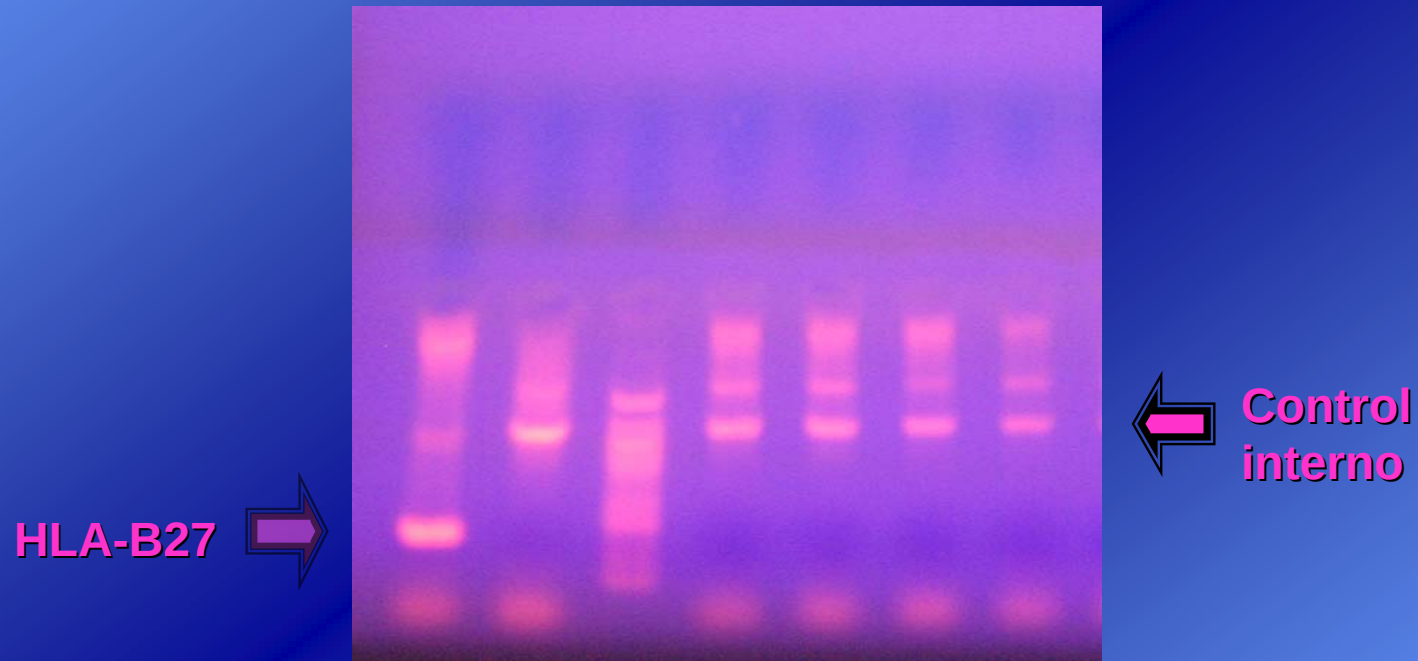


NO AMPLIFICA

SI AMPLIFICA

PCR-SSP

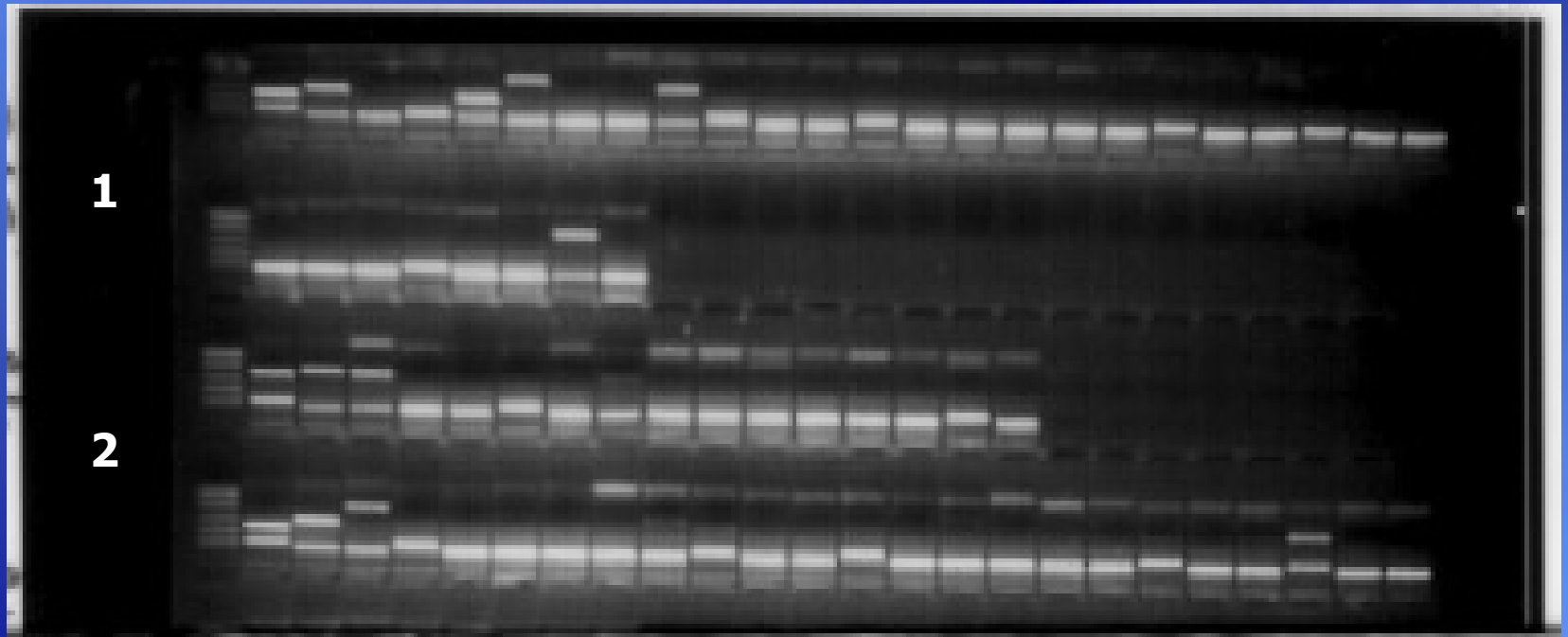
Interpretación de resultados



Gel de agarosa al 2% marcado con Bromuro de etidio

PCR-SSP

Tipaje HLA Clase II para trasplante de médula ósea



Ventajas del PCR-SSP

Mayor flexibilidad
respecto al nivel de
resolución deseado

Mayor confiabilidad
en la detección de
homocigóticos

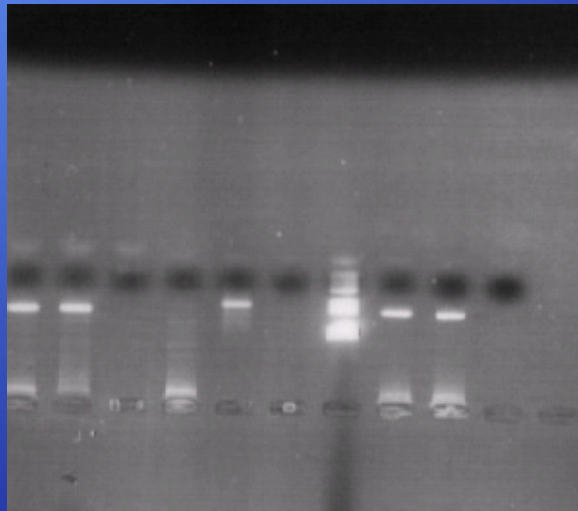
Menor tiempo de
ejecución

Menor costo

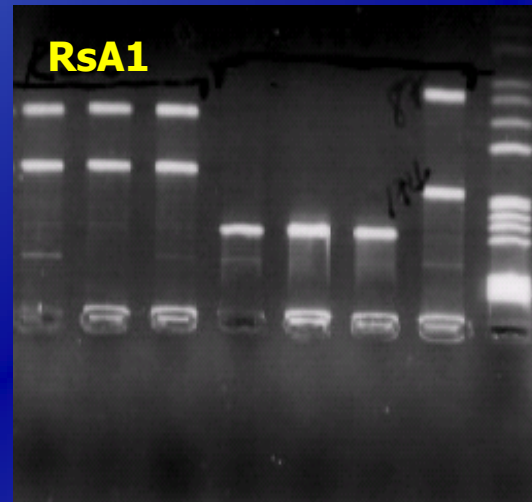
Combinación de distintas técnicas

Resolución	MEDIA	SSP 	
	ALTA	SSP Específico del alelo	RFLP

PCR-SSP combinado con PCR-RFLP



DRβ1*2



DRβ1*02

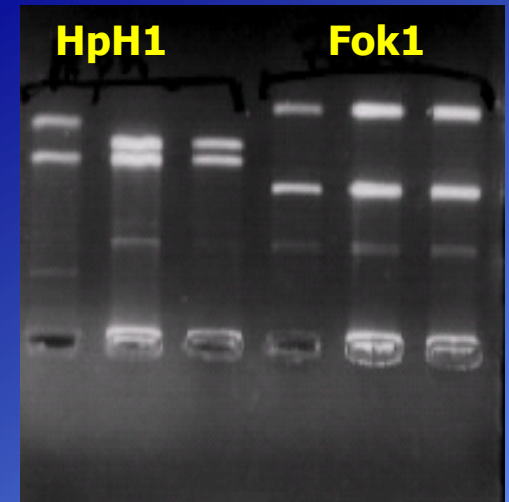


Tabla de interpretación

: 9/23

bleau d'interprétation n°1

1501 ou 1503
1502 / 1508

DR2 PL 2/13 + PR DR/88 (1501-08 ; 1601-05 ; 1607-08)

Rsa I		Ava II		Hpa I			Fok I		BssH II	
157	118	261	174	261	138	138	261	163	261	192
104	104		87		123	109		98		69
	39	X				14				
1501	1507	1501	16021	1506	1501	1502	1504	1501	1501	16011
1502	1601	1502	16022		1503	1508	1505	1502	1502	16021
1503	16021	1503			1504	1601	1601	1503	1503	1605
1504	16022	1504			1505	16021	16021	1506	1504	1607
1505	1603	1505			1507	16022	16022	1507	1505	1608
1506	1604	1506				1603	1603	1508	1506	
1508	1605	1507				1604	1604	1605	1507	
X	1607	1508				1605	1608	1607	1508	
X	1608	1601				1607		X	16012	
		1603				1608			16022	
		1604							1603	
		1605							1604	
		1607								
		1608								

15011 = 15012 (différenciable par Dde)

15021 = 15022 = 15023

1501 = 1503

se différencient par Ampli spécifique

1502 = 1508

1504 = 1505

1601 = 1608 (différenciable par Hinf I)

1603 = 1604

1605 = 1607

Tabla de interpretación

Fok I				Ksp I			
86*gT		86*Tg		86*gT		86*Tg	
258	166 92	258	166 92	258	203 55	258	203 55
0401	0414	0403	0402	0407	0401	0403	0402
0405		0404	0412	0417	0405	0406	0404
0407		0406		0420	0408	0411	0410
0408		0410		0431	0409	0412	0413
0409		0411			0414	0418	0415
0416		0413			0416	0422	0423
0417		0415			0419	0425	0432
0419		0418			0421	0427	
0420		0422			0424		
0421		0423			0426		
0424		0425			0428		
0426		0427			0429		
0428		0432			0430		
0429					0433		
0430							
0431							
0433							

PCR-ASO

DQA1

	10	20	30	40	50	60	70	80
DQA1*0101	DHYVSCGVNLYQFYQPS	QYTHF	DGHEEFYV	LERKETAVRY	EFKFGG	DPQ	GALRHHAYAKHH	LKIMIRYKSTAATH
DQA1*0102			Q					
DQA1*0103		F	Q	K				
DQA1*0201	Y	S	F		V-XL	L-IRLR*	F-T-I-L	L-S
DQA1*0301	Y	S	S		V-QL	L-RR-RR	F-T-I-L	V-S
DQA1*0401	Y	S		Q	G	V-CL-VLRQ-R*	F-T-I-T	L-S
DQA1*0501	Y	S		Q	G	V-CL-VLRQ-R*	F-T-I-L	SL-S
DQA1*0601		S	F	Q	G	V-CL-VLRQ-R*	F-T-I-T	L-S

DQB1

	10	20	30	40	50	60	70	80	90						
DQB1*0501	DFVYQFAGLCYFTNGT	GVVGVTRH	YNNRI	EVVRF	SDYGVYRAYT	QGRFVAE	YNNQ	SVLRGAKASVDK	CHH	EVAYRGIGRR					
DQB1*0502						S									
DQB1*0503						D									
DQB1*0601	L	AH	Y	Y	D	D	DI	RT	EL	T	F				
DQB1*0602	F	H	L	Y	A	D		T	EL	T	F				
DQB1*0603			L		A	D		T	EL	T					
DQB1*0604		H	L		A			RT	EL	T					
DQB1*0201		H	L	S	S	I	EF	EL	L	A	DI	RK	A	QLEL	TT
DQB1*0301		AH	Y	Y	A	E		L	F	D	RT	EL	T	QLEL	TT
DQB1*0302		H	L	Y	A			L	F	A	RT	EL	T	QLEL	TT
DQB1*0303		H	L	Y	A			L	F	D	RT	EL	T	QLEL	TT
DQB1*0401	F	H	L	Y	A			L	LD		DI	ED	T	QLEL	TT
DQB1*0402	F	H		Y	A			L	LD		DI	ED	T	QLEL	TT

Contenido del Kit:

- ❑ Placas de PCR que contienen las mezclas Cebadores/dNTPs liofilizados. El punto de orientación se indica en la esquina de la placa con color negro.
- ❑ 2,5 X Mezcla (lista para el uso). Contiene rojo cresol, buffer, glicerol y detergente.
- ❑ Cubierta.
- ❑ Patrones de reacción, posición de los cebadores, indicados en la hoja de trabajo.

Programa de PCR

Ciclos		Temp	Tiempo
Desnaturalización		94°C	2 min
10 ciclos	Desnaturalización	94°C	10 seg
	Hibridación / Extensión	65°C	1 min
20 ciclos	Desnaturalización	94°C	10 seg
	Hibridación	61°C	60 seg
	Extensión	72°C	30 seg
Extensión final		72°C	2 min
Espera		4°C	∞

6.1 Results

The interpretation should be performed with the delivered worksheet. The usage of the right version has to be observed, do not use a version older than six month. For the current version of the worksheet make application at the R.O.S.E. Europe GmbH.

In addition to the Sequence Specific Primers (SSP) the primer mixes also contain control primers of the human globin gene at a lower concentration. They serve as an internal control for the PCR. For the HLA-A, HLA-B and HLA-C PCR the length of this fragment is 1070 bp, and for the HLA-DRB and HLA-DQ PCR it is 420 bp. The control band should be present in every successful PCR. If the SSP product is positive, the control band might be weaker or even entirely missing, because the reaction with the positive primer in the well is preferred.

Gel Interpretation:

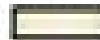
Reaction	positive	positive	negative	no amplification
Gel lane				
Control band	none	#####	#####	none
Specific band	#####	#####	none	none
Primer direct	01001	01001	01001	00001

Figure: schematic diagram of possible results at the gel analysis