

hasta niveles detectables. Por tanto, se debe usar guantes desechables, tubos estériles desechables y material de vidrio autoclavado. Asimismo, las soluciones deben estar recién preparadas y autoclavadas siempre que sea posible.

#### 4.1.2.1.- Muestra biológica y lisis celular

##### a) Sangre periférica

Se extraen 10 ml. de sangre por cada individuo, y se mezcla con 2 ml de EDTA 5% pH 7,4. Se centrifuga 5 minutos a 1.500 r.p.m.: se elimina la capa superior de plasma sin tocar a la capa de leucocitos.

Se recoge la capa leucocitaria, se vierte en un tubo de propileno de 50 mililitros, y se añade 10 ml de TLL. Se mezcla bien, y se centrifuga 10 minutos a 1.500 r.p.m. Tras ello se elimina el sobrenadante y se vuelve a tratar con el mismo tampón, hasta que macroscópicamente hayan desaparecido los hematíes del pellet.

Se resuspende el botón en 3 ml de TLL, y se añaden sucesivamente 25  $\mu$ l de SDS al 20% (este detergente lisa completamente todas las membranas) y 25  $\mu$ l de solución de proteinasa K. Entonces, los tubos se colocan horizontales sobre un rotor y se hacen girar suavemente (50 r.p.m.) unas 16 horas.

##### b) Líneas celulares

Tras ser recogidas por centrifugación, en un tubo de polipropileno de 50 ml, son resuspendidas en 3 ml de TLL, y se les añade la misma cantidad de SDS y solución de proteinasa K que cuando se está tratando sangre periférica.

#### 4.1.2.2.- Extracción con FS

Se añade 3 ml de FS a la solución de lisado celular, se agita unos minutos hasta conseguir una emulsión completa, y se centrifuga 5 minutos a 1.500 r.p.m.

La fase acuosa (la superior), que es la que contiene el DNA, se transfiere a un nuevo tubo de polipropileno de 50 ml., y se vuelve a repetir la extracción.

Por último, se extrae una vez con Sevag, y se recupera la fase acuosa.

#### 4.1.2.3.- Precipitación con isopropanol y obtención del DNA

Se añade, una vez obtenida la fase acuosa, 60 µl de ClNa 5M (concentración final en la solución: 0,1 M) y 0,6 volúmenes de isopropanol 100%. Se agita, suavemente para que las fibras de DNA no sufran roturas, hasta que el precipitado se haya formado; éste se puede ver a simple vista como una madeja que flota cuando se completa el proceso de la precipitación.

Este precipitado se "pesca" con una pipeta Pasteur con la punta cerrada (flameándola en un mechero de alcohol, por ejemplo) para evitar que la madeja ascienda por el

capilar (lo que dificultaría su recogida), y se transfiere a un criotubo estéril. Se lava tres veces en 3 ml de etanol al 70%, y tras decantarla se coloca en una campana de vacío para secarlo.

Cuando el DNA esté totalmente seco, se resuspende en tampón TE (el volumen depende del botón de DNA obtenido; partiendo de cantidades estándar de muestras biológicas, resuspendemos en 0,5 ml de TE; tras la cuantificación del DNA, se ajusta la concentración). Antes de comenzar a trabajar con el DNA, es aconsejable mantenerlo unos días a 4°C o bien incubar a 42°C, preferiblemente en un rotor, para que se disuelva bien en el tampón.

Las cantidades obtenidas oscilan entre 200 y 500 microgramos por cada 10 millones de células.

#### 4.1.2.4.- Cuantificación de ADN

Se pueden utilizar alternativamente dos métodos en la medición del ADN obtenido.

Si la muestra es pura (sin cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, u otros ácidos nucleicos) la medición por espectrofotometría de la luz ultravioleta absorbida por las bases es un método simple y exacto.

Si la cantidad de ADN es muy pequeña, o si la muestra contiene cantidades significativas de impurezas, podemos realizar la medición comparando la intensidad de

fluorescencia emitida por el ADN, en un gel con bromuro de etidio, con patrones conocidos. No ha sido necesario realizar esta técnica, debido al buen rendimiento obtenido en la extracción del DNA con la metodología empleada.

Para cuantificar la cantidad de ADN se toman lecturas de longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una absorbancia OD=1 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de ADN. La concentración de ADN sería igual al producto A<sub>260</sub> X 50 µg, siempre que la relación entre la lectura a 260 nm y 280 nm (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) sea mayor o igual a 1,5.

Esta relación proporciona una estimación de la pureza de ácidos nucléicos. Preparaciones puras de ADN tienen OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> de 1,8 a 2,0. Si hay contaminación con proteínas o fenol el OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sería significativamente inferior a los valores expresados anteriormente y la cuantificación exacta de la cantidad de ADN no sería posible. Por debajo de 1,5, las medidas obtenidas no son fiables.

El volumen mínimo de muestra es de 300 a 600 µl. Hemos medido a una dilución de 1:100 en agua destilada.

Tras cuantificar las muestras, se ajusta la concentración de DNA en todas ellas a 0,5-1 mg/ml, añadiéndole el volumen necesario de solución TE.

## 4.2.- AMPLIFICACION DEL DNA

### 4.2.1.- MATERIALES

#### 4.2.1.1.- Iniciadores (Primers)

Los iniciadores empleados en los diferentes locus figuran en la tabla III-4.

#### 4.2.1.2.- Reactivos

- Ampli-Taq DNA polimerasa. Perkin-Elmer-Cetus. Ref.

N801-0060

- Deoxinucleótidos-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, TTP).

Pharmacia Fine Chemicals. Ref. 27-2050-01, 27-2060-01, 27-2070-01, y 27-2080-01, respectivamente.

- Kit de amplificación de DNA "GeneAmp". Perkin-Elmer-Cetus. Ref. N801-0055.

- Agarosa tipo II. (Medium EEO). Sigma. Ref. A-6877.

- Control de peso molecular VI de Boehringer Mannheim (mezcla de fragmentos obtenidos mediante las digestiones de pBR328 con BglII y pBR328 con HinfI). Los fragmentos obtenidos tienen la siguiente longitud (en pares de bases): 154, 154, 220, 234, 234, 298, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766, 2176 (cada par de bases equivale a unos 660 d.).

TABLA III-4

PRIMEROS EMPLEADOS EN LA AMPLIFICACION DE LOS DISTINTOS LOCUS

Amplificación	Primer 1	Primer 2
DRB genérica	DRBAMP-A CCCCCACAGCACGTTCTT	DRBAMP-B CCGCTGCACTGTAAAGCTCT
Grupospe- cífica DR1	DRBAMP-1 TTCTTGTCGGCAGCTTAAGTT	DRBAMP-B (genérico)
Grupospe- cífica DR2	DRBAMP-2 TTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG	DRBAMP-B (genérico)
Grupospe- cífica DR4	DRBAMP-4 GTTTCTTGGAGCAGGTTAAC	DRBAMP-B (genérico)
Grupospecí- fica asocia- do a DRw52	DRBAMP-3 CACGTTCTGGAGTACTCTAC	DRBAMP-B (genérico)
DQA	DQAAMP-A CATGTGCTAATTCACCAACGG	DQAAMP-B CTGGTAGTTGTGTGCACAC
DQB	DQBAMP-A ATGGTGAAACTTGTACCAAGT	DQBAMP-B TTGGTAGCAGCGGTAGAGTTG
DPA	DPAAMP-A GC GGACCATGTGTCAAACCTAT	DPAAMP-B GCCTGAGTGTGGTTGGAACG
DPB	DPBAMP-A GAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT	DPBAMP-B GCCGGCCCCAAAGCCCTCACTC

La explicación de las dos fases de tipaje del locus DRB1 se encuentra en la sección "Marcaje de las sondas" de este mismo capítulo.

#### **4.2.1.3.- Soluciones**

##### **10 x buffer para PCR**

(incluido en el kit para amplificación)

Tris-HCl pH 8,4, 100 mM

KCl, 500 mM

MgCl<sub>2</sub>, 15 mM

Gelatina, 1 mg/ml

NP-40 0,2%

agua destilada hasta 20 ml.

Se esteriliza por filtración, se alícuota y se conserva a -20°C.

##### **Solución stock de desoxirribonucleótidos**

Es una solución de 1,25 mM de cada uno de los dNTP, en agua destilada.

Se toman 40 µl de una solución 10 mM de cada uno de los dNTP, se mezclan y se llevan hasta 320 µl con agua destilada.

##### **Disolución stock de bromuro de etidio**

Se prepara a una concentración de 10 mg/ml disolviendo 1 g de bromuro de etidio en agua destilada y enrasando a 100 ml tras disolución completa.

Se almacena en frascos de color topacio a 4°C.

#### Tampón de carga para electroforesis

Se prepara 10 veces concentrado.

Mezclar: 0,125 g de azul de bromofenol.

0,125 g de xilenocianol.

12,5 g de ficoll 400.

en agua destilada hasta 50 ml.

#### Tampón concentrado para electroforesis

Es una disolución cuya concentración final es 2 M en Tris-acetato y 0,05 M en EDTA.

Se prepara mezclando: 242 g de Tris

57,1 ml de Ácido Acético

glacial

100 ml de EDTA 0,5 M pH=8,0

en agua destilada hasta 1000

ml.

Esterilizar por autoclave.

Se conserva a temperatura ambiente. Para su utilización en la electroforesis se diluye 50 veces.

#### 4.2.1.4.- Aparatos

- Ciclador Térmico, con intervalo de temperaturas de 40°C a 100°C. Perkin-Elmer-Cetus. Ref. N-801-0177.

- Tubos de microcentrifuga de propileno para amplificación de DNA. Robbins. Ref. 1048-00-0.

- Fuente para electroforesis Bio-Rad 3000 Xi.,
- Cubetas de electroforesis de Pharmacia, GNA-100. y GNA-200.
- Transiluminador de luz ultravioleta. Ultra-violet Products, Inc.
- Cámara fotográfica Polaroid MP-4 Land, con soporte regulable.
- Película fotográfica de revelado instantáneo, ISO 3000 / 362 para blanco y negro. Polaroid 867. Ref. 24000014203.

#### 4.2.2.- MÉTODOS

##### 4.2.2.1.- Preparación de las muestras

Para cada reacción se mezclan en un tubo de 0,5 ml:

- DNA genómico.....0,2-1,0 µg  
(1 µl de una solución de 0,5-1 mg/ml)
- 10 x tampón PCR.....10 µl
- 10 x dNTP.....16 µl
- Primers.....50 pmoles
- Taq DNA polimerasa.....2 unidades
- Agua destilada.....hasta 100 µl

La concentración final en la solución de reacción de cada dNTP queda en 200 µM, y la de cada iniciador (primer) en 0,5-1 µM.

Se mezcla en un agitador y se centrifugan brevemente (10 segundos).

Se depositan 50-100  $\mu$ l de aceite mineral para evitar evaporaciones y condensaciones en las muestras debido a las altas temperaturas.

#### 4.2.2.2.- Ciclaje térmico

Hay que comenzar programando el ciclador térmico. Las condiciones de los diferentes segmentos del ciclo son distintas según el fragmento de DNA que queramos amplificar. Nosotros hemos utilizado las que figuran en la tabla III-5.

Tras el ciclaje térmico, los amplificados se mantienen a 40°C, o bien a -20°C si se va a tardar un tiempo en utilizar. Es necesario reservar 5  $\mu$ l de cada reacción para someterlos a chequeo mediante electroforesis en gel, con el objeto de comprobar la eficacia de la reacción de amplificación.

#### 4.2.2.3.- Chequeo del amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa

La finalidad de las electroforesis en geles de agarosa es separar mezclas de fragmentos de ADN en base a su tamaño. Nosotros la hemos utilizado para comprobar la presencia de un amplificado de las características adecuadas.

TABLA III-5

## CONDICIONES DE LA REACCION DE AMPLIFICACION

<u>Gen a amplificar</u>	<u>Desnaturali- zación</u>	<u>Annealing</u>	<u>Extensión</u>
DRB genérico	94°C 30seg	56°C 1min	72°C 1min 30seg
DR1-DRB1	95°C 1min	62°C 1 min	" " "
DR2-DRB1	" : "	" "	" "
DR4-DRB1	" "	" "	" "
DRw52 asoc.-DRB1	" "	" "	" "
DQA	94°C 30seg	56°C 1 min	" "
DQB	" "	" "	" "
DPA	95°C 1min	" "	" "
DPB	" "	62°C 1min	" "

Los grupos DR1-DRB1, DR2-DRB1, DR4-DRB1 y DRw52 asoc.-DRB1 corresponden a la fase grupoespecífica del tipaje del locus DRB1 (véase sección "Marcaje de las sondas").

a) Factores que determinan la velocidad de migración electroforética del ADN a través de los geles de agarosa.

a-1) Factores dependientes del ADN

Los distintos tipos de ADN tienen distinta velocidad de migración, así, el ADN lineal lo hace a distinta velocidad que el circular. Nosotros hemos trabajado sólo con ADN lineal. Sus moléculas viajan a través del gel a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo decimal de sus pesos moleculares.

a-2) Influencia del gel

Un fragmento de ADN de un tamaño determinado migra a distintas velocidades a través de geles con distintas concentraciones de agarosa.

Los geles más densos resuelven mejor fragmentos de ADN de pesos moleculares bajos y los menos densos lo hacen mejor con fragmentos de DNA de peso molecular más alto. Dado el tamaño de los fragmentos amplificados (200-300 bases), hemos utilizado geles con concentraciones de agarosa entre 1,5 y 2%.

a-3) Influencia de la intensidad de la corriente aplicada.

Para obtener una resolución máxima de los fragmentos de ADN, los geles deben ser corridos a no más de 5v/cm. Nosotros hemos realizado la mayoría de las electroforesis a 4,5v/cm.

b) Técnica de electroforesis

b-1) Preparación del tampón de electroforesis

El tampón para la electroforesis se prepara a partir de la disolución madre diluida 1/50 con agua destilada a la que se le añade bromuro de etidio de su disolución madre de 10 mg/ml hasta una concentración final de 1 µg/ml. Este colorante es el método más conveniente para visualizar el ADN en los geles de agarosa; contiene un grupo planar que se introduce entre las pilas de bases del ADN. La radiación UV absorbida por el ADN a 260 nm y transmitida al colorante, o la radiación absorbida a 300 y a 360 nm por el colorante es emitida a 590 nm en la región rojo-anaranjada del espectro visible.

El bromuro de etidio se incorpora tanto en el gel como en el tampón antes de correr la electroforesis y posteriormente se examina el gel directamente con transiluminación UV. Puede examinarse durante el proceso de electroforesis o al final del recorrido.

b-2) Preparación del gel.

Se utilizan geles de 250 ml de volumen, los cuales son preparados de la siguiente manera: 4 g de agarosa tipo II (queda al 1,6%) más 5 ml de tampón de electroforesis, se enrasa con agua destilada hasta 250 ml. También se pueden realizar electroforesis en minigeles, de 50 ml., con las que se pueden analizar pequeñas cantidades de ADN rápidamente; su preparación es similar a los geles

más grandes: 0,8 g. de agarosa, más 1 ml. de tampón de electroforesis. El tamaño de gel empleado depende del número de muestras a chequear, ya que el minigel sólo permite analizar hasta 16 muestras simultáneamente, mientras que en el tamaño normal podemos disponer de hasta 40 pocillos.

Se calienta hasta ebullición para que se diluya por completo la agarosa. Se deja enfriar hasta 50°C y se le añade entonces el bromuro de etidio. Se vierte entonces en el portageles previamente sellado con cinta de autoclave y en el cual se ha colocado un peine que forma los pocillos para las muestras.

Una vez solidificado el gel, se quita el peine y la cinta de autoclave, se introduce el portageles en la cubeta de electroforesis y se cubre con la disolución reguladora 1 X. Para realizar la electroforesis son útiles las cubetas horizontales. En estas, el gel queda sumergido justo debajo de la superficie del tampón de electroforesis. La resistencia al paso de la corriente del gel es la misma que la del tampón, de tal manera, que una considerable fracción de la corriente aplicada pasa a través del gel.

#### b-3) Preparación de la muestra

Las muestras se mezclan con una décima parte respecto del volumen final de tampón de carga 10 X, el cual aumenta la densidad de la muestra para que pueda penetrar fácilmente en los pocillos. Esto se realiza en tubos de

microcentrifuga de 0,5 o 1 mililitro.

Una vez añadido el tampón de carga, se agitan bien con un vórtex los tubos eppendorf para homogeneizarlo y se centrifuga posteriormente para recoger bien la muestra.

Para poder extraer el peso de los fragmentos de ADN se ha utilizado el marcador de peso molecular VI de Boehringer Mannheim. Se tratan de igual forma que los otros ADN, aunque sólo se toman 2  $\mu$ l, que se diluyen a la quinta parte con agua destilada (hasta un total de 10  $\mu$ l, el mismo volumen que el resto de las muestras), antes de añadir el tampón de carga.

Una vez preparadas las muestras y los marcadores de Peso molecular se introducen en los pocillos del gel sumergido en el tampón de electroforesis, utilizando una micropipeta. Todas las electroforesis se efectuan a temperatura ambiente.

#### b-4) Realización de la electroforesis

Cuando el gel está cargado, se cubre la cubeta y se conecta ésta a la fuente de electroforesis, con las condiciones adecuadas, y se mantiene hasta que la separación entre las dos bandas de colorante presentes en el tampón de carga producida por el campo eléctrico sea la suficiente como para pensar que los fragmentos de DNA estén suficientemente definidos.

b-5) Visualización

Los geles se fotografían sometidos a transiluminación UV a 260nm (Figuras III-1 a III-3). Si ha existido amplificación, se visualizará una banda, de un peso molecular determinado, que corresponderá al gran número de copias idénticas del DNA diana, generadas durante el proceso de amplificación, migrando al unísono.

Figura III-1:

Chequeo de los amplificados obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa aplicada sobre el locus DRB de varias muestras. Las bandas que se observan corresponden a dichos amplificados; en el ultimo pocillo se colocó el control de pesos moleculares (VI de Boehringer Mannheim). La amplificación ha sido correcta pues el tamaño teórico del amplificado (274 pb -pares de bases-) se corresponde con la localización de las bandas (entre los fragmentos de 234 y 298 pb del control de pesos moleculares). La amplificación ha sido además específica, al no aparecer bandas adicionales. En el pocillo nº 21 de la hilera inferior no se depositó muestra alguna, por lo que aparece "vacío".

**FIGURA III-1**

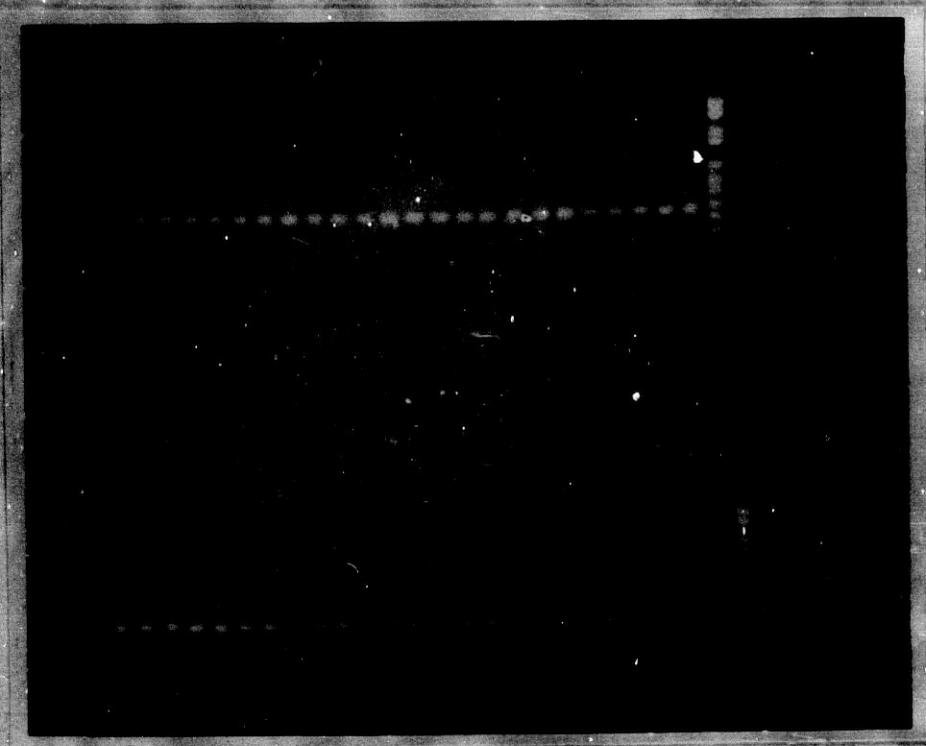


Figura III-2:

Chequeo en gel de agarosa de los amplificados del locus DPB. Esta amplificación ha resultado igualmente correcta (el tamaño teórico, de 327 pb, se corresponde con la posición de las bandas, entre los fragmentos de 298 y 394 pb del control de peso molecular), y específica (no se aprecian bandas adicionales de amplificación).

**FIGURA III-2**

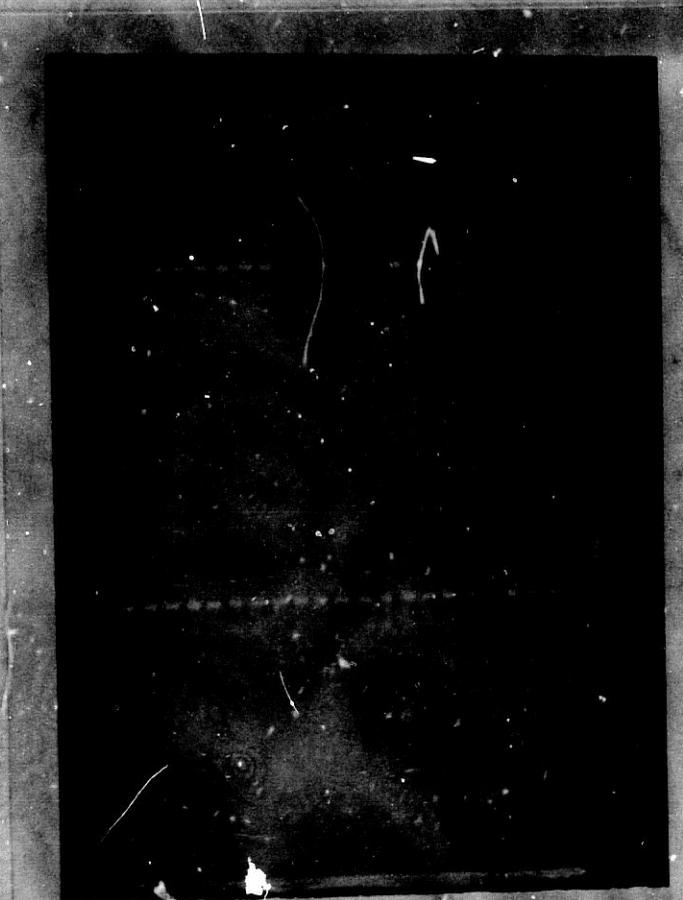
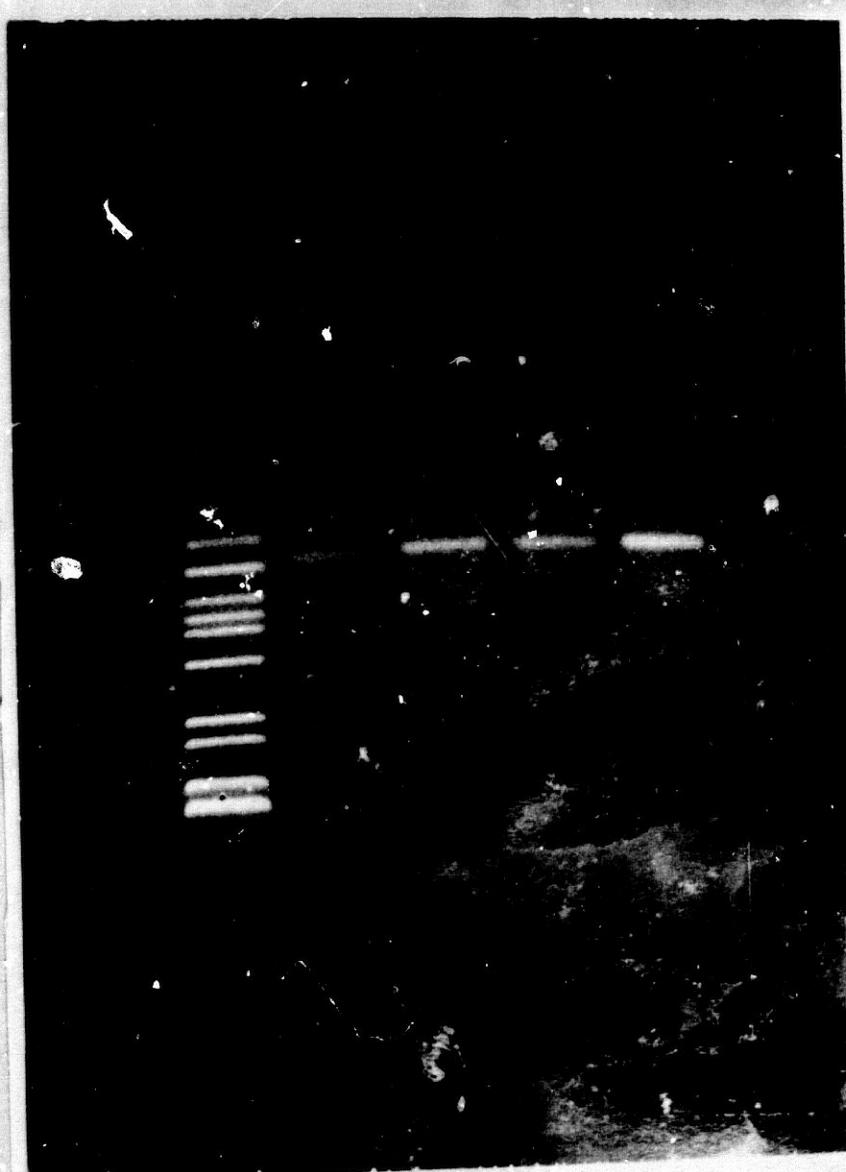


Figura III-3:

Chequeo en gel de agarosa de pequeño tamaño (minigel) de amplificados de DRB de algunas muestras. Todas las consideraciones expuestas en la figura 3-1 pueden aplicarse aquí. El minigel es más rápido cuando el número de muestras a chequear es pequeño (menos de 8).

**FIGURA III-3**



### **4.3.- TRANSFERENCIA DEL AMPLIFICADO A MEMBRANA (DOT BLOT)**

#### **4.3.1.- MATERIALES**

##### **4.3.1.1.- Soluciones**

###### **Solución desnaturizante**

Es una solución 0,4N en NaOH y 25 mM en EDTA

Se mezclan: 10 ml de solución NaOH 10 N

12,5 ml de EDTA 0,5 M

Agua destilada hasta 250 ml.

##### **4.3.1.2.- Aparatos**

- Membrana de transferencia de ácidos nucleicos para hibridación Gene Screen. NEN-Dupont. Ref.NEF-976.
- Aparato de microfiltración Bio-Dot. Bio-Rad. Ref. 170-6542.
- Sistema de vacío.

#### **4.3.2.- MÉTODOS**

La concentración de DNA amplificado debe monitorizarse por electroforesis, ya que debe depositarse la misma cantidad de amplificado en todos los pocillos.

Para confeccionar 5 filtros, se mezclan 15 µl de

amplificado con 250  $\mu$ l de solución de desnaturalización.

Se hiere durante 5 minutos en un tubo con tapón de rosca (por ejemplo, un criotubo) y se introduce rápidamente en hielo, para evitar la renaturalización.

Se lava el aparato de microfiltración con etanol, y a continuación con agua destilada. Se escurre sobre papel secante. Seguidamente se ensambla, colocando dos papeles 3MM y sobre ellos la membrana de nylon, previamente empapados en agua destilada, encima de la mitad inferior del dispositivo. Se coloca la mitad superior, y se atornilla, siempre en diagonal; a continuación se conecta el vacío, para eliminar el agua que escurre de los papeles y membrana, y para asegurar el cierre del aparato. Este paso es importante, ya que si el aparato no está adecuadamente cerrado, los pocillos no están herméticamente aislados de los adyacentes, y se corre del riesgo de contaminación entre ellos.

Seguidamente se carga el aparato depositando 50  $\mu$ l de la muestra en cada pocillo, evitando burbujas entre la muestra y el filtro. Se conecta el vacío "suave", y se hacen pasar las muestras lentamente; si lo hacemos rápidamente, corremos el riesgo de que las moléculas del amplificado atraviesen la membrana y se eliminan junto a los desechos.

Cuando las muestras han pasado completamente, se lavan los pocillos una vez con TE, y se conecta el vacío

"fuerte". Cuando la solución de lavado haya pasado por completo, se abre el dispositivo manteniendo el vacío conectado, y se saca el filtro, cortando una de las esquinas para identificar posteriormente su orientación correcta. Por último, se fija el DNA al filtro sometiéndolo a un secado a 80°C durante una hora ("Cocinado"), o alternativamente, se ilumina con luz ultravioleta (longitud de onda 254 nm o  $0.12 \text{ J/cm}^2$ ).

#### **4.4.- MARCAJE DE LAS SONDAS**

##### **4.4.1.- MATERIALES**

###### **4.4.1.1.- Sondas específicas de secuencia (SSO)**

Las sondas empleadas figuran en las tablas III-5 a III-7 con sus especificidades. Debido a la complejidad del polimorfismo en el locus DRB, no es posible por el momento caracterizar completamente todos sus alelos en un solo paso. Por ello, se ha dividido el tipaje de este locus en dos fases: una "genérica", con un nivel de detección de alelos similar a la técnica serológica, y en la que se clasifican las muestras en ciertos "grupos de tipaje": DR1, DR2, DR4 y grupo de alelos asociados a DRw52, y otra "grupo-específica", por la cual se llega al máximo de precisión dentro de tales grupos. La tecnología empleada en ambas fases es similar (excepto las condiciones de amplificación como ya describimos en la sección correspondiente). Para mayor claridad, en el locus DRB se ha desglosado el panel de SSOs empleado en ambas fases teniendo que repetir sondas incluidas en ambas fases. Todas ellas se han empleado de acuerdo con el protocolo del Workshop Internacional de HLA.

###### **4.4.1.2.- Reactivos**

- Adenosín trifosfato (gamma-P<sup>32</sup>). Amersham.

TABLA III-6

## SONDAS SSO PARA EL LOCUS DRB (GENÉRICO)

Oligo-nucleótido	Secuencia	Especificidad genómica ***	Equiv. serológica
DRB1001	TAAGTTTGAATGTCATT		DR1
DRB1003	GTACTCTACGTCTGAGTG		DR3, w11, w13, w14 (salvo DRB1*1404)
DRB1004	GAGCAGGGTTAACATGAG		DR4
DRB1005	AGAAATAAACACTCACCCG		DRw8, w12, w14 (sólo DRB1*1404)
DRB1006	TGGCAGGGTAAGTATAAG		DR7
DRB1007	GAAGCAGGATAAGTTGAG		DRw9
DRB1008	GAGGAGGTTAACAGTTGAG		DRw10
DRB1009	CAGCAGGATAAGTATGAG	Locus DRB5	DR2
DRB1010	GAGCTGCGTAAGTCTGAG	DRB3*0101	DRw52a
DRB1011	GAGCTGCTAACAGTCTGAG	DRB3*0201, DRB3*0202 DRB3*0301	DRw52b w52c
DRB2801	CGGTTGCTGGAAAAGATGC		DR1
DRB2802	GGTTACTGGAGAGACACT		DRw12
DRB2803	TGGAAAGACTCTTCTATA		DR7
DRB2804	GTATCTGCACAGAGGGCAT		DR9
DRB2805	GTTCCCTGCACAGAGACAT	DRB5*0101	DR2
DRB2810	GCGAGSTGTGGAACCTGAT		DRw53
DRB3707	AACCAAGAGGGAGAACGTG	0901, DRB5*0101	DR9, DR2
DRB3708	GCGCGTACTCCTCTTGGT		DRw10, DRw53
DRB3709	GGAGGGACTTGCCTTCGA	DRB5*0101	DR2
DRB5703	GCCTGTAGAGGGAGTACTG		DRw11
DRB7011	GACATCCTGGAGCAGGCG	1501, 1502	DR2
DRB8602	AACTACGGGGCTGTGGAG	0102, 1201, 1202 DRB5*02	DR1, DRw12 DR2

## SONDAS SSO ESTRUCTURALES

SSO-1	CCACGTCGCTGTCGAAGC	DRB1 (salvo DRB1*1001) DRB3, DRB5, DQB1, DPB1
SSO-2	AGCTCCGTCACCGCCCCGG	DRB1, DRB5, DPB1 DRB3*0101, DRB3*0301

\*\*\*: Mientras no se especifique lo contrario, todas las especificidades indicadas corresponden al locus DRB1.

TABLA III-6 bis

## SONDOS SSO PARA EL LOCUS DRB (GRUPOESPECIFICO)

Oligo- nucleotido	Secuencia	Especificidad genómica ***	Equiv. serológica
DRB2801	CGGTTGCTGGAAAGATGC	0101,0102,0103	DR1
DRB3701	CCAAGAGGAGTCCGTGCG	0101,0102,0103	DR1
DRB5701	GCCTGATGCCGAGTACTG	0101,0102,0103	DR1
DRB7001	TCCTGGAGCAGAGGCGGG	0101,0102	DR1
DRB7007	ACATCCTGGAAAGACGAGC	0103	DR1
DRB8601	AACTACGGGGTTGGTGAG	0101,0103	DR1
DRB8602	AACTACGGGGCTGTGGAG	0102	DR1
DRB3702	AACCAGGAGGAGTCCGTG	1501,1502,1601,1602	DR2
DRB5706	GCCTGACGCTGAGTACTG	1501,1502,1601,1602	DR2
DRB7002	GACTCCTGGAAAGACAGG	1601	DR2
DRB7003	GACCTCCTGGAAAGACAGG	1602	DR2
DRB7011	GACATCCTGGAGCAGGCG	1501,1502	DR2
DRB8601	AACTACGGGGTTGGTGAG	1502,1601,1602	DR2
DRB8603	AACTACGGGGTTGTGGAG	1501	DR2
DRB3701	CCAAGAGGAGTCCGTGCG	0406	DR4
DRB3704	ATCACCAAGAGGAGTACG	0401,0402,0403,0404 0405,0407,0408,0409 0410,0411	DR4
DRB5701	GCCTGATGCCGAGTACTG	0401,0402,0403,0404 0406,0407,0408,0409 0410,0411	DR4
DRB5702	GCCTAGCGCCGAGTACTG	0405,0409,0410,0411	DR4
DRB7001	TCCTGGAGCAGAGGCGGG	0403,0404,0405,0406 0407,0408,0410,0411	DR4
DRB7005	ACCGCGGGCCCCTCTGC	0401,0409	DR4
DRB7006	GCAGAGGCAGAGGCGGG	0403,0406,0407,0411	DR4
DRB7007	ACATCCTGGAAAGACGAGC	0402	DR4
DRB8601	AACTACGGGGTTGGTGAG	0401,0405,0407 0408,0409	DR4
DRB8603	AACTACGGGGTTGTGGAG	0402,0403,0404 0406,0410,0411	DR4

\*\*\*: Mientras no se especifique lo contrario, todas las especificidades indicadas corresponden al locus DRB1.

TABLA III-6 bis

SONDAS SSO PARA EL LOCUS DR (GRUPOESPECIFICO)  
(continuación)

Oligo-nucleótido	Secuencia	Especificidad genómica ***	Equiv. serológica
DRB2802	GGTTACTGGAGAGACACT	0301	DRw12
DRB2807	GCGGTACCTGGACAGATA	0302, 1402, 1403	DR3
DRB2809	TTCCTGGAGAGATACTTC	0301, 0302, 1301, 1302	DR3, w14
DRB3703	ACCAGGAGGAGAACGTGC	1304, 1305, 1402, 1403	DR3, w13
DRB3712	CAGGAGGGAGTTCGTGCGC	1401, 1404, 1405	w14
DRB3701	GCCTGATGCCGAGTACTG	0301, 0302, 1301	DRw14
		1302, 1305, 1402	DR3, w13
		1403, 0802, 0804	w14, w8
DRB5702	GCCTAGCGCCGAGTACTG	0801, 0803, 1303, 1304	DRw13, w8
DRB5703	GCCTGATGAGGAGTACTG		DRw11
DRB5704	GCCTGCTGCGGAGCACTG	1401, 1404	DRw14
DRB5705	GCCTGTCGCCGAGTCCTG	1201, 1202	DRw12
DRB7001	TCCGGAGCAGAGGCGGG	1402	DRw14
DRB7002	GACTTCCTGGAAAGACAGG	1101, 1104, 1202, 1305	DRw11, w12
		0801, 0802, 0804	w13, w8
DRB7003	GACCTCCTGGAAAGACAGG	1403	DRw14
DRB7004	GGCCGGGTGGACAAC TAC	0301, 0302	DR3
DRB7007	ACATCCTGGAAAGACGAGC	1102, 1301, 1302, 1304	DRw11, w13
DRB7008	ACTTCCTGGAAAGACGAGC	1103	DRw11
DRB7009	AGCGGAGGCAGGGCCGAGG	1401, 1404, 1405	DRw14
DRB7010	GGACATCCTGGAAAGACAG	1201, 0803 *	DRw12, w8
DRB8601	AACTACGGGGTTGGTGAG	0302, 1101, 1302	DR3, w11
		1303, 1402, 1403	w13, w14
		0801, 0802, 0803	w8
DRB8603	AACTACGGGGTTGTGGAG	0301, 1102, 1103, 1104	DR3, w11
		1301, 1304, 1305, 1401	w13, w14
		1404, 1405, 0804	w8

\*: Crosreacciona con alelos positivos para DRB7007  
y con el alelo DRB1\*1303.

\*\*\*: Mientras no se especifique lo contrario, todas las  
especificidades indicadas corresponden al locus DRB1.

TABLA III-7

## SONDAS PARA LOS LOCI DQA Y DQB

Denominación	Secuencia	Especificidad
DQA2501	TGGCCAGTACACCCATGA	0101, 0102, 0401, 0501 DQA2
DQA2502	TGGCCAGTTCACCCATGA	0103, 0201, 0601
DQA2503	TGGGCAGTACAGCCATGA	03011, 03012, 0302
DQA3401	GAGATGAGGAGTTCTACG	0101
DQA3402	GAGATGAGCAGTTCTACG	0102, 0103, 0501
DQA3403	GAGACGAGCAGTTCTACG	0401, 0601
DQA4102	ACCTGGAGAAGAAGGGAGA	0103
DQA5501	TCAGCAAAATTGGAGGTT	0101, 0102, 0103
DQA5502	TCCACAGACTTAGATTTG	0201
DQA5503	TCCCGCAGATTTAGAACAT	03011, 03012, 0302
DQA5504	TCAGACAATTTAGATTTG	0401, 0501, 0601
DQA6901	ATGGCTGTGGCAAAACAC	0101, 0102, 0103
DQA6902	ATCGCTGTGCTAAAACAT	0201, 03011, 0302
DQA6903	ATCGCTGTCTCTAAAACAT	0501, 03012
DQA6904	ATCGCTGTGACAAAACAC	0401, 0601
DQA7502	CTTGAACATCCTGATTAA	0201, 0401, 0601
DQA7504	CTTGAACAGTCTGATTAA	0501
DQA-LS0	TCTCCATCAAATTCATGG	Estructural
DQB2301	GACCGAGCTCGTGCAGGGG	0401
DQB2302	AACGGGACCGAGCGCGTG	03031, 0402
DQB2601	CGGGGTGTGACCAGACAC	0501, 0502, 05031, 05032
DQB2602	CGTTATGTGACCAGATAAC	0601, 0301
DQB2603	CGTCTTGTGACCAGATAAC	0602, 0302, 03031, 03032
DQB2604	CGTCTTGTAAACCAGACAC	0603, 0604
DQB2606	CGTCTTGTAAACCAGATAAC	0605
DQB3701	AGGAGTACGTGCGCTTCG	0501, 0502, 05031, 05032
DQB3702	AGGAGGGACGTGCGCTTCG	0601
DQB4501	GACGTGGAGGTGTACCGG	0301
DQB4901	GGTGTACCGGGCAGTGAC	0501
DQB5701	GC GG CCT GTT GCG GAGTA	0501, 0604, 0605
DQB5702	GC GG CCT TAG CG CCC GAGTA	0502, 0504
DQB5703	GG CGG CCT GAC CG CCC GAGT	05031, 0601
DQB5704	GC GG CCT GAT GCG GAGTA	05032, 0602, 0603
DQB5705	GG CT GCG CT GCG CCC GAGT	0201
DQB5706	GG CC GCG CT GAC CG CCC GAGT	0301, 03031, 03032
		Reacción cruzada con 0302
DQB5707	GG CC GCG CT GCG CCC GAGT	0302
DQB5708	GC GG CCT GAC CG CCC GAGTA	0401, 0402
DQB7002	GACCCGAGCGGGAGTTGGA	0601
DQB7003	GAGGGGACCCGGGGCGGGAG	0602, 0603
DQB7005	GAAAACGGGCGGCGGGTGGAA	0201
SSU-1		Estructural

TABLA III-8

## SONDAS PARA LOS LOCI DPA Y DPB

Denominación	Secuencia	Especificidad
DPA3101	AAGATGAGATGTTCTATG	0101, 0102, 0103
DPA3102	AAGATGAGCAGTTCTATG	0201
DPA5001	AGTTTGGCCAAGCCTTTT	0101, 0102, 0103
DPA5002	AGTTTGGCCGAGCCTTTT	0201
DPB0901	GAATTACCTTTCCAGGGAA	0201, 0202, 0401, 0402
DPB0902	GTGTACCAAGTTACGGCAG	0501, 0801, 1601, 1901
DPB0903	GTGTACCAAGGGACGGCAG	0301, 0601, 1101, 1301
DPB0904	GTGCACCAAGTTACGGCAG	0101, 1501, 1801
DPB3501	GGGAGGAGTTCGCGCGCT	0901, 1001, 1401, 1701
DPB3502	GGGAGGAGTTCGTGCCT	0401
DPB3503	GGGAGGAGCTCGTGCCT	0201, 0301, 0402, 0601
DPB3504	ACAACCAGCAGGAGTACG	0801, 0901, 1401, 1601
DPB3505	GGGAGGAGTACCGCGCGCT	1701, 1801, 1901
DPB5501	GGCCTGCTGCAGGAGTACT	0202, 0501
DPB5502	GGCCTGATGAGGAGTACT	1101, 1501
DPB5503	GGCCTGAGGCGGGAGTACT	0101, 0401, 1101, 1301, 1501
DPB5504	GGCCTGATGAGGAGTACT	0201, 0402, 0801
DPB6502	GCCAGAAGGACCTCCTGG	1001, 1601, 1801
DPB6901	GACATCCTGGAGGAGAAC	0202, 0501, 1901
DPB6902	GCTCCTCCTCCAGGATGTC	0301, 0601, 0901, 1401, 1701
DPB6903	GACCTCCTGGAGGAGAAC	0301, 0601, 1101, 1401
DPB6905	ACCTCCTGGAGGAGAGGC	0101, 0301, 0401
DPB6906	GAGGAGAAGCGGGCAGTG	0402, 0501, 1401, 1801
DPB7601	GGACAGGATGTGCAGACA	No 7602 ó 7603
DPB7602	GGACAGGGTATGCAGACA	0101, 0301, 0801
DPB7603	GGACAGGATATGCAGACA	0901, 1001, 1401
DPB8501	AGCTGGCGGGCCCCATGA	1301, 1901
DPB8502	AGCTGGTCGGGCCATGA	0201, 0202, 0401, 0402
DPB8503	AGCTGGACGAGGCCGTGA	1501, 1801
SSO-1		No 8501 ó 8502
SSO-2		Estructural
		Estructural

Ref.PB 10218

- T4 Polinucleótido Kinasa (E. Coli B).

Amersham. Ref. T2020Z.

#### 4.4.1.3.- Soluciones

##### Disolución de ditiotreitol (DTT) 1 M

Se disuelven 1,54 g de DTT en acetato sódico 0,01 M  
pH=5,2 hasta un volumen final de 10 ml.

Se esteriliza por filtración y se almacena en  
alicuotas a -20°C.

##### Tampón concentrado para la T4 polinucleótido kinasa

Se prepara 10 veces concentrado respecto de la  
concentración en uso.

Es una solución 0.5 M en Tris-ClH pH 7.6, 0.1 M en  
Cloruro Magnésico, 50 mM en Ditiotreitol.

Se mezclan: 5 ml de Tris-ClH 1 M pH 7,6  
1 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M  
500 µl de DTT 1 M  
Agua destilada hasta 10 ml.

#### 4.4.1.4.- Aparatos

- Gradilla termostatizada para tubos de microcentrifuga de 1 ml. Grant BT3.
- Protector para radioactividad de metacrilato.

Nalgene 6700-2418.

#### 4.4.2.- MÉTODOS

Para el marcaje de oligonucleótidos podemos usar dos enzimas: la desoxirribonucleosidil transferasa terminal (TdT) y la T4 polinucleótido kinasa (T4 PNK). Hemos optado por la última pues no introduce ningún nucleótido en la secuencia de la sonda, lo que alteraría el patrón de hibridación de la sonda; su acción consiste en transferir al extremo 5' de una cadena de nucléótidos el grupo fosfato más distal o τ de una molécula de Adenosín Trifosfato, al cual se le ha introducido un átomo de fósforo-32 (P-32) que emite radiación gamma. En cambio la TdT actúa encadenando nucleótidos radioactivos al extremo 3' del oligonucleótido.

Para cada marcaje se mezclan en un tubo de microcentrifuga de 1 ml.

- Tampón de T4 PNK (10x).....2.5 μl
- Oligonucleótido.....5-10 pmol
- ATP τ-P-32.....60 μCi
- T4 Policucléótido Kinasa.....10-20 U
- Agua destilada.....hasta 25 μl

Se incuba a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se detiene la reacción añadiendo 1 μl de EDTA 0.5 M.

Los oligonucleótidos marcados pueden ser usados directamente o tras eliminación de nucleótidos radioactivos no incorporados.

## 4.5.- HIBRIDACION

### 4.5.1.- MATERIALES

#### 4.5.1.2.- Soluciones

##### Solución de fosfato monosódico 1 M

Se disuelven 120 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en un litro de agua destilada.

##### 30 x SSPE

Es una disolución 4,5 M en ClNa, 0,3 M en Fosfato monosódico, y 30 mM en EDTA. El pH final debe quedar en 7,4.

Se disuelven: 263,25 g de ClNa

300 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M

60 ml de EDTA 0,5 M pH 8

Aqua destilada hasta 950 ml.

Se ajusta el pH a 7,4 con NaOH, y se completa con agua destilada hasta un litro.

##### 50 x Denhardt

Es una disolución cuya concentración final es 1% en ficoll 400, 1% en polivinil pirrolidona (mn 360.000), 1% en BSA (seroalbúmina bovina).

Se prepara disolviendo:

1 c de ficoll 400

1 g de polivinilpirrolidona

1 g de BSA

disolver en agua destilada hasta 100

ml.

Esterilizar por filtración y dispensar en alicuotas.

Almacenar a -20°C.

#### Preparación de esperma de salmón

Se prepara a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada.

Disolver 500 mg de esperma de salmón en 50 ml de agua destilada y esparcirlo pasándolo repetidas veces por una aguja.

Después, se hiere 10 minutos y se guarda en alicuotas de 1 ml a -20°C. Antes de usarlo se debe poner en ebullición durante 5 minutos y enfriarlo rápidamente en hielo.

#### Solución stock de cloruro de tetrametilamonio (CTMA)

Es una solución al 5M.

Se disuelven 1096 g en dos litros de agua destilada.

Se esteriliza en autoclave

#### Solución TMAC

Es una solución 50 mM en Tris-HCl pH 8.0, 3M en

Cloruro de tetrametilamonio, 2 mM en EDTA y 0.1% SDS.

Se mezclan: 100 ml de Tris-ClH pH 8

1200 ml de solución CTMA

8 ml de EDTA 0,5 M pH 8

10 ml de SDS al 20%

Agua destilada hasta 2000 ml

#### Solución 4 x SSPE

Se obtiene a partir de 30 x SSPE, tomando 133,33 ml de 30 x SSPE y completándose con agua destilada hasta un litro.

#### Buffer de hibridación A

Es una solución 50 mM en Tris-ClH pH 8.0, 3 M en cloruro de tetrametilamonio, 2mM en EDTA (pH 8.0), 0.1 % de SDS, y 5% de solución de Denhardt, a los que se añaden 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado.

Se mezclan: 25 ml de Tris-ClH pH 8

300 ml de solución CTMA

2 ml de EDTA 0,5 M pH 8

2,5 ml de SDS al 20 %

50 ml de 50 x Denhardt

5 ml. de esperma de salmón a 10 mg/ml

Agua destilada hasta 500 ml

#### Buffer de hibridación B

Es una solución de 6 x SSPE, 5 x Denhardt y 0,5% de SDS conteniendo 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón.

Se mezclan: 100 ml de 30 x SSPE

50 ml de 50 x Denhardt

12,5 ml de SDS al 20 %

5 ml de esperma de salmón a 10 mg/ml

Agua destilada hasta 500 ml.

#### Solución de lavado 1 (2 x SSPE, 0,1 % SDS)

Se mezclan 66,7 ml de 30 x SSPE, y 5 ml de SDS al 20%. Se completa con agua destilada hasta un litro.

#### Solución de lavado 2 (6 x SSPE, 1% SDS)

Se mezclan 200 ml de 30 x SSPE y 50 ml de SDS al 20%, completándose con agua destilada hasta un litro.

#### 4.5.1.2.- Aparatos

- Baño termostatizado con agitación Unitronic 3200R.

P-Selecta.

- Plataforma horizontal para lavados de membranas con agitación Luckham R100/TW

- Láminas de plástico especial para filtros radiactivos.

- Chasis para placas radiográficas.

#### 4.5.2.- MÉTODOS

El ADN, en determinados medios y a determinadas temperaturas es capaz de hibridar monocadena con monocadena. La hibridación depende del grado de complementariedad de las secuencias.

Esta técnica se utiliza para investigar en un ADN problema si existen secuencias similares a un ADN conocido (sonda).

Hemos utilizado dos métodos, que difieren únicamente en los componentes del buffer de hibridación y lavados, y en la temperatura a la que éstos últimos se realizan.

La hibridación consta de varias fases: prehibridación, hibridación propiamente dicha, lavados y autorradiografía.

#### 4.5.2.1.- MÉTODO NUMERO 1

##### 4.5.2.1.1.- Prehibridación

La prehibridación consiste en mantener el filtro en contacto con el tampón de hibridación A (10 ml para cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana) a 54°C con agitación constante, durante al menos 30 minutos con el fin de empapar bien el filtro en este tampón. Para ello el filtro se introduce en un recipiente de plástico rotulado (debido a las exigüas dimensiones de los filtros, de aproximadamente 2 x 8 cm. utilizamos tubos de polipropileno de 50 ml) y se empapa con la solución 4 x SSPE, antes de humedecer con el tampón de

hibridación.

#### 4.5.2.1.2.- Hibridación

Se abre el tubo donde está el filtro prehibridando y se añade 30-60 ng (5-10 pmol) de sonda oligonucleotídica marcada. Se agita para homogeneización, y se deja 1-3 horas a 54°C en un baño con agitación constante.

Un periodo prolongado de hibridación (por encima de las 10 horas) puede causar un elevado background.

#### 4.5.2.1.3.- Lavados

El objeto de estos lavados es eliminar toda aquella hibridación que se haya producido entre la sonda y el ADN con bajo grado de complementariedad, dejando sólo la hibridación que detecta secuencias muy homólogas a las de la sonda.

Es posible cambiar tanto la temperatura como la composición de las disoluciones en las que se realizan los lavados. A mayor temperatura la hibridación es más específica, así como lo es también si realizamos los lavados con el tampón con 0,1 x SDS. No se puede sobrepasar la temperatura a la cual se deshíbrida el ADN, pero cambiando los tampones de lavado y la temperatura, podemos conseguir hibridaciones más o menos específicas. Con el uso del Cloruro de Tetrametilamonio se facilita la hibridación y el lavado independientemente de la secuencia

del oligonucleótido (Wood y cols., 1985).

Después de realizada la hibridación, se lava cada filtro en las siguientes condiciones:

- dos veces en 20 ml. de solución I de lavado, a temperatura ambiente durante 10 minutos cada vez, para eliminar el exceso de sonda. Al terminar esta primera tanda de lavados, se puede someter el filtro a una autorradiografía para valorar la unión de la sonda al filtro (todos los dots deben dar suficiente señal).

- a continuación, una vez con 20 ml. de solución TMAC durante 10 minutos, a temperatura ambiente.

- por último, dos veces en esta misma solución, 10 minutos cada una, a 56-58°C.

Todos deben efectuarse con agitación suave continua.

Las temperaturas empleadas en la hibridación y lavados, dependen de la longitud de los oligonucleótidos utilizados como sondas; las descritas aquí están indicadas para sondas 18mer (18 nucleótidos), grupo en el que se incluyen la práctica totalidad de las sondas empleadas en este trabajo.

#### 4.5.2.1.4.- Autorradiografía

Se coloca el filtro sobre un papel 3MM Whatman para eliminar el exceso de líquido, pero sin dejar secar completamente. Se introducen varios filtros en una bolsa de plástico, para evitar contaminaciones radioactivas, y se

colocan sobre un chasis con pantalla intensificadora.

Los filtros se exponen dos veces a película fotográfica para radiografías; la primera exposición es breve (30 min a 2 horas), y la segunda larga (16-24 h).

Tras cada una de ellas se revela la película.

#### 4.5.2.2.- MÉTODO NÚMERO 2

Se diferencia del método número 1 en los siguientes puntos:

- La prehibridación e hibridación se realizan con un tampón diferente (tampón B), y a una temperatura diferente al método anterior (42°C).

- Los tiempos son diferentes también; la prehibridación lleva al menos 1 hora, y la hibridación de 2 a 16 horas.

- Los dos primeros lavados son idénticos al método 1 (tampón 1), pero los dos siguientes se realizan con el tampón 2 de lavado y a temperatura variable que depende de la longitud y secuencia de la sonda. Esta temperatura ( $T_d$ ), específica para cada sonda, se calcula con arreglo a la siguiente fórmula:

$$T_d = 4 \times (\text{nº de G} + \text{nº de C}) + 2 \times (\text{nº de A} + \text{nº de T})$$

(siendo G, C, A, y T Guanina, Citosina, Adenina y Timina).

En lo demás este método es idéntico al anterior.

#### **4.6.- PROCEDIMIENTO DE TIPAJE**

La reactividad se valora a partir de la señales obtenidas en las autorradiografías de exposición breve, y se le asigna un valor arbitrario, según su intensidad, de entre los que siguen (Figura III-4):



La asignación de un tipaje se realiza en base a la plantilla que indica la especificidad de cada oligonucleótido (véase la sección correspondiente al "Marcado de las sondas").

Figura III-4:

Autorradiografías correspondientes a hibridaciones con los oligonucleótidos DQB3701 y DQB4702, realizadas con el método SSPE; el tiempo de exposición es de 20 horas. Vienen a ilustrar los criterios seguidos en la asignación de valores (0, 1, 2, 4, y 8) a las señales; en el recuadro situado al lado derecho de cada una de las autorradiografías se consignan las valoraciones realizadas. En el ejemplo inferior la intensidad de las señales es algo más baja que en el superior; cada autorradiografía debe ser valorada por separado, de acuerdo con la impresión que se obtenga de ella, pues los valores no se corresponden con tamaños absolutos de señal. Estos criterios son aplicables a todos los locus, independientemente de las condiciones de hibridación.

**FIGURA III-4**

**A) SSO DQB3701**



6	1	1
2	2	8
4	1	6
4	8	1
4	8	8
8	1	1
6	1	2
4	4	2

**B) SSO DQB4902**



1	1	1
1	1	2
6	4	6
1	1	6
8	2	8
4	2	1
1	4	1
1	1	6

**IV - R E S U L T A D O S**

---

## 1.- TIPAJE SEROLOGICO

En un primer término, realizamos el tipaje serológico a todos los individuos de los que pudimos disponer de células frescas; en seis (nº 6, 11, 33, 37, 38 y 39) sólo se pudo obtener DNA; se incluyeron para valorar la eficacia del tipaje genómico en ausencia de datos serológicos.

En algunos casos en los que aparecía un blanco en el locus DR se repitió el tipaje para intentar detectar el/los alelos que faltaban. La mayor parte de los tipajes ha sido realizado mediante la técnica de la fibra de nylon; en el resto de las muestras y en las repeticiones antedichas se ha aplicado el método inmunomagnético; hemos observado que ninguna de las dos técnicas mejora el resultado del tipaje con respecto a la otra. Por ello, los datos y tipajes obtenidos mediante técnica serológica son expuestos conjuntamente.

El grupo de muestras incluía representaciones de todos los alelos DR, incluyendo variantes poco frecuentes, como DRw8 (nº 3 y 4), DRw9 (nº 9) y DRw10 (nº 22, 26 y 30); por ello podíamos considerarlo como adecuado para experimentar sobre la eficacia del tipaje genómico. En cierto número de casos aparecen alelos "blancos" en DR asociados a DRw52 (muestras nº 14, 15, 20, 22, 24, 27, 28,

31, 32, 36); en algunos casos más, el alelo en blanco se asocia a DRw53 (números 17, 25, 30). Esto es una indicación de que tales muestras no son homozigotas para DR, sino que en realidad poseen un alelo no detectado por la metodología aplicada; de hecho, era de suponer que muchas de los "blancos" en DR asociados a DRw52 sean realmente DRw6. Esto fue confirmado posteriormente mediante el tipaje genómico.

Por otra parte existen otras muestras en las que no fue posible detectar ninguno de los dos alelos DR (nº 23, 24, 27 y 28). En la tabla IV-1 figuran los tipajes asignados a las diferentes muestras (Todas las tablas de este capítulo se encuentran al final de éste).

## 2.- TIPAJE GENOMICO

Fueron realizados los tipos genómicos correspondientes a todos los locus codificantes de clase II que muestran polimorfismo, es decir: DRB, DQA, DQB, DPA y DPB. Vamos a pas a describir los resultados obtenidos haciendo hincapié en los que presentan cierta relevancia para el estudio que nos ocupa.

Se ha empleado el método de hibridación SSPE en todos los locus. La técnica TMAC sólo ha sido aplicada en el tipaje de DRB; por tanto sólo en ese locus ha existido la oportunidad de comparar resultados.

### 2.1.- Valoración de los resultados obtenidos con ambas técnicas de hibridación

La fiabilidad de los resultados obtenidos con ambas técnicas es similar, a juzgar por la consistencia de los patrones de reacción de las diferentes muestras con la batería de SSO; se consideró como positiva toda reacción cuyo valor asignado fuera igual o superior a 4. Sin embargo la técnica número 2 proporciona señales más débiles que la número 1 (TMAC), de manera que en ésta última, la intensidad de la reacción a 1 hora de

la posición a la placa radiográfica es comparable a la obtenida por el método número 2 (SSPE) a las 16 horas de exposición.

Por otra parte, la heterogeneidad observada en las señales obtenidas en distintas sondas al hibridar con el método SSPE, mucho mayor a compararlo con la técnica alternativa (TM<sup>AC</sup>), impide tener referencias comunes a todas las sondas a la hora del tipaje, y obliga a valorar cada autorradiografía por separado en relación a la impresión general obtenida al examinarla en su conjunto; es decir, la intensidad que corresponde al valor 8 (máxima hibridación) o el 1 (mínima hibridación) por ejemplo, no será igual en todas las sondas, y dependerá del SSO que estemos considerando: esos dos extremos de intensidad serán los que hay que tomar en cuenta como puntos de referencia, siempre que el contraste entre ambas sea suficiente como para pensar que en la más intensa ha existido hibridación y en la más débil no. Por otra parte, es digno de destacar el hecho de que los SSO "estructura" (framework) que actúan como controles positivos al hibridar con todos los alelos, han dado señales muy débiles, sobre todo con DRB, en contraste con las proporcionadas por las otras sondas.

En el método TMAC las reacciones fueron lo suficientemente intensas, y se discrimina más fácilmente entre lo presumiblemente positivo y lo negativo; de todas

maneras, los controles empleados tampoco funcionaron adecuadamente. Hemos podido asimismo observar que el número de valoraciones intermedias ("2", "4" y en menor grado "6") obtenidas con el TMAC es sensiblemente inferior al método alternativo (SSPE), lo que ha incidido notablemente en la precisión en los tipajes conseguida por el primer método; estas reacciones de intensidad intermedia introducen un elemento de duda al no precisar claramente si tal reacción es positiva o negativa.

A título de ejemplo en las figuras IV-1 y IV-2 podemos comparar las señales obtenidas con las mismas sondas empleando ambos métodos, y comprobar la diferente valoración que es necesario realizar sobre diferentes sondas. En las figuras IV-3 a IV-6 podemos ver las señales obtenidas en las hibridaciones con ciertos oligonucleótidos seleccionados, todos ellos realizados con el método SSPE, para ilustrar que la asignación de valores a las distintas señales es relativa a la impresión en su conjunto.

Por añadidura, en la figura IV-7 hemos mostrado la importancia que el tiempo de exposición a la película radiográfica puede tener en las valoraciones, ya que un tiempo elevado puede dar lugar a falsos positivos o un elevado background (en algunas muestras, la valoración se eleva prácticamente un nivel: de un "2" sube a un "4", y de un "4" a un "6"). Hemos comprobado que el tiempo

Figura IV-1:

Comparación entre las señales autoradiográficas obtenidas con la misma sonda (SSO DRB1001) en las dos condiciones de hibridación (SSPE y TMAC) empleadas. Los tiempos de revelado han sido 20 horas para la hibridación con SSPE y 1,5 horas para el método TMAC. Obsérvese que la intensidad de la señal ha sido similar en ambos métodos a pesar de la diferencia de tiempo; esto sugiere que indica que el TMAC incrementa la sensibilidad del tipaje respecto al empleo del SSPE.

**FIGURA IV-1**

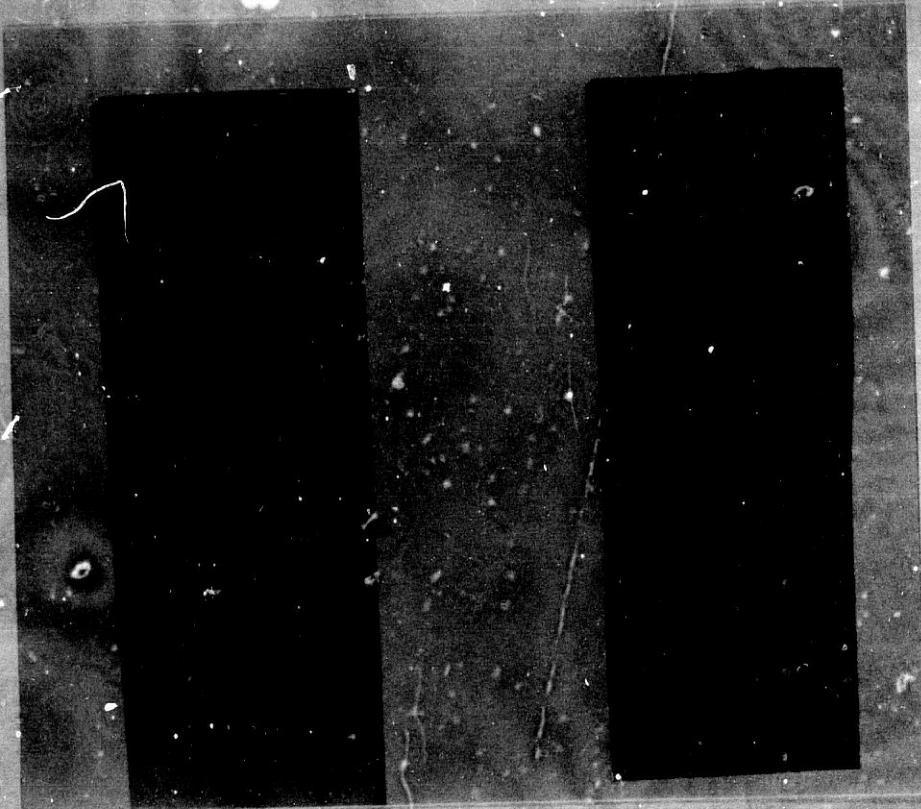
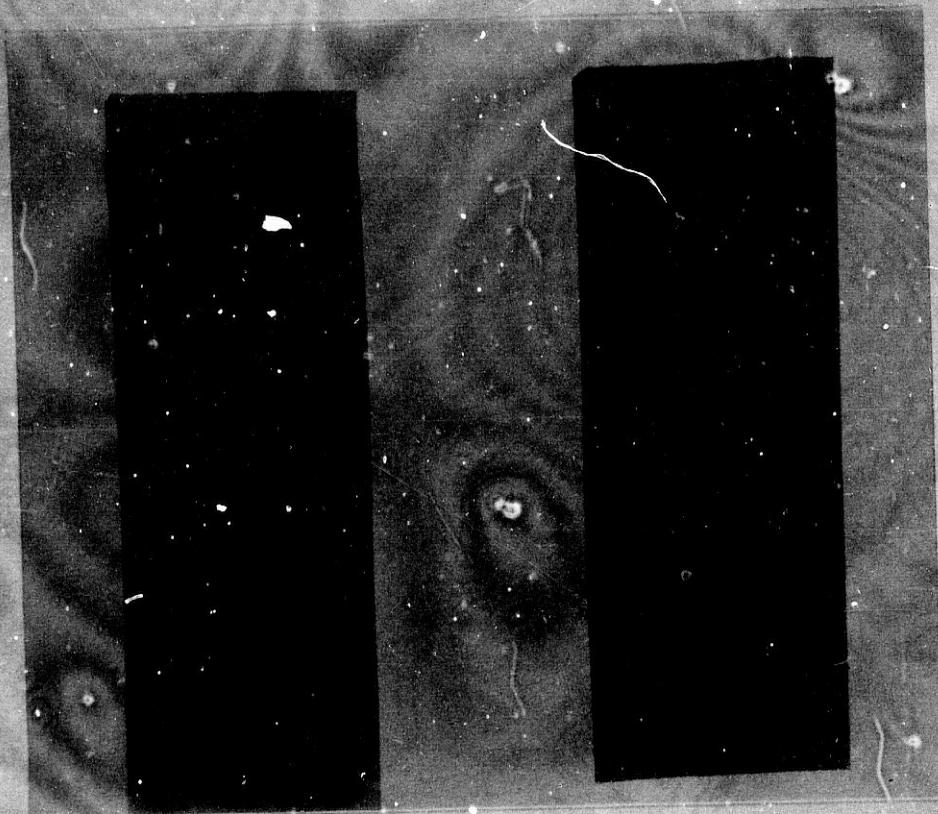


Figura IV-2:

Ilustra el mismo hecho que la figura anterior. Los tiempos de revelado son similares a los expuestos en la figura anterior (20 horas para SSP<sup>I</sup> y 1,5 horas para TMAC). Se observa un cierto background en la hibridación con TMAC. El oligonucleótido empleado como sonda es, en esta ocasión, el DRB5703.

**FIGURA IV-2**



Figuras IV-3 a IV-6:

En estas figuras se exponen las señales obtenidas con algunos oligonucleótidos que ilustran algunos aspectos de los criterios empleados en la asignación de valores.

En la autorradiografía 4-3 la intensidad de la reacción, valorada en "8" (es decir, claramente positiva) es similar en todos los pocillos; corresponde a un SSO que funcionaba como control positivo para el locus DPB.

La figura 4-4 procede de la hibridación con SSO DPB6905; en todos los pocillos se observa una señal débil que fue considerada como background; por tanto, todas las muestras recibieron una valoración de "1" (es decir, claramente negativa).

En 4-5 aparecen 4 reacciones débiles, que, por ausencia de señal en el resto de muestras, han sido consideradas positivas; con este ejemplo se puede apreciar la dificultad en la valoración de señales débiles, en ciertos casos.

En la hibridación 4-6 aparece señal generalizada de cierta intensidad, sobre la cual destacan tres muestras; únicamente éstas han sido valoradas como positivas, mientras que el resto es considerado background.

FIGURA IV-3

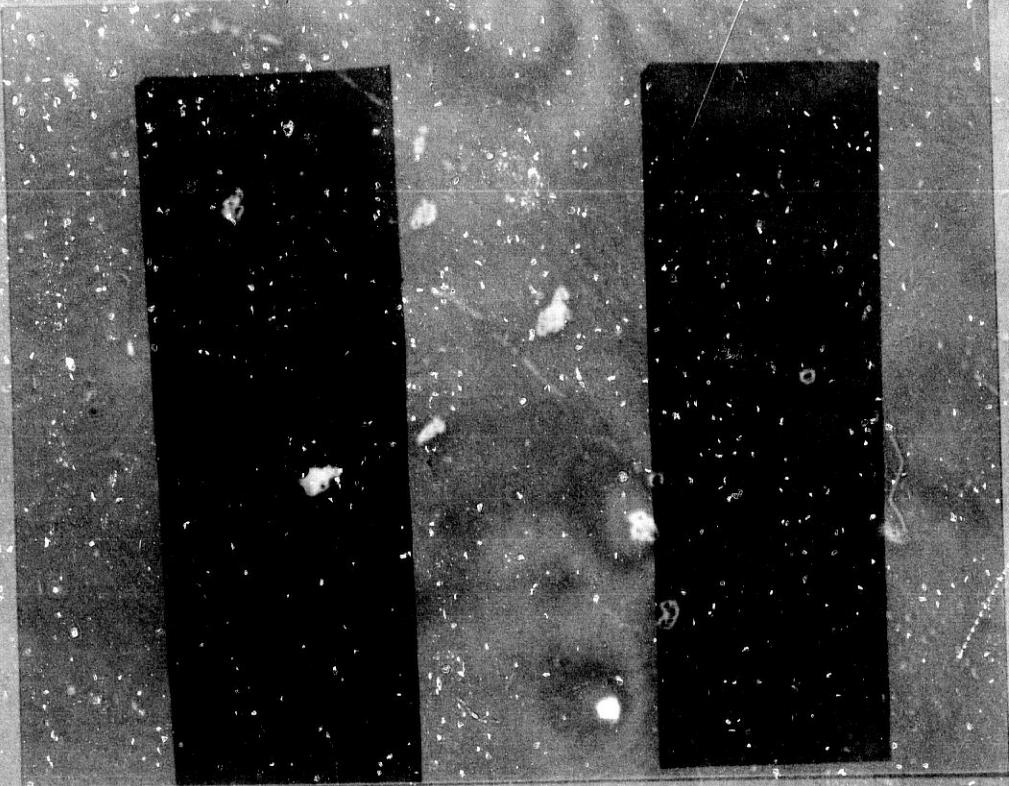


FIGURA IV-4

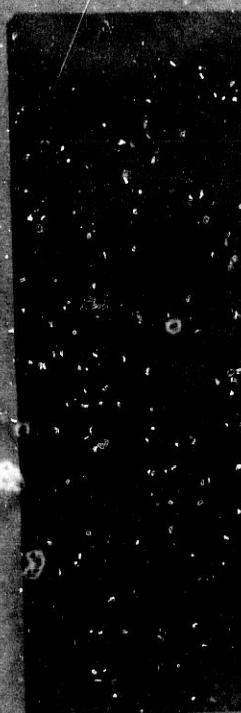


FIGURA IV-5



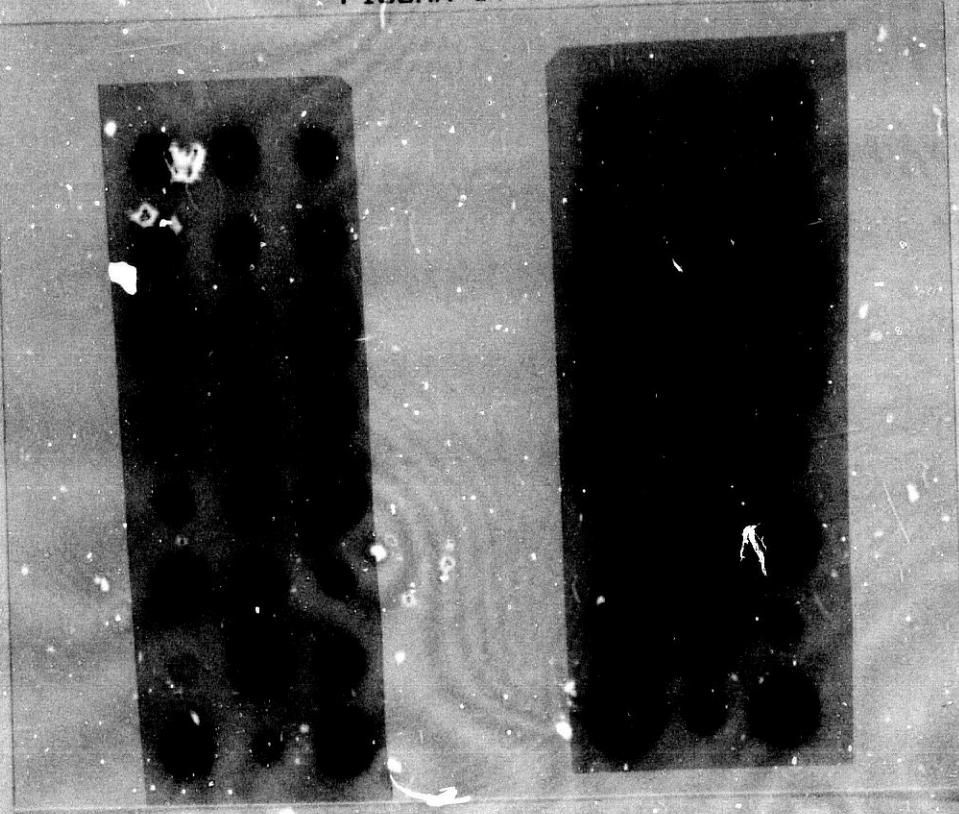
FIGURA IV-6



Figura IV-7:

Señales obtenidas con la misma sonda, en las mismas condiciones (SSPE), pero con diferente tiempo de exposición de la autorradiografía a los filtros (6 y 20 horas). Las señales obtenidas a las 20 horas son bastante más intensas, incluyendo aquéllas que a las 6 horas prácticamente carecen de señal, lo que puede conducir a dudas sobre su positividad. Esto ilustra la necesidad de optimizar el tiempo de exposición para que las muestras positivas impresionen suficientemente a la vez que se evita que lo hagan las negativas.

**FIGURA IV-7**



idóneo es de unas 2 horas de exposición.

## 2.2.- Tipaje del locus DRB

Esta parte del trabajo ha sido realizada en las dos fases expuestas en el capítulo "Material y Métodos", en la primera de las cuales (genérica) se han probado los dos métodos diferentes de hibridación, mientras que en la segunda (grupoespecífica) se ha empleado la técnica que mejores resultados dió en la primera.

### 2.2.1.- Tipaje genérico

Se procedió a amplificar las muestras. Por medio de la electroforesis en agarosa se obtuvo una banda fluorescente del tamaño previsto (274 pares de bases) en la mayor parte de las ocasiones, que corresponde con las moléculas del amplificado (Véase figura III-1 y III-2 en el capítulo "Materiales y Métodos"); cuando no se observaba dicha banda, o su intensidad era sensiblemente inferior a la del resto de bandas (lo que indicaría una menor concentración de DNA presente en dicho amplificado), se procedió a repetir el procedimiento de amplificación, con el objeto de conseguir la máxima homogeneidad en cuanto a concentración de DNA entre los amplificados (esta homogeneidad es conveniente, por otra parte, para la

elaboración del dot blot); en muy pocas ocasiones fue necesario repetir. No se apreciaron bandas anómalas ni adicionales en ningún caso, lo que sería indicativo de la existencia de reacciones de amplificación incorrectas. Por tanto, los amplificados se encontraban en condiciones idóneas para ser sometidos a hibridación.

Sobre tales amplificados se realizó el tipaje genómico de DR. Para la fase genérica se dividió la serie de muestras en dos grupos; en cada uno de ellos se empleó una de las dos técnicas de hibridación: la técnica nº 2 (que emplea la solución SSPE en el tampón de hibridación) fue utilizada para el primer grupo (nº 1-22) y la nº 1 (que contiene TMAC) para las demás (nº 23-38), incluyendo en éste último grupo las líneas celulares homozigotas. Las valoraciones realizadas sobre las señales impresionadas en las autorradiografías están expuestas en las tablas IV-2 y IV-3.

A partir de estas valoraciones, fueron asignados unos tipajes provisionales (tablas IV-5 y IV-6), que indicarían en qué grupo específico de DR se incluirían las muestras concretas (en la tabla IV-4, figuran los patrones que determinan tal inclusión), para efectuar el tipaje grupoespecífico de DRB1 pertinente (es decir, segunda fase del tipaje genómico en este locus). Cuando una muestra reacciona de una forma más o menos intensa y homogénea con un grupo de oligonucleótidos que reconocen un alelo

concreto, se le asigna dicho alelo; se denomina patrón de reacción de un alelo determinado a la reacción que este grupo de oligonucleótidos tiene con una muestra cualquiera; la reacción extra sería aquélla que se separa de estos patrones definidos.

La mayoría de los SSO empleados en esta fase ha dado resultados consistentes. Solamente el DRB1009 y DRB2803 han dado señales más débiles que otros oligos que comparten especificidad con éstos. El DRB2802, específico para DRw12, ha mostrado alto ruido de fondo, e incluso algunos posibles positivos (nº 5, 7, 13, 22) que demostraron ser falsos al ser tipados posteriormente en la fase grupoespecífica.

Asimismo, en algunas muestras han surgido problemas en la valoración de los señales correspondientes a los SSO específicos para DRw9 (DRB1007, DRB2804, y DRB3707, compartido con DR2), debido a la baja intensidad de la señal obtenida. En la nº 9 se asignó el tipaje DRw9, aun cuando sólo haya hibridado con uno de los tres SSO específicos de DRw9 (DRB3707, que además comparte con DR2, aunque no da reacción con los otros SSO para DR2, por lo que se descarta este último alelo), ya que presenta asociación con DRw53, y no hay reacción con los SSO específicos de los otros alelos que se asocian a DRw53 (DR4 y DR7).

Para uno de los alelos en el individuo nº 12 se

planteaba la duda entre asignar DR2 y DRw9, pues sólo existía reacción con uno de los SSO para DR9 (DRB3707), que también reacciona con DR2. En la muestra nº 20 este mismo SSO parece proporcionar un falso positivo, toda vez que también tiene reacción con DR4 que podría explicar el patrón de reacción con los SSO para DRw53 (lo que descartaría el alelo DRw9), además de que presumiblemente aparece otro alelo que está asociado a DRw52; no hay otros indicios de que este individuo pudiera ser DR2 a juzgar por las reacciones con el resto de SSO. Los tipajes de ambos individuos fueron aclarados posteriormente al serles practicado el tipaje grupoespecífico.

Las muestras 9 y 10 han presentado patrones de reacción atípicos. Ambos han reaccionado con DRB5703 específico para DRw11, pero ninguno de ellos lo ha hecho con los SSO específicos de DRw52 (DRB1010 y DRB1011), al cual va asociado; en la 9 tampoco hay reacción con los SSO específicos para los alelos asociados a DRw52 (DRB1003 y DRB1005); en el tipaje grupoespecífico esto fue definido satisfactoriamente; en cambio en la muestra 10 sí hubo señal con DRB1003, lo que supuso asignarle definitivamente el alelo DRw11.

Hemos podido observar que no hay diferencias importantes con los resultados obtenidos por el tipaje serológico, salvo que la gran mayoría de alelos blancos por serología han sido detectados, incluyendo los casos

con "blancos" en ambos alelos DR, y han sido catalogados dentro del grupo asociado a DRw52 (que incluye DR3, 5 [w11 y w12], w6 [w13 y w14] y w8). Incluso en la muestra nº 16, cuyo tipaje serológico aparecía como DR1 homozigoto (al no haberse hallado asociación con ninguna especificidad supertípica DRw52 ni DRw53), se detectó un alelo perteneciente a este mismo grupo asociado a DRw52. Por otra parte, en las muestras nº 17 y 30, aparece un "blanco" serológico asociado a DRw53 en cada una de ellas, que ha sido caracterizado genómicamente como DR4; también contamos con un caso (nº 26) en el que se ha detectado, igualmente por métodos genómicos, un alelo DR4, aun sin ser DRw53 en serología. En esta fase del tipaje sólo hemos encontrado un individuo que podría ser catalogado como homozigoto (nº 23), ya que sólo es positivo para los SSO DR1 y no se asocia a las especificidades supertípicas DRw52 ni w53, ni en serología ni mediante hibridación con SSO; las líneas HTC dieron el resultado esperado, de acuerdo con su propio tipaje conocido.

#### 2.2.2.- Tipaje grupospecífico

Esta fase incluye 4 grupos: DR1, DR2, DR4, y grupo asociado a DRw52 (DR3, DR5, DR6, y DR8). La metodología usada para la hibridación ha sido la TMAC, ya que en el tipaje genérico fue la que ofreció resultados más nítidos.

Las muestras a las que se les ha aplicado esta segunda fase del tipaje fueron la totalidad de las muestras de la segunda serie (método TMAC) que fueron encuadradas en algún grupo específico de tipaje, junto con algunas de la primera serie (método SSPE) en las que podía ser interesante conocer sus tipajes más profundamente. No se consideró necesario realizar tipaje grupoespecífico sobre la muestra 4, ya que el individuo del que provenía es hermano de la nº 3, y los patrones de reacción en el tipaje genérico fueron idénticos, por lo que se supuso que los tipajes grupoespecíficos serían asimismo similares.

Antes de pasar adelante, es preciso diferenciar entre "DRw52" y lo que hemos llamado en este trabajo "grupo asociado a DRw52"; lo primero designa una especificidad supertípica, correspondiente al producto del gen DRB3; lo segundo designa un grupo de alelos codificados por el gen DRB1, que se hallan asociados a la especificidad DRw52 y que presentan gran similitud en sus secuencias de nucleótidos; es decir, estamos hablando de genes parecidos y estrechamente ligados, pero diferentes. Por tanto, en esta fase del trabajo, no hemos tipado los alelos de DRw52 (que es lo mismo que decir gen DRB3) para los que existe un grupo particular de SSOs específicos de este locus, sino alelos de DRB1.

Las amplificaciones realizadas para esta fase del tipaje rindieron productos de tamaño y concentración

adecuados, sin bandas adicionales. Solamente la muestra nº 12, incluida en el grupo DR2, no obtuvo banda de amplificación, como tampoco la muestra nº 30 en el grupo DR4. Dentro de cada grupo sometimos a amplificado líneas homozigotas cuyo tipaje no correspondía a ese grupo en concreto, a manera de controles de amplificación negativos; en ningún grupo de tipaje hubo amplificado de tales líneas.

Las señales autoradiográficas permitieron establecer valoraciones con gran margen de seguridad en prácticamente todas las muestras. Tales valoraciones vienen reflejadas en las tablas nº IV-7 a IV-10.

Todos los SSO en los cuatro grupos dieron resultados consistentes entre sí salvo algunas excepciones. En el grupo DR1, el SSO 2801 no dió señal alguna, aún cuando abarca todas las especificidades DR1. Asimismo, el SSO DRB3704, incluido en el grupo DR4, presentaba señales débiles. Dentro del grupo asociado a DRw52, el SSO DRB2809 no dio señal, a pesar de que las especificidades que cubre son idénticas a otros SSO, en los cuales sí hubo señal compatible con los datos obtenidos en el tipaje genérico. El DRB3712, con idénticas especificidades al anterior, dió señales muy débiles. Por otra parte, el SSO DRB7008, presentó un alto ruido de fondo y algunos falsos positivos, así como en el DRB2807, en el que fue algo difícil trazar el umbral entre las muestras positivas y

las negativas, debido al elevado background.

Los tipajes asignados tras esta segunda fase se encuentran detallados en la tabla IV-11. Estos tipajes son consistentes con los obtenidos tras la primera fase (genérica), aclarándose algunas dudas como la ofrecida por la muestra número 12, en la que se descartó el alelo DR2 al no haber amplificado, y por lo tanto se le atribuyó el otro alelo que estaba en discordia, DRw9 (véase más arriba en "Tipaje genérico"). En la muestra nº 13 se ha descartado la posibilidad de que sea DRw6 (que le fue asignado por serología), y por contra se le atribuye DRw8. La muestra 20 resultó ser DR4 pues se amplificó con los cebadores (primers) específicos de este grupo, por lo que se descarta el DRw9 (que también aparecía como posible) al existir otro alelo asociado a DRw52. A pesar de no conseguir amplificación en el grupo DR4 en la muestra nº 30, se asigna este alelo a dicha muestra, ya que el patrón de reacción obtenido en la fase genérica es típica de DR4. En ninguna muestra hemos observado un patrón consistente en el alelo DRw12, por lo que no ha sido asignado a ninguna muestra, y todas las reacciones que han aparecido con esta sonda han sido consideradas extras (podemos comprobar por ejemplo, que DRB2802, específico de DRw12, no da ninguna señal con muestra alguna en la fase grupospecífica, mientras que en la fase genérica en la que también está incluido, presenta una gran cantidad de

S

reacciones débiles; todo ello indica que tales reacciones son falsas o cruzadas con otros alelos); esto confirma que los resultados obtenidos en el tipaje genérico en relación a este alelo son inespecíficos y obedecen exclusivamente bien a ruido de fondo, bien a crossreacción.

Por otra parte, la discriminación entre alelos a nivel genómico (sobre todo en el grupo DR4), no fue posible en ciertas muestras (nº 12, 13, 20, 25, 26, 34, 35), debido a la identidad en sus patrones de reacción.

En la figura IV-8 se muestran a título de ejemplo las señales obtenidas en cuatro muestras con el método TMAC (nº 32, 33, 35 y 36) tanto en la fase genérica como en la grupoespecífica.

### 2.3.- Tipaje locus DQA

(Tablas IV-12 y IV-14)

Se ha conseguido tipar con cierta seguridad la mayor parte de los casos aunque no en todos los alelos se han obtenido patrones de reacción que permitan su asignación clara a las muestras. El amplificado rindió igualmente bandas nítidas del tamaño esperado (229 pares de bases).

En la mayor parte de las muestras han aparecido extrareacciones; incluso en algunas, las reacciones parecen seguir más de dos posibles patrones de reacción,

Figura IV-8:

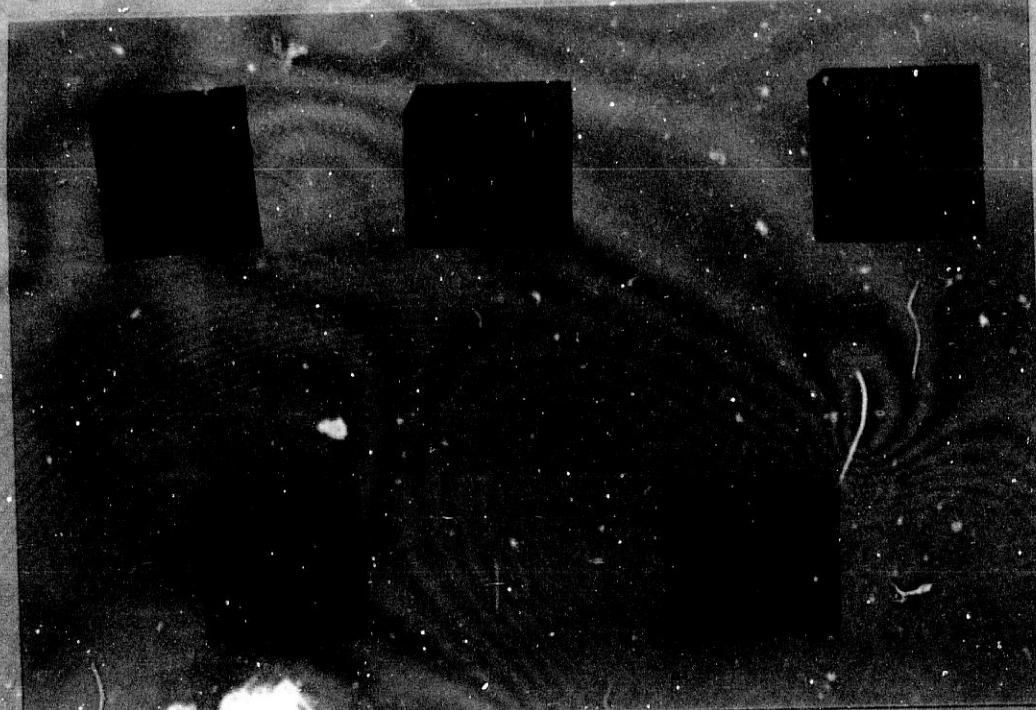
Ejemplo concreto de las señales obtenidas tras la hibridación de cuatro muestras (nº 32, 33, 35 y 36), con todos los SSO del panel empleado para el locus DRB genérico, y DRB grupoespecífico asociado a DRw52. El método de hibridación empleado ha sido el TMAC; el tiempo de exposición es 1,5 horas. Sólo se han consignado aquéllas autoradiografías que mostraban señal, descartándose cuando no aparecía impresión en ninguna de las cuatro muestras. Los valores asignados a cada muestra, así como los tipajes provisionales de cada muestra se hallan en las tablas de resultados correspondientes (IV-3 para el tipaje genérico, IV-6 para asignación de alelos serológicos provisionales; IV-10 para el tipaje grupoespecífico DRw562, y IV-11 para asignación de alelos definitivos).

T I P A J E   D R   B   G R U P O E S P E C I F I C O   D R w 5 2

DRB2807

DRB3703

DRB3712



DRB5701

DRB5704

DRB7001

DRB7004



DRB7009

DRB8603

T I P A J E   D R B   G E N E R I C O

DRB1003

DRB1004

DRB1010



DRB1011

DRB2802

DRB2810

DRB3707

DRB3708

DRB7011



DRB8601

DRB8602

DRB8603

lo que es imposible, dado que en nuestro genoma sólo contamos con dos copias de cada locus.

En general, con las sondas que constituyen el patrón de reacción de los alelos DQA1\*01, DQA1\*02 y DQA1\*03 hemos obtenido resultados coherentes, lo que indica que estos oligonucleótidos funcionan correctamente. Solamente el alelo 0103 se tipa con relativa debilidad con su sonda específica DQA4102 (casos nº 5, 15 y 19) al igual que el alelo DQA1\*0201 con las suyas (casos nº 1 y 2). Asimismo, el patrón ofrecido por las muestras nº 15 y 16 para el alelo 0102 ha sido débil, por lo que en la tabla figuran con interrogación. El panel disponible, por otra parte, no distingue entre las variantes 03011 y 0302, por lo que en la tabla los hemos colocado juntos cuando proceden. Por el contrario, los alelos DQA1\*04, 05 y 06 han sido más difíciles de caracterizar con claridad, ya que los oligos que los reconocen tienen especificidades imbricadas; DQA\*04 y 06 no han podido ser identificados por separado dada la debilidad de la reacción obtenida con los oligos que los reconocen independientemente (sobre todo DQA2501).

Contamos con dos casos presumiblemente homozigotos (nº 10 y 22) al presentarse solamente un patrón de reacción. En otros casos aparece un único patrón compartido por varios alelos (véase párrafo anterior), por lo que no podemos saber si son homozigotos o heterozigotos (nº 3, 4 y 12).

Los oligonucleótidos entre cuyas especificidades se incluye DQA1\*0501 (los SSO DQA3402 y DQA 5504) han tenido un gran número de extra-reacciones (DQA3402 en las muestras nº 3, 4, 9 y 13; y DQA5504 en los casos 7, 19, 20 y 21) aunque sin llegar a conformar un patrón claro de reacción; de manera que sólo se ha asignado tal especificidad cuando el patrón de reacción ha sido completo y nítido (casos 8 y 10; quizá pudiera asignársele también a las muestras nº 5 -en el que, a pesar de que ofrece un patrón completo de DQA1\*0501, aunque débil, hay otros dos alelos más probables, pues sus patrones están más claros-, nº 13 -patrón incompleto, al no haber reacción con DQA6903, que es otro SSO que reconoce el alelo DQA1\*0501-, y nº 19 -es más factible la posibilidad de que sea DQA1\*0102 en lugar de DQA1\*0501-). Dado que esta especificidad está presente en muchos SSOs que tienen además otras especificidades, ha sido en ocasiones difícil descartarlo a la hora de asignarlo como alelo, en las muestras en las que el patrón prácticamente aparecía completo.

También merece la pena destacar la falta de reacciones claras presentada por el SSO DQA7502 (que teóricamente reconoce alelos presentes en algunas muestras del estudio), y la heterogeneidad mostrada por DQA2501, en muestras con las que sobre el papel debía reaccionar (dando en unos casos resultados intensos, al lado de otros).

muy débiles o negativos).

#### 2.4.- Tipaje locus DQB

(Tablas IV-13 y IV-14)

En este locus muchas sondas han seguido un comportamiento parecido al expuesto en DQA. Es decir, en muchos casos, las reacciones son débiles o existen extra-reacciones que enmascaran ciertos patrones de reacción.

La reacción de amplificación fue satisfactoria, obteniéndose un amplificado del tamaño previsto (214 pares de bases).

En general, hemos obtenido para casi todos los alelos patrones nítidos con los oligos que los reconocen; ha habido algunas dificultades con algunos cuyos patrones de reacción están imbricados entre sí, sobre todo cuando las valoraciones de las hibridaciones arrojan resultados intermedios ("4", sobre todo) que no permiten discriminar fácilmente entre los positivos y los negativos; esto ha ocurrido sobre todo con las variantes DQB1\*0302, 0303, 0502, 0503, y 06.

En tres casos (nº 17, 20 y 22) no hemos obtenido reacción alguna con el panel de SSOs, y en el nº 9, las reacciones han sido muy débiles y sin formar patrón alguno, por lo que no fue posible asignar alelos con seguridad.

Cinco casos aparecen como posibles homozigotos, ya que sólo se presenta un patrón de reacción: nº 3, 4, 10, 13, y 15. En otros casos aparece un segundo patrón de reacción débil (nº 11 y 16). En algunos casos más, aparece un patrón incompleto: en la muestra nº 5 aparece un alelo claro y se dudaba entre dos posibilidades para el segundo alelo, DQB1\*0602 y 0603, cuyos patrones de reacción son muy semejantes; en ambos alelos falta la reacción con uno de los oligos que hubiera discriminado entre ambos (DQB2602 y 2603, respectivamente) y hubiera completado el patrón; en la muestra nº 21, se pensó que su segundo alelo podría ser el DQB1\*0301, pero presenta un patrón débil, y además no presenta reacción con uno de los SSO que forman parte de él (DQB2602). En los casos nº 7 y 8 tenemos dos patrones incompletos para el segundo alelo: el primer alelo está claramente definido (DQB1\*0201), pero para el segundo existían dos posibilidades: DQB1\*05031 y 05032, ya que existe reacción con los oligos que los reconocen (DQB5703 y 5704, respectivamente); como quiera que sólo puede haber dos copias del locus DQB1, alguna de ellas es una extrareacción, pero con el panel disponible, no podemos saber cuál es. Todos estos casos, en los que no hay seguridad sobre los tipajes asignados aparecen reflejados en la tabla con un signo de interrogación.

Algunos oligonucleótidos mostraron falsas reacciones (aquéllas que no se corresponden con un patrón de

reacción, sino que aparecen aisladamente) sobre todo el DQB3702 (casos nº 6, 7, 8, 18 y 21), que mostró un elevado background; también los SSO DQB2602, DQB3701, DQB5701, y DQB7002 presentan reacciones extra en los casos nº 19, 14, 11 y 15, respectivamente.

#### 2.5.- Tipaje del locus DPA

(Tabla IV-15 y IV-17).

Este locus no ha ofrecido ninguna dificultad, dado el escaso número de alelos caracterizados, y de SSOs que los reconocen. El amplificado es de 240 pares de bases de tamaño.

Sólo cabe resaltar que en la gran mayoría de casos estudiados sólo se ha identificado el grupo DPA\*01, cuyos alelos no pueden ser discriminados con el panel de SSOs disponible. Por otra parte, sólo hemos detectado dos individuos DPA\*0201, uno de ellos heterozigoto, junto a DPA\*01). En la única muestra DPA\*0201 presumiblemente pura, los GSOs para DPA\*01 han mostrado cierto nivel de ruido de fondo.

#### 2.5.- Tipaje del locus DPB

(Tablas IV-16 y IV-17)

Al igual que en el resto de locus, la reacción de

amplificación fue muy específica, no apareciendo más que una única banda del tamaño esperado (327 pares de bases).

Si bien en todos los loci de HLA clase II el polimorfismo se localiza en una serie de secuencias, unas alelo-específicas y otras compartidas cada una de ellas por 2-3 alelos (rara vez más), en el locus DPB1 apenas existen secuencias alelo-específicas. Cada SSO específico para estas secuencias reconoce, por tanto a una serie de alelos, existiendo un número muy escaso de ellos que sea específico de uno o dos alelos a lo sumo; además existen grupos de alelos reconocidos prácticamente por los mismos SSO. Por lo tanto, los patrones de reacción específicos de un buen número de alelos se hallan muy imbricados entre sí, lo que dificulta su identificación. Por esta razón, en un gran número de casos sólo ha sido posible identificar claramente uno de los alelos, quedando el otro dudoso entre varias posibilidades; sólo en tres casos ha sido posible la identificación de ambos alelos.

Por otra parte, los resultados obtenidos en algunos de los SSOs (por ejemplo, el DPB0901) han sido muy débiles, lo que no ha permitido discriminar nítidamente entre los positivos y los negativos; debido a ello los patrones de reacción para algunos alelos han podido quedar un tanto desdibujados, prestándose a confusión con otros alelos cuyos patrones de reacción sean muy similares y se diferencien precisamente en esos SSOs de reacción débil.

En otros casos el patrón de reacción es incompleto, de manera que el tipaje asignado puede considerarse tan sólo provisional. Debido a esta imbricación en las especificidades de los SSOs y a la dificultad de hallar patrones de reacción homogéneos, es muy complejo el estudio de éstos, así como de las posibles falsas reacciones que pudieran presentar las diferentes sondas, por lo que no pasamos a describir en detalle los diferentes casos, ni a explicar los patrones de reacción de los alelos.

De todas maneras ha sido posible descartar la presencia de una serie de alelos (DPB1\*0901, 1001, 1101, 1501, 1701, 1801, y 1901) dentro de nuestra serie de muestras, al no existir patrones de reacción específicos en ninguna de ellas; en muchos casos esto ha facilitado la asignación de otros alelos al simplificar el número de especificidades de cada SSO que teníamos que barajar en cada muestra. En cambio, es nutrida la presencia de patrones de reacción compatibles con ciertos alelos, tales como DPB1\*0401. En algún caso (nº 5), los patrones de reacción indican homozigocia para un alelo concreto.

Entre las parejas de hermanos incluidas dentro del estudio, no se han detectado diferencias en sus tipajes en ninguno de los loci, incluyendo DPB; esto indica ausencia de recombinación, entre este locus y el resto de los loci de clase II.

TABLA NO IV-1

## RESULTADOS DEL TIPAJE SEROLOGICO

Muestra	Locus DR	Locus DRw52/53	Locus DQ
1	1/7	-/53	1/-
2	1/7	-/53	1/-
3	3/w8	52/-	2/-
4	3/w8	52/-	2/-
5	3/-	52/-	2/-
6	No hay	serología	
7	3/w6	52/-	1/-
8	3/w6	52/-	1/-
9	w9/5	52/53	3/1
10	w6/5	52/-	1/-
11	No hay	serología	
12	2/4	-/53	1/3
13	5/w6	52/-	3/-
14	1/-	52/-	1/-
15	2/-	52/-	1/-
16	1/-	-/-	1/-
17	2/-	-/53	1/-
18	1/5	52/-	1/3
19	2/3	52/-	1/2
20	4/-	52/53	1/-
21	1/5	52/-	1/3
22	10/-	52/-	1/-
23	-/-	-/-	1/-
24	-/-	52/-	1/-
25	5/-	52/53	3/-
26	w10/-	-/-	-/-
27	-/-	52/-	1/-
28	-/-	52/-	-/-
29	No hay	serología	
30	w10/-	-/53	1/3
31	1/-	52/-	1/-
32	2/-	52/-	2/-
33	No hay	serología	
34	No hay	serología	
35	No hay	serología	
36	2/-	52/-	1/2
37	5/w6	52/-	1/3
38	3/-	52/-	2/3

T I P A J E G E N E R I C O D R B

TABLA NO IV-2

TIPAJE GENOMICO DRB GENERICO (SSPE)

ASO DRB1	M u e s t r a s										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1001	6	6	1	1	1	6	1	1	1	1	1
1003	1	1	4	4	4	1	8	6	2	6	6
1004	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1
1005	1	1	6	4	1	1	1	2	1	1	1
1006	4	4	2	2	2	2	2	2	1	1	2
1007	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2
1008	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6
1009	1	1	1	1	1	1	4	2	1	1	1
1010	1	1	1	1	4	6	1	6	1	1	4
1011	1	1	6	4	6	1	4	1	1	1	1
2801	4	4	1	1	1	4	1	2	1	1	2
2802	1	1	2	2	4	1	4	2	1	1	1
2803	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2804	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	4
2805	1	1	1	1	1	1	4	1	1	4	1
2810	4	6	1	1	1	1	1	1	1	4	1
3707	2	2	1	2	1	1	1	2	2	6	1
3708	4	4	1	1	2	6	2	2	1	1	6
3709	1	1	1	1	1	2	1	1	1	4	1
5703	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
7011	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8602	1	1	1	1	1	4	6	6	6	6	6
SSO-1	6	6	6	6	4	6	6	8	8	4	8
SSO-2	6	6	6	8	6	4	6	8	8	6	8

TABLA NO IV-2

## TIPAJE GENOMICO DRB GENÉRICO (SSPE) (Continuación)

ASO DRB1	Muestras											
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1001	1	1	6	1	6	1	9	1	1	6	2	
1003	1	4	4	4	4	1	4	4	4	4	2	
1004	8	1	2	4	1	8	1	2	8	1	1	
1005	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1006	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	
1007	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	8	
1008	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	
1009	1	1	1	4	1	1	1	6	2	2	2	
1010	1	2	6	6	2	6	1	4	2	4	8	
1011	1	6	2	2	2	4	1	4	1	1	2	
2801	1	1	4	1	4	1	1	2	1	1	2	
2802	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2803	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	
2804	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	
2805	1	1	1	1	6	1	4	1	1	4	1	
2810	6	1	1	1	1	1	4	1	4	4	1	
3707	4	1	1	2	1	1	4	1	4	6	2	
3708	8	2	1	1	1	1	6	2	1	2	1	
3709	1	2	1	8	1	1	4	1	1	4	1	
5703	1	6	1	1	4	1	1	6	1	2	1	
7011	2	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	
8602	1	1	1	2	1	4	6	6	6	6	6	
SS0-1	6	8	6	6	6	6	8	8	8	8	6	
SS0-2	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6	

TABLA N° IV-3

## TIPAJE GENOMICO DRB GENERICO (TMAC)

ASO DRB1	M u e s t r a s											
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1001	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1
1003	1	8	8	1	8	8	8	1	6	6	1	6
1004	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1
1005	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1006	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1007	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1008	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1
1009	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	4	1
1010	1	8	8	1	8	8	8	1	8	8	9	8
1011	1	8	8	1	1	8	2	1	8	8	1	1
2801	8	1	1	2	1	1	1	1	1	2	4	1
2802	1.	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1
2803	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2804	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1
2805	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
2810	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	1
3707	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	9
3708	1	1	2	8	1	1	1	1	1	1	1	1
3709	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5703	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1
7011	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1
8602	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	2
SS0-1	4	4	4	2	4	4	4	4	4	2	4	2

TABLA NO IV-3

## TIPAJE GENOMICO DRB GENERICO (TMAC) (continuación)

ASO DRB1	M u e s t r a s											
	35	36	37	38	a	b	c	d	e	f	g	h
1001	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1
1003	8	8	8	8	8	1	8	1	1	1	8	1
1004	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1005	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1
1006	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1007	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1008	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
1009	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	4	1
1010	1	1	6	4	2	4	1	1	1	1	8	1
1011	8	8	8	8	6	8	1	8	8	1	1	1
2801	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1
2802	2	2	1	2	2	4	1	4	1	1	1	1
2803	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1
2804	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2805	1	4	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8
2810	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3707	1	8	1	1	1	1	1	8	1	8	6	8
3708	8	1	1	2	2	1	8	1	1	1	8	1
3709	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5703	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	4	1
7011	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8602	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	4	4
SS0-1	2	4	2	4	4	4	1	4	4	4	4	4

Las letras corresponden a las siguientes líneas HTC

a: DHI  
 b: GEV  
 c: HMI

d: LAN  
 e: MT  
 f: P.EMB

g: WT/49  
 h: KY

TABLA IV-4

PATRON DE ASIGNACION A LOS DIFERENTES GRUPOS

Grupo	Patrón de reacción con oligonucleótidos
A DR1	DRB1001 2801
B DR2	DRB1009 2805 3707 3709 7011
C DR4	DRB1004
D Grupo asociado a DRw52	DRB1003 1005 1010 1011 2802 5703

TABLA N° IV-5

## TIPAJE GENERICO DEL LOCUS DRB:

ASIGNACION PROVISIONAL DE ALELOS SEROLOGICOS DR CON  
METODOLOGIA GENOMICA (SSPE)

Mues- tra	DR	DR	DRw52/53	Tip.g.esp. a realizar
1	1	/	7	-/53 A
2	1	/	7	-/53 A
3	3,11,13,14\$	/	12,8,14#	52b ó c D
4	3,11,13,14\$	/	12,8,14#	52b ó c D
5	3,11,13,14\$	/	3,11,13,14\$	52b ó c D
6	1	/	4	-/53 A,C
7	3,11,13,14\$	/	3,11,13,14\$	52a / 52b ó c D
8	3,11,13,14\$	/	3,11,13,14\$	52b ó c D
9	w9	/	w11	52? / 53 D
10	3,11,13,14\$	/	w11	52? D
11	2 (DRB5*0101)	/	3,11,13,14\$	52b ó c B
12	4	/	w9 ó 2?	53 C
13	w11	/	8,12,14#	52b ó c D
14	1	/	3,11,13,14\$	52a A
15	2 (DRB5*0101)	/	3,11,13,14\$	52a B,D
16	1	/	3,11,13,14\$	52b ó c A,D
17	2 (DRB5*0101)	/	4	53 B
18	1	/	w11	52b ó c A,D
19	2	/	3,11,13,14\$	52a B,D
(No DRB5*0101)				
20	4 ó w9?	/	3,11,13,14\$	52b ó c / 53 C,D
21	1	/	w11	52b ó c A,D
22	w10	/	3,8,11,12 13,14	52b ó c D

A: Grupo DR1

G.DRw52: Grupo DRw52

B: Grupo DR2

C: Grupo DR4

D: Grupo DRw52

#: Incluye exclusivamente el alelo DRB\*1404

\$: Incluye todos los alelos DRB\*14 excepto DRB\*1404

52a: DRB3\*0101

52b: DRB3\*0201 y 0202

52c: DRB3\*0301

Tip.g.esp.: Tipaje grupoespecifico

TABLA NO IV-6

## TIPAJE GENERICO DEL LOCUS DRB:

ASIGNACION PROVISIONAL DE ALELOS SEROLOGICOS DR CON  
METODOLOGIA GENOMICA (TMAC)

Mues- tra	DR	DR	DRw52/53	Tip.g.esp. a realizar
23	1	/ -		A
24	3,11,13,14\$	/ 3,11,13,14\$	52a / b ó c	D
25	w11	/ 3,11,13,14\$	52a / b ó c	D
26	4	/ w10	53	C
27	3,11,13,14\$	/ 3,11,13,14\$	52a	D
28	3,11,13,14\$	/ 3,11,13,14\$	52a / b ó c	D
29	3,11,13,14\$	/ 3,11,13,14\$	52a	D
30	4	/ w10	53	C
31	1	/ 3,11,13,14\$	52b ó c	A,D
32	2	/ 3,11,13,14\$	52b ó c	B,D
(No DRB5*0101)				
33	3,11,13,14\$	/ 3,11,13,14\$	52b ó c	D
34	4	/ 3,11,13,14\$	52b ó c / 53	C,D
35	4	/ 3,11,13,14\$	52b ó c / 53	C,D
36	2	/ 3,11,13,14\$	52b ó c	B,D
(No DRB5*0101)				
37	3,11,13,14\$	/ 3,11,13,14\$	52a / b ó c	D
38	3,11,13,14\$	/ 3,11,13,14\$	52b ó c	D
a	w11	/ -	52b ó c	D
b	3,11,13,14\$	/ -	52b ó c	D
c	7	/ -	53	-
d	1	/ 3,11,13,14\$	52b ó c	A,D
e	4	/ -	53	C
f	2(DRB5*0101)	/ 4	53	B,C
g	3,11,13,14\$	/ -	52b ó c	D
h	4	/ -	53	C

## Letras minúsculas - líneas HTC:

a: DHI	d: LAN
b: GEV	e: MT
c: HMI	f: P.EMB

g: WT/49

h: KY

## Letras mayúsculas - grupos DR:

A: Grupo DR1	G.DRw52: Grupo DRw52
B: Grupo DR2	52a: DRB3*0101
C: Grupo DR4	52b: DRB3*0201 y 0202
D: Grupo DRw52	52c: DRB3*0301

\$: No incluye el alelo DRB\*1404

Tip.g.esp.: Tipaje grupoespecífico

T I P A J E S G R U P O E S P E C I F I C O S

TABLA N° IV-7

TIPAJE GENOMICO DRB GRUPOESPECIFICO - GRUPO DR1

ASO DRB1	M	u	e	s	t	r	a	s	d
	1	2	14	16	18	21	23	31	
2801	2	4	2	6	6	4	4	4	4
3701	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5701	6	6	6	8	8	6	8	8	6
7001	4	4	4	6	6	4	1	6	6
7007	1	1	1	1	1	1	8	1	1
8601	4	4	4	6	8	4	8	1	6
8602	1	1	1	1	1	1	1	8	1

d: Línea HTC "LAN"

TABLA N° IV-8

TIPAJE GENOMICO DRB GRUPOESPECIFICO - GRUPO DR2

ASO DRB1	M	u	e	s	t	r	a	s	*	f
	15	17	19	32	36					
3702	4	6	4	6	2					6
5706	8	8	8	8	8					8
7002	1	1	1	8	1					1
7003	1	1	1	1	1					1
7011	8	8	8	1	8					8
8601	1	1	6	6	4					1
8603	4	4	1	1	1					4

f: Línea HTC "P.EMB"

\*: Se incluyó la muestra n° 12 pero no se obtuvo amplificado.

TABLA N° IV-9

## TIPAJE GENOMICO DRB GRUPOESPECIFICO - GRUPO DR4

ASO DRB1	M	u	e	s	t	r	a	s	*
	12	20	26	34	35	e	h		
3701	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3704	4	4	4	4	4	4	4	2	2
5701	8	8	8	8	8	8	8	8	8
5702	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7001	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7005	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7006	8	8	8	8	8	8	2	2	2
7007	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8601	1	1	1	8	1	1	6	6	6
8603	6	6	6	1	6				

e: Línea HTC "MT"

h: " " " KY"

\*: Se incluyó la muestra n° 30 pero no se obtuvo amplificado.

TABLA N° IV-10

TIPAJE GENOMICO DRB GRUPOESPECIFICO - GRUPO ASOCIADO A  
DRw52

ASO DRB1	M u e s t r a s											
	3	5	7	8	9	13	24	25	27	28	29	
2802	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2807	8	8	8	8	4	6	6	6	6	8	6	1
2809	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3703	6	8	6	6	1	1	1	1	1	4	1	1
3712	1	1	4	4	1	1	1	1	1	6	1	1
5701	8	8	8	8	2	2	8	2	8	1	1	1
5702	8	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1	1
5703	1	1	1	1	8	8	1	8	1	1	1	1
5704	1	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	1
5705	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
7001	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
7002	8	1	1	1	1	8	1	8	2	1	1	1
7003	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1
7004	8	8	8	8	1	1	1	1	2	1	1	1
7007	1	6	1	1	1	1	1	4	1	8	4	1
7008	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7009	1	1	8	8	1	1	1	8	8	1	1	1
7010	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1
8601	8	1	1	1	1	8	8	8	2	1	1	1
8602	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1
8603	6	8	8	8	8	1	6	8	6	8	8	8

TABLA N° IV-10

TIPAJE GENOMICO DRB    GRUPOESPECIFICO - GRUPO ASOCIADO A  
 DRw52 (continuación)

ASO DRB1	M u e s t r a s										
	31	32	33	34	35	36	37	38	b	c	g
2802	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2807	6	8	8	6	6	8	6	8	2	9	8
2809	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3703	8	8	1	8	1	8	6	8	1	8	8
3712	1	1	4	1	4	1	1	1	4	1	1
5701	8	8	1	8	1	8	6	8	1	8	8
5702	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5703	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5704	1	1	8	1	8	1	1	1	1	1	1
5705	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2
7001	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
7002	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7003	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	8
7004	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1
7007	8	1	1	8	1	1	8	8	1	1	1
7008	4	1	1	4	1	1	1	2	4	1	1
7009	1	1	8	1	8	1	1	8	8	1	1
7010	8	1	1	8	1	1	1	8	8	1	1
8601	8	1	1	8	1	1	1	2	2	1	1
8602	2	1	1	1	2	1	1	8	6	1	1
8603	1	8	8	1	1	8	8	1	8	8	8

TABLA N° IV-11

## ASIGNACION DEFINITIVA DE ALELOS GENOMICOS DR A LAS MUESTRAS, JUNTO A SU EQUIVALENCIA SEROLOGICA

Muestra	DRB	Equiv. serol.	DRB	Equiv. serol.
1	0101	DR1	/ 0701,0702	DR7
2	0101	DR1	/ 0701,0702	DR7
3	0301	DR3	/ 0801	DRw8
4 **	0301	DR3	/ 0801	DRw8
5	0301	DR3	/ 1301	DRw13
6	*	DR1	/ *	DR4
7	0301	DR3	/ 1401	DRw14
8	0301	DR3	/ 1401	DRw14
9	1101	DRw11	/ 09011,09012	DRw9
10	*	DRw11	/ *	g.DRw52
11	DRB5*0101	DR2	/ *	g.DRw52
12	0403,0404	DR4	/ *	DRw9
13	1104	DRw11	/ 0801	DRw8
14	0101	DR1	/ *	g.DRw52
15	1501	DRw15	/ *	g.DRw52
16	0101	DR1	/ *	g.DRw52
17	1501	DRw15	/ *	DR4
18	0101	DR1	/ *	DRw11
19	1502	DRw15	/ *	g.DRw52
20	0403,0404	DR4	/ *	g.DRw52
21	0101	DR1	/ *	DRw11
22	1001	DRw10	/ *	g.DRw52

\*: no realizado el tipaje grupoespecífico

\*\*: hermano HLA-ídntico por serología, y por tipaje genómico genérico del número 3  
no realizado expresamente el tipaje grupoespecífico

¥: Se realizó la amplificación (DR4) pero no apareció banda

TABLA N° IV-11

ASIGNACION DEFINITIVA DE ALELOS GENOMICOS DR A LAS  
MUESTRAS, JUNTO A SU EQUIVALENCIA SEROLOGICA  
(continuación)

Muestra	DRB	Equiv. serol.	DRB	Equiv. serol.
23	0103	DR1	/	-
24	1301	DRw13	/	1302
25	1104	DRw11	/	1303
26	0403, 0404	DR4	/	1001
27	1301	DRw13	/	-
28	0301	DR3	/	1401
29	1301	DRw13	/	-
30	*	DR4	/	1001
31	0102	DR1	/	1302
32	0301	DR3	/	1601
33	1401	DRw14	/	-
34	0407, 0408	DR4	/	1302
35	0403, 0404	DR4	/	1401
36	1502	DRw15	/	0301
37	1302	DRw13	/	1303
38	0301	DR3	/	1302
a	*	g.DRw52 (DRw11)	/	-
b	1401	DRw14	/	-
c	0701, 0702	DR7	/	-
d	0101	DR1	/	*
e	0404	DR4	/	-
f	1501	DRw15	/	*
g	0301	DR3	/	-
h	0404	DR4	/	-

\*: Se realizó la amplificación pero no apareció banda

#: no realizado el tipaje grupoespecífico

TABLA N° IV-12

## TIPAJE GENOMICO DEL LOCUS DQA

ASO DQA	M u e s t r a s										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2501	2	2	2	2	6	1	2	6	2	6	6
2502	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1
2503	1	1	1	1	1	6	1	1	4	1	1
3401	8	6	1	1	6	8	6	8	4	6	6
3402	1	1	4	4	8	1	4	6	2	2	1
3403	1	1	4	4	1	1	1	2	2	2	1
4102	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1
5501	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5502	4	4	1	1	1	4	1	1	6	1	1
5503	1	1	1	1	1	4	1	4	6	8	1
5504	1	1	6	4	4	1	4	6	1	1	6
6901	6	6	1	1	8	8	8	8	1	2	1
6902	4	4	1	1	1	4	2	2	6	6	2
6903	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1
6904	1	1	4	4	1	1	2	2	1	2	1
7502	2	2	1	2	2	1	2	6	6	6	4
LSO	6	6	4	4	4	4	6	6	6	6	6

ASO DQA	M u e s t r a s										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2501	1	4	6	4	6	2	6	4	4	4	6
2502	1	1	1	4	1	1	1	1	1	4	1
2503	4	1	1	1	1	4	1	8	1	1	8
3401	1	1	4	2	8	1	6	6	4	6	1
3402	1	6	8	4	4	4	1	1	1	1	1
3403	1	4	1	2	2	2	1	1	4	1	1
4102	1	1	1	4	1	1	4	4	4	6	8
5501	1	1	4	6	6	4	1	1	1	1	1
5502	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	1
5503	6	1	1	2	1	6	1	4	8	4	1
5504	1	6	2	1	1	1	2	8	8	6	8
6901	1	1	8	8	8	4	6	2	1	2	1
6902	6	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1
6903	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
6904	1	4	1	1	1	4	2	1	4	2	2
7502	1	2	2	4	4	1	4	4	4	6	6
LSO	6	4	4	6	6	6	4	4	4	6	6

TABLA N° IV-13

## TIPAJE GENOMICO DEL LOCUS DQB

ASO DQB	Muestras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2301	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
2302	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1
2601	6	6	1	1	1	6	8	6	1	1	1
2602	1	1	1	1	1	4	1	1	1	4	1
2603	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
2604	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
2606	2	1	1	2	1	1	1	4	4	1	1
3701	6	4	2	2	1	8	4	4	4	1	2
3702	1	2	1	1	1	6	4	4	4	1	1
4501	2	1	1	1	1	8	1	1	2	6	2
4901	6	6	1	1	1	6	1	1	1	1	4
5701	6	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5702	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1
5703	1	1	1	1	1	1	8	8	2	1	8
5704	2	2	1	1	6	2	6	8	8	2	8
5705	6	8	6	4	8	1	8	8	1	4	1
5706	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1
5707	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
5708	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
7002	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1
7003	2	2	1	1	4	1	1	8	6	1	6
7005	6	4	4	4	4	1	6	6	4	6	6
SS0-1	6	4	6	6	6	6	6	6	4	6	6

TABLA N° IV-13

## TIPIAJE GENOMICO DEL LOCUS DQB (continuación)

ASO DQB	Muestras											
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
2301	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2302	6	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
2601	1	1	1	1	8	1	6	1	1	2	2	1
2602	1	4	4	1	1	1	4	4	1	2	2	1
2603	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1
2604	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
2606	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	1
3701	1	2	6	1	6	1	8	1	1	4	4	1
3702	1	2	2	1	2	1	8	1	1	6	6	1
4501	1	8	8	2	2	1	6	1	1	6	6	1
4901	1	1	1	1	6	1	6	1	1	4	4	1
5701	1	1	1	1	6	1	6	1	1	1	1	1
5702	1	1	2	1	1	1	1	1	4	1	1	1
5703	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1
5704	1	1	1	8	4	1	1	1	6	1	2	1
5705	2	1	8	1	1	1	8	1	1	4	4	1
5706	4	8	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5707	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5708	1	1	2	1	1	1	1	1	4	1	2	1
7002	2	1	1	4	2	1	1	1	1	1	1	1
7003	1	1	1	4	1	1	1	1	4	1	1	1
7005	1	1	4	1	1	6	8	6	6	4	6	
SS0-1	6	6	6	6	4	6	8	6	6			

TABLA NO IV-14

## ASIGNACION DE ALELOS EN LOS LOCUS DQA Y DQB

Muestras	DQA	DQB	Equiv. serol. DQw *
1	0101 / 0201?	0201 / 0501	2 / 5
2	0101 / 0201?	0201 / 0501	2 / 5
3	0401 y/o 0601	0201 / -	2 / -
4	0401 y/o 0601	0201 / -	2 / -
5	0101 / 0103 0501?	0201 / 0602? 0603?	2 / 6
6	0101 / 03011 ó 0302	0301 / 0501	3 / 5
7	0101 / 0102	0201 / 05031? 05032?	2 / 5
8	0101 / 0501	0201 / 05031? 05032?	2 / 5
9	03012 / 03011 ó 0302	? / ?	-
10	0501 / -	0301 / -	3 / -
11	0101 / 0102	0201 / 0602?	2 / 6
12	03011 y/o 0302	0302 / 03031	3 / 3
13	0401 / 0501?	0301 / -	3 / -
14	0101 / 0102	0201 / 0301	2 / 3
15	0103 / 0102?	0602 / -	6 / -
16	0101 / 0102?	0501 / 05032?	5 / 5
17	0102 / 03011 ó 0302	? / ?	-
18	0101 / 0102	0301 / 0501	3 / 5
19	0103 / 0102? 0501?	0201 / 0601	2 / 6
20	0102 / 03011 ó 0302	? / ?	-
21	0101 / 0102	0501 / 0301?	5 / 3
22	0101 / -	? / ?	-

\* La equivalencia serológica con DQw se establece exclusivamente con los alelos DQB.

TABLA N° IV-15

TIPAJE GENOMICO DEL LOCUS DPA

ASO DPA	M u e s t r a s										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3101	6	8	6	6	6	6	8	4	6	4	6
3102	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5001	6	6	6	6	8	6	6	4	4	6	6
5002	1	1	1	2	1	2	6	1	1	1	1

ASO DPA	M u e s t r a s										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
3101	4	6	6	6	4	6	2	6	6	6	6
3102	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1
5001	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	8
5002	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1

TABLA N° IV-16

## TIPAJE GENOMICO DEL LOCUS DPB

ASO DPB	Muestras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0901	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
0902	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0903	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1
0904	2	2	2	2	1	1	1	1	1	6	8
3501	1	1	2	2	1	4	4	4	1	6	6
3502	6	6	8	6	2	2	6	6	6	1	1
3503	1	1	6	4	8	6	1	1	1	1	1
3504	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
3505	1	1	1	1	1	1	6	6	1	6	8
5501	1	1	6	6	1	6	8	8	8	1	2
5502	8	8	4	4	1	1	1	1	1	1	1
5503	1	1	6	4	8	6	1	1	8	1	1
5504	8	8	2	2	1	1	1	1	6	1	1
6502	6	6	1	2	1	2	4	1	1	4	8
6901	1	1	6	4	2	4	8	8	8	1	2
6902	8	8	6	4	8	6	1	1	4	1	1
6903	4	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1
6905	1	1	1	1	1	1	4	4	4	6	8
6906	6	6	4	4	2	4	6	8	8	8	8
7601	8	8	6	6	8	6	1	1	8	1	1
7602	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1
7603	1	1	1	1	1	1	6	4	1	4	6
8501	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2
8502	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	1
8503	6	6	6	6	6	8	6	8	8	8	8
SS0-1	8	8	8	8	6	8	6	8	8	8	8
SS0-2	8	8	8	8	6	8	6	8	8	8	8

TABLA NO IV-16

## TIPAJE GENOMICO DEL LOCUS DPB (continuación)

ASO DPB	M u e s t r a s											
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
0901	2	1	2	2	1	1	1	1	6	1	2	
0902	8	8	1	1	8	8	6	4	1	1	1	
0903	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0904	2	4	1	1	2	2	2	8	1	1	1	
3501	8	4	8	8	4	4	6	4	8	4	6	
3502	6	6	8	4	6	6	2	4	6	6	6	
3503	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
3504	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	
3505	2	8	2	4	1	1	6	1	1	1	1	
5501	8	8	8	8	6	6	8	6	6	4	8	
5502	4	4	1	1	2	2	2	4	3	6	1	
5503	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	
5504	8	8	1	1	8	6	1	6	1	1	1	
6502	6	6	1	1	6	6	4	6	4	2	4	
6901	6	4	8	6	4	4	6	6	8	8	8	
6902	4	8	2	2	1	1	8	8	8	1	1	
6903	1	6	1	1	4	4	1	1	1	1	1	
6905	1	1	1	1	1	1	6	6	4	4	4	
6906	6	6	8	8	6	8	6	8	8	8	8	
7601	8	2	8	8	6	8	6	8	1	1	1	
7602	1	8	1	1	8	2	2	8	1	1	4	
7603	4	8	1	2	2	2	2	1	1	1	1	
8501	6	1	6	4	2	2	1	1	1	2	1	
8502	2	1	2	2	1	6	6	8	8	1	1	
8503	8	8	1	1	8	8	8	8	8	8	8	
SS0-1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
SS0-2	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	

TABLA NO IV-17

## ASIGNACION DE ALELOS EN LOS LOCUS DPA Y DPB

Muestras	DPA	DPB
1	*** 01 / -	0601 / 1601?
2	01 / -	0601 / 1601?
3	01 / -	0501 / ?
4	01 / -	0501 / ?
5	01 / -	0202 / -
6	01 / -	0501 / 0401?
		1301?
7	01 / -	0201 / 0401
8	01 / -	0201 / 0401
9	01 / -	0301 / 0402?
10	01 / -	0401 / ?
11	01 / -	0401 / 0601?
12	01 / -	0301 / 1301
13	01 / -	0401 / ?
14	01 / -	0401 / 1301?
15	01 / -	0301 / 0401?
16	01 / -	0301 / 0401?
17	01 / -	1301 / 0401?
18	0201 / -	0601 / 1301?
19	01 / 0201	0201 / 0401
20	01 / -	0201? / 0401?
21	01 / -	0401? / 0202?
22	01 / -	0801? 1601?

\*\*\* : No se puede distinguir entre los tres alelos pertenecientes al grupo DPA\*01 con el panel de SSOs disponible.

V I . - D I S C U S I O N

---

Desde la descripción inicial de los factores de histocompatibilidad, y el descubrimiento de sus aplicaciones clínicas, se ha intentado caracterizar estas moléculas y genes de la manera más precisa posible. A lo largo del tiempo se han utilizado una serie de técnicas, cuya sensibilidad ha ido en aumento, lo que ha redundado en un mayor conocimiento de las variantes alélicas de tales factores en una población.

La técnica serológica clásica también ha ido perfeccionándose, incorporando algunas novedades metodológicas. De esta manera, nosotros hemos empleado en nuestro trabajo dos variantes de la misma técnica, usando en la primera la clásica fibra de nylon en la separación celular y lectura mediante luz visible, y en la segunda, la reciente introducción de esferas inmunomagnéticas y visualización por luz ultravioleta; y hemos comparado su eficacia.

Ninguna de ellas ha demostrado ser superior a la alternativa en cuanto a sensibilidad o capacidad de discriminación entre patrones de reacción, pero la segunda posee algunas ventajas sustanciales sobre la anterior: el rendimiento en cuanto a la cantidad de células obtenidas es mucho mayor, lo que permite disminuir ostensiblemente la cantidad de sangre necesaria de cada individuo. Por

otra parte, los tiempos de incubación son menores que en la técnica de fibra de nylon, recortando de esta manera la duración de cada tipaje.

Además la viabilidad celular es mayor, pues las células se ven sometidas a manipulaciones mucho menos cruentas; este hecho es importante para reducir la mortalidad celular, la cual enmascararía las reacciones con los sueros, pues éstas van a ser valoradas precisamente en función del porcentaje de mortalidad celular.

En muchos individuos de nuestro estudio aparece serológicamente un alelo "blanco" (es decir, no caracterizable con el panel de sueros disponible), junto a reacciones con las especificidades supertípicas DRw52 o DRw53, sin concordancia con el alelo ya detectado. Estos individuos, por tanto, no son homozigotos reales, sino que poseen dos alelos diferentes, uno de los cuales sólo está desvelado por su asociación a dicha especificidad supertípica; esto hace pensar que el grado de homozigocia real en la población, en el locus DR, es menor del que se deduce del tipaje serológico de la serie DR1-DRw18. Al emplear la metodología genómica, prácticamente en todos ellos se ha conseguido tipar un segundo alelo, consistente con la especificidad supertípica detectada, lo que confirma el reducido número de homozigotos reales que existen en la población; tenemos en nuestra serie casos en

los que se ha identificado genómicamente un segundo alelo aun cuando no era siquiera intuida serológicamente; la mayoría de los blancos en el panel de muestras estudiado se asocian a DRw52; dado el bajo número de sueros anti-DRw6 incluidos en el panel utilizado se pensó que tales blancos corresponden en realidad DRw6; esto se confirmó más tarde con el tipaje genómico.

En algún que otro caso, existe discrepancia entre la asignación de alelos por métodos genómico y serológico. El tipaje genómico por lo general ha mostrado en estos casos un patrón consistente de reacción, que puede ser más concluyente que los resultados serológicos, cuando son débiles o incompletos.

Todas estas deficiencias en el tipaje serológico pueden ser debidas a un complemento débil o sueros antiguos o débiles que proporcionan reacciones de baja intensidad las cuales dan lugar a patrones de reacción equívocos, y lleven a asignar alelos erróneos; o bien podrían ser variantes polimórficas, encuadradas dentro de un tipo serológico, que reaccionan débilmente con los sueros específicos de dicho tipo (por ejemplo, en el caso nº 23, en el que no se conseguía caracterizar ninguno de los dos alelos DR serológicamente, conseguimos identificar genómicamente una variante rara de DR1). Los métodos de biología molecular podrían, por tanto, de acuerdo con nuestros resultados, ser útiles en el laboratorio

asistencial de histocompatibilidad, para completar los tipajes en los que la serología es incapaz de identificar ciertos alelos, o dicha detección no es concluyente, y confirmar aquéllos en los que los alelos no estén satisfactoriamente definidos; también podría emplearse sin serología, como método de tipaje autónomo, como nos lo sugieren las muestras incluidas en nuestro estudio para las que no existen datos serológicos, y en las cuales aparecen patrones de reacción con los SSO claramente consistentes con ciertos alelos, que permitían ser asignados a dichas muestras.

El interés prestado a la caracterización exhaustiva de los alelos DR en los enfermos en lista de espera para un trasplante renal (de la cual hemos seleccionado un buen número de muestras para nuestro trabajo) deriva del hecho de que el locus DR es el elemento primordial que dicta la compatibilidad entre el donante y el receptor: el conocimiento de ambos alelos DR en un receptor facilita el poder conseguir un riñón adecuado rápidamente, ya que tiene dos posibilidades de compatibilidad, mientras que aquel receptor con uno o los dos alelos DR desconocidos tendrá menos oportunidades para encontrar un donante. Lógicamente, los homozigotos tienen menos probabilidades al respecto, por lo que es interesante, en lo posible, destapar los posibles alelos "ocultos" en los homozigotos.

Existen una serie de ventajas sobrañadidas, puestas de manifiesto en nuestro caso, al usar rutinariamente el tipaje genómico. Una de ellas es el procedimiento de obtención de reactivos: mientras los SSO se obtienen sintéticamente, por lo que no hay problemas de abastecimiento, los sueros se obtienen de individuos, cuya disponibilidad es menos segura, sobre todo de los que reconocen alelos más raros (Dfw6, DRw8, DRw9, por ejemplo), que son también los más difíciles de encontrar y caracterizar.

Por otra parte, si no ser requisito indispensable la obtención de células frescas, se pueden realizar tipajes sobre muestras biológicas que se hayan mantenido varios días sin haber sido sometidas a ningún procedimiento de conservación. De hecho, en nuestro trabajo, se ha logrado extraer una buena cantidad de DNA a partir de muestras celulares que han estado hasta 4 días en frigorífico, tiempo en el que un gran porcentaje de las células han perdido viabilidad. Gracias a ello, se pueden efectuar tipajes de muestras procedentes de áreas geográficas de difícil acceso, o cuando el método de recogida de la muestra hace improbable la viabilidad de las células; en estas condiciones resulta prácticamente imposible realizar el método serológico que requiere células viables para su ejecución.

Sin embargo, presenta algunos inconvenientes, como

es el uso de productos radioactivos, lo que no está al alcance de muchos laboratorios. Esto se puede obviar empleando métodos no radioactivos para el marcaje de las sondas, mediante digoxigenina-dUTP.

En nuestro trabajo hemos estudiado el polimorfismo de todos los locus de HLA clase II con producto conocido (DRB1, DQA1, DQB1, DPA1 Y DPB1). Hemos profundizado más en el locus DRB1 (que codifica los antígenos de la serie DR) por ser el más informativo en los programas de trasplante, y poder contar con el tipaje serológico como referencia asequible para valorar los resultados obtenidos mediante la hibridación de ácidos nucleicos. Para ello, el procedimiento del tipaje genómico ha sido programado en dos fases: a) una primera, genérica, en la que se intenta detectar el polimorfismo a un nivel similar al serológico (DR1 a DRw14, incluyendo DRw52 y DRw53, y, parcialmente, el locus DRB5), y b) una segunda o grupoespecífica, en la que se busca caracterizar a un segundo nivel (que podríamos denominar nivel "genómico") el polimorfismo en determinados grupos DR, hasta llegar incluso a detectar la mínima diferencia posible entre dos alelos: un único nucleótido; esta programación del trabajo obedece al gran número de variantes polimórficas detectadas hasta la fecha en el locus DR, haciéndose de esta forma muy engoroso intentar tipar todas ellas de una sola vez. En cada una

de las dos fases del tipaje se ha valorado la eficacia de los SSO empleados para seleccionar de entre ellos un panel básico suficientemente sensible, específico y amplio de SSO para intentar cubrir todas o la mayor parte de especificidades conocidas con un mínimo de sondas SSO, con vistas a una eventual utilización rutinaria en el laboratorio asistencial de histocompatibilidad (véase más adelante).

En la primera fase, y con el panel de SSO disponible en este trabajo, son, teóricamente, susceptibles de ser tipados todos los alelos caracterizados serológicamente, excepto los asociados al grupo DRw52 (DR3, DRw11, DRw12, DRw13, DRw14 y DRw8) en los que, debido a poseer grandes semejanzas en su secuencia de nucleótidos, los SSO que sirven para detectarlos son comunes a varios de ellos, y se requiere necesariamente el tipaje grupospecífico para distinguirlos (sobre todo los alelos genómicos que constituyen los tipos serológicos DR3, DRw13, DRw14 y DRw8, los cuales sólo pueden ser identificados mediante patrones de reacción con ciertos SSO cuyas especificidades están muy imbricadas entre sí; en cambio, los alelos pertenecientes a los tipos DRw11 y DRw12 sí lo tienen). El SSO específico para los alelos DRw12 (DRB2802) presenta falsos positivos (en relación a otros SSO que también detectan dicho grupo de alelos) y un elevado background, teniendo en cuenta que DRw12 se presenta con baja

frecuencia en nuestra población. Esto aconseja realizar el tipaje grupo-específico para caracterizar dicho grupo de alelos y no incluir tal SSO dentro del panel asistencial para tipaje genérico de DR. En cambio el resto de SSO que reconoce este grupo ofrece patrones consistentes de reacción.

En esta fase, hemos tenido en cuenta para la valoración de los patrones de reacción los resultados obtenidos con los SSO específicos para los genes que codifican DRw52 y DRw53 (es decir los locus DRB3 y DRB4) incluidos en el panel de tipaje genérico, ya que en algunas ocasiones nos han permitido asignar alelos a ciertas muestras, basándose en el fenómeno del desequilibrio de unión (algo similar a lo que se hace normalmente en serología).

Por otra parte, las dificultades experimentadas en la definición de ciertos alelos, como es el caso de DRw9, a pesar de contar con varios SSO específicos, debido a la baja intensidad de la señal autoradiográfica, podrían ser achacadas a hibridaciones entre zonas de la misma secuencia del SSO cuando se les somete a la temperatura de hibridación. Esto se produce cuando existen regiones complementarias entre sí en la secuencia del SSO, conformándose de esta manera una estructura tridimensional; de esta manera el SSO dejaría de ser lineal, condición indispensable para la hibridación con el

DNA problema. Si estas hibridaciones anómalas en el seno del SSO se originan a nivel del extremo 5', se vería entorpecida la incorporación del grupo fosfato radioactivo; por ello, debido a la reducida actividad radioactiva unida a la sonda, la señal impresionada sería débil, aun cuando la reacción de hibridación fuera adecuada. También podrían ser atribuidas a problemas de ajuste en la temperatura de los lavados, de lo cual hablaremos más abajo. Todo esto podría explicar la diferencia de intensidad en las señales proporcionadas entre unas sondas y otras.

Los patrones de reacción con los SSO en cada uno de los demás alelos (DR1, DR2, DR4, DR7 y DRw10) están claramente definidos, y permiten el tipaje de todos ellos, con falsos positivos excepcionales, y algunos falsos negativos que no enmascara el patrón básico de reacción en cada uno de los alelos. Si hemos detectado, en cambio, diferencias entre los SSO en cuanto a intensidad de señal obtenida; para la selección de un panel básico de SSO se descartarían aquellos que proporcionen señales de menor intensidad.

Las reacciones de amplificación para la segunda fase del tipaje (grupo-específico) han servido como controles de los resultados obtenidos en la primera fase, pues las reacciones se obtienen exclusivamente cuando el alelo a identificar se encuadra dentro de alguno de los

grupos, de acuerdo con resultados obtenidos en el tipaje genérico, y se le somete a las condiciones específicas de amplificación de ese grupo concreto. Por el contrario, las muestras que posean alelos en DR no pertenecientes a dicho grupo no deben de amplificarse en las tales condiciones. En caso contrario es recomendable volver a estudiar el tipaje inferido en la fase genérica por si es conveniente modificarlo: en nuestro estudio tuvimos un caso especial al que se le asignó un grupo de tipaje de acuerdo con los resultados de la fase genérica, pero no se obtuvo amplificación en el grupo específico correspondiente; sin embargo, hubo que conservar el alelo inicialmente atribuido ante la claridad del patrón de reacción obtenido en el tipaje genérico. Constituiría de alguna manera, una técnica para el tipaje del locus DRB1 complementaria a la hibridación de ácidos nucleicos.

Con el tipaje grupospecífico nos aproximamos al máximo nivel de precisión en la caracterización de alelos. Con el panel de SSOs empleado, el grupo de alelos asociado a DRw52 es caracterizado de manera muy precisa. Sin embargo, debido a la gran cantidad de variantes polimórficas descritas en este grupo (y cuyo número sigue incrementándose aún) cuyos patrones de reacción se solapan entre sí, existen individuos heterozigotos en los que ambos alelos se encuadran en este grupo y no es posible caracterizarlos con plena definición debido a la similitud

de sus patrones específicos respectivos. No obstante, aun en la mayor parte de estos casos, podemos realizar un tipaje a un nivel similar al conseguido por el método serológico, incluyendo los splits de DR5 y DRw6.

Ocurre lo mismo en el grupo DR4, donde no hay SSOs suficientes para discriminar todas las variantes. Sería necesario incluir nuevos SSOs para que cada alelo genómico tuviera su patrón de reacción específico.

No existe este problema en los demás grupos específicos de tipaje, pues cada uno de ellos están constituidos por un único alelo serológico y un reducido número de alelos genómicos. Los respectivos paneles de SSO para estos grupos son suficientes para cubrir la gama de variantes polimórficas encuadradas en ellos.

La programación del tipaje genómico en dos fases permite dos niveles de sensibilidad: se puede emplear el primero de forma aislada para comprobar identidades a nivel de locus DR entre individuos, cuando no sea necesario caracterizar a fondo los alelos en DR (por ejemplo, entre hermanos pertenecientes a familias incluidas en programas de trasplante de médula ósea, en los que la identidad en DR es requisito previo a la realización del cultivo mixto linfocitario, el cual determinará la idoneidad del eventual donante); hemos incluido tres parejas de hermanos en el estudio, serológicamente iguales para DR cuyos patrones de reacción

en la fase genérica del tipaje genómico son idénticos entre sí.

El segundo nivel podría ser aplicado en los casos en que se requiera conocer en detalle su locus DRB1, como por ejemplo, en asociaciones HLA-enfermedad, e incluso en trasplante renal completando los datos serológicos.

Los falsos positivos o negativos que aparecen en ciertas muestras pueden ser debidas a reacciones cruzadas entre distintos SSO, o bien, excepcionalmente, a la presencia de un nuevo alelo, no descrito con anterioridad, que presente un patrón de reacción característico, pero aún sin estudiar. Estas reacciones anómalas pueden ser identificadas a través de modificaciones en los patrones de reacción teóricos, característicos de cada alelo reconocido.

La intensidad de la señal obtenida con los mismos SSOs entre ambos métodos de hibridación (TMAC y SSE) ha sido diferente. Esto puede deberse a que en el segundo método es necesario ajustarse estrictamente a la temperatura de lavado, distinta y específica para cada oligonucleótido, de acuerdo con su secuencia; pequeños cambios en esta temperatura altera sensiblemente la cantidad de sonda que queda hibridando, y por ende, la señal obtenida: el SSO deshibridará total o parcialmente de los amplificados presentes en el filtro si la

temperatura de lavado es superior a la suya específica, y la señal será muy débil o incluso nula -falsos negativo-; por el contrario, cuando la temperatura es inferior a la específica, el SSO se mantendrá hibridando incluso con alelos no incluidos entre las especificidades que reconoce -falsos positivos-. Esto se ha intentado evitar controlando exhaustivamente la temperatura de los baños mediante termómetros manuales, pero es de suponer que en algunas sondas la temperatura con la que se ha lavado no se ha ajustado a la específica de cada SSO, y de ahí la baja intensidad de las impresiones autoradiográficas obtenidas en unos casos, y el background presente en otros.

En cambio, en el segundo método, el cloruro de tetrametilamonio facilita la hibridación y lavado a la misma temperatura para todos los SSOs independientemente del contenido de Guanina-Citosina de la sonda (Wood y cols., 1985), aunque si varía según la longitud del SSO en nuestro trabajo no necesitamos tener en cuenta esto último, ya que prácticamente todas las sondas son de 18mer (18 oligonucleótidos de longitud); esto, obviamente, dará lugar a unos resultados mucho más homogéneos que con el primer método, y sin necesidad de alcanzar una elevada precisión en la temperatura de lavado, con los riesgos que eso lleva consigo para obtener una hibridación específica y con un nivel de señal adecuado, como ya expusimos

anteriormente.

Por otra parte, la homogeneización de las temperaturas de lavado para todas las sondas, proporcionada por el cloruro de tetrametilamonio, facilita el manejo simultáneo de un gran número de SSOs (si todos tienen la misma longitud, como es nuestro caso) pues las mismas condiciones son aplicables a todos ellos, mientras con el SSPE, cada oligonucleótido tiene unas condiciones propias y precisa ser manejado por separado, lo que lo hace muy engorroso.

Otra ventaja sustancial observada con el procedimiento TMAC es la menor duración del proceso de hibridación, lo que redundó en una mayor rapidez de obtención de resultados; esto es interesante a la hora de poner esta técnica en marcha con objetivos asistenciales, en los que es crucial realizar el máximo de tipajes en el mínimo de tiempo.

Nuestros resultados nos sugieren que el tipaje genómico empleando PCR e hibridación con SSO caracteriza eficazmente el polimorfismo en el locus DR, alcanzando una precisión mucho mayor que la conseguida por la serología, y con una sensibilidad razonable; podemos protocolizar las condiciones técnicas y elaborar un panel provisional de SSOs idóneos para poder llevar las técnicas de tipaje genómico a un laboratorio asistencial de histocompatibilidad, y de esta forma conseguir el máximo

2detalle en la caracterización alélica de HLA (en la Tabla V-1 hemos formulado algunas recomendaciones a tal fin).

El panel de SSOs ha sido seleccionado a partir del conjunto de SSOs empleados en este trabajo; se han escogido de entre los SSOs que tienen la misma especificidad, los que muestran un menor número de reacciones cruzadas y falsos positivos (elevado nivel de especificidad), y simultáneamente, ofrecen una señal nítida en la autorradiografía (elevada sensibilidad). Los demás se han eliminado para evitar redundancias.

De todas maneras, este panel es teórico, formulado a nivel experimental y estaría siempre sujeto a modificaciones, ante la posible aparición de nuevos alelos, que obliguen a cambiar algún SSO o introducir otros nuevos, e incluso recuperar algunos de los que se han descartado en este trabajo, para obtener un patrón teórico determinado; además cada laboratorio, según su experiencia propia, podría cambiar algún SSO concreto por otro que tenga la misma especificidad. Por otra parte, el uso de SSOs adicionales con especificidades redundantes pueden ayudar a establecer patrones de reacción en casos dudosos en los que este panel pueda ser demasiado ajustado en cuanto a número de elementos, y no proporcione una información suficiente.

La segunda fase (grupoespecífica) podría ser empleada directamente, sin pasar por la fase genérica, en

**TABLA V-1**  
**RECOMENDACIONES PARA UN PROTOCOLO PROVISIONAL DE TIPAJE**  
**ASISTENCIAL DEL LOCUS DRB DE HLA**

**1.- Tipaje serológico**

Técnica de concentración inmunomagnética (ver capítulo "Material y Métodos").

**2.- Tipaje genómico: 2 fases:**

a) Tipaje genérico

- Amplificación genérica

- Hibridación con los siguientes SSOs

DRB1001	DRB1008	DRB3708
DRB1003	DRB1009	DRB3709
DRB1004	DRB1010	DRB5703
DRB1005	DRB1011	DRB7011
DRB1006	DRB2804	CTRL-1
DRB1007	DRB2810	

b) Tipaje específico

- Amplificación específica para cada grupo

- Hibridación con los siguientes SSOs

<u>DR1:</u>	DRB5701	DRB7007	DRB8602
	DRB7001	DRB8601	
<u>DR2:</u>	DRB5706	DRB7003	DRB8603
	DRB7002	DRB7611	
<u>DR4:</u>	DRB3701	DRB7001	DRB7007
	DRB3704	DRB7005	DRB8601
	DRB5701	DRB7006	DRB8603
	DRB5702		
<u>DRw52:</u>	DRB2809	DRB5705	DRB7007
<u>asoc.</u>	DRB3703	DRB7001	DRB7009
	DRB5701	DRB7002	DRB8601
	DRB5702	DRB7003	DRB8603
	DRB5704	DRB7004	

**\*\*\* Condiciones técnicas**

- Extracción del DNA y Amplificación: véase capítulo

"Material y Métodos".

- Hibridación (Ver "Material y Métodos")

- Método TMAC

- Prehibridación 30 minutos 54°C

- Hibridación 3 horas 54°C

- 5 lavados: 2 en solución 1 a T<sub>e</sub> ambiente

1 en solución TMAC a T<sub>0</sub> ambiente

2 en solución TMAC a 56°C.

- Autorradiografía. exposición 2 horas.

caso de que por método serológico obtengamos concluyentemente ambos alelos DR.

El resto de los locus ha sido estudiado exclusivamente con la técnica SSPE. Por lo general los patrones de reacción para muchos alelos son adecuados, y en los locus DQA y DQB hemos podido caracterizar con gran margen de seguridad casi todas las muestras, dentro de las posibilidades del panel de SSOs con el que contábamos. Sin embargo en un importante número de muestras se han obtenido reacciones débiles con algunos SSO, que no se pueden descartar (pues no se puede asegurar que la baja intensidad se deba a background o indique realmente una señal positiva pero débil) a la hora de configurar patrones de reacción junto con las reacciones obtenidas con el resto de SSO. Esto ha propiciado que en algunas muestras se obtengan hasta tres patrones (es decir, se les asignarian tres alelos, cosa imposible al contar únicamente con dos copias de cada gen), o bien en otras muestras, los patrones de reacción son incompletos o desdibujados, lo que lleva a confusión entre alelos que tienen patrones muy similares o incluso idénticos entre sí; en estos casos se ha asignado el alelo correspondiente al patrón de reacción más completo o más intenso. Todos ellos han sido consignados como dudosos en las tablas de tipajes provisionales (véase en el capítulo "Resultados").

La falta de puntos de referencia, como ha sido la serología para DRB1, ha impedido una asignación más precisa de alelos en estos loci, pues no hay otro medio de confirmar los patrones de reacción; sólo nos limitamos a decidir qué alelo es el más probable, entre todos los posibles que barajamos, de acuerdo con las reacciones obtenidas. En la gran mayoría de los casos en DPB, y en algunas muestras, también en L y DQB, aparecía un patrón de reacción que correspondía claramente a un alelo, pero para el segundo era más difícil la asignación, debido a la debilidad de las reacciones, y a la complejidad de los patrones de reacción, al tener cada SSO una gran cantidad de especificidades, de manera que no era posible en algunas reacciones decidir si se debían a background o realmente se tenían que tomar en cuenta. Dado el escaso polimorfismo presentado por el locus DPA, no ha existido ningún problema en identificar aquí los alelos.

Por todo esto, aunque es bastante probable que la asignación de alelos efectuada sea la correcta, estos resultados deben considerarse provisionales, como una primera aproximación experimental al tipaje de estos loci que hace vislumbrar su potencial como técnica de tipaje fino en locus HLA que hasta ahora habían sido muy parcialmente caracterizados. La aplicación a un laboratorio asistencial de manera similar a la que hemos formulado en este trabajo para DRB1 de una forma teórica

quedaría a la espera de la puesta a punto de una técnica alternativa (como es el uso del TMAU en la hibridación), que eventualmente confirme los resultados obtenidos, aclare los dudosos, arroje algún resultado en aquellas muestras en las que no hemos obtenido ninguno (por ejemplo, no hubo reacción con ningún SSO en tres muestras del locus DQB) y estandarice definitivamente las condiciones; ya hemos visto como este método mejora los resultados en DRB1.

La selección de sondas en estos tres loci, para establecer un panel básico, tal y como lo hemos hecho para DRB1, es más difícil, teniendo en cuenta lo explicado en los párrafos anteriores. Por otra parte, al no contar con la segunda fase como es el caso de DRB1, no necesitamos de más información para poder obtener patrones de reacción con un número suficiente de SSO, por lo que en estos loci se permitiría cierta redundancia. Excepcionalmente, aquellos grupos de SSO que tengan las mismas especificidades son susceptibles de ser simplificados, dejando solamente el que mejores patrones de reacción haya mostrado (por ejemplo, entre los SSOs DQB2601 y DQB3701, ambos específicos para los alelos DQB1\*05, se podría eliminar el primero, ya que las señales obtenidas al hibridar con él son más heterogéneas que con el segundo). Además, cada oligonucleótido presenta diferentes especificidades, haciendo que los patrones de reacción de

ciertos alelos estén muy imbricados entre sí (sobre todo en DPB ya que en este locus apenas hay SSOs alelo-específicos, mientras que en DRB1, por ejemplo, hay bastantes; también se hace difícil tipar, por ejemplo, DQA1\*0401, 0501, y 0601, junto con algunos del grupo DQA1\*03); esto hace que prácticamente ningún SSO sea prescindible en el panel de tipaje para estos loci.

El estudio de todos estos loci, conjuntamente con el ya realizado sobre DRB1 puede ser interesante en los estudios de asociación HLA-enfermedad, e incluso para su incorporación en los programas de trasplante, pues se ha observado que existen rechazos de injerto contra huésped en ciertos casos en los que hay compatibilidad en DR e incompatibilidad en DP (Odum y cols., 1987). Con la incorporación de estas técnicas se facilitará la detección de estas incompatibilidades, que hasta ahora eran muy difíciles de caracterizar.

Se está poniendo en marcha en nuestro laboratorio una técnica similar a la descrita en este trabajo pero empleando productos no radioactivos para el revelado. Esto representa una ventaja sustancial a la hora de su aplicación en la clínica, ya que el uso de productos radioactivos es un obstáculo para la implantación de técnicas genómicas en muchos laboratorios. El empleo del Southern blotting quedaría relegado a fines experimentales y a búsqueda de identidades en los antígenos de HLA clase

II entre individuos, ya que es una técnica más engorrosa que la amplificación génica y tipaje por oligonucleótidos, y no es tan informativa a la hora de asignar alelos. Existen otra serie de técnicas que a nivel experimental se están utilizando en el tipaje genómico, como por ejemplo, la AFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción sobre productos de amplificación génica).

La mejora de las técnicas de tipaje genómico permitirá realizar los tipajes en tiempos más cortos, ya que con la tecnología actual es necesario realizar dos tandas de hibridación, genérica y grupoespecífica, con un gran número de SSO. Se han publicado experimentos en los que la reacción de hibridación se invierte, es decir, se colocan los SSO en el filtro, y se hibrida con los amplificados marcados, a modo de sondas (Saiki y cols., 1989); en nuestro laboratorio se han llevado a cabo experimentos de este tipo, aún sin éxito. Esta técnica reduciría al máximo el número de hibridaciones (en la técnica genérica habría que realizar sólo una hibridación frente a las 20-30 necesarias en el método convencional) y permitiría realizar ambos tipajes en un tiempo razonable; también se eliminarían todas las heterogeneidades implícitas en el procedimiento de hibridación de SSO individuales (método empleado en este trabajo), como son las ligeras diferencias en la cantidad de tampón de hibridación entre las distintas reacciones, o pequeñas

variaciones en los tiempos de lavado, por el simple hecho de no poder decantar simultáneamente varios filtros en proceso de lavado, entre otras; estos detalles pueden cambiar ligeramente la fisonomía de las señales autoradiográficas; la valoración también sería más fácil al disponer de todas las hibridaciones en un solo filtro.

Estos avances pueden hacer factible en un futuro complementar, y posiblemente sustituir a las técnicas serológicas, a nivel asistencial, por su mayor capacidad de discriminación y precisión. Hoy por hoy, no se debe descartar el tipaje serológico debido a las mejoras técnicas que se van introduciendo que simplifican su realización, sobre todo en los casos en los que no se precise una información muy exhaustiva. No obstante, el tipaje genómico ha aclarado muchos puntos sobre la asociación HLA-enfermedad, en cuyo ámbito ya se han descrito ciertos marcadores de enfermedades concretas (Todd y cols., 1988). Asimismo, puede ayudar al desarrollo de los trasplantes de médula ósea entre individuos no emparentados, al poder contar con un instrumento que permite conocer con el máximo detalle el polimorfismo en el locus HLA. Por último, también puede ayudar a conocer en profundidad la función de las moléculas HLA.

S 7

VI. - CONCLUSIONS

---

Hemos aplicado la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e Hibridación con Oligonucleótidos para el tipaje genómico HLA DR, DQ y DP, con las siguientes conclusiones:

1.- La utilización del cloruro de Tetrametilamonio en el proceso de tipaje genómico facilita la asignación de alelos al presentar resultados más claros y específicos que con el empleo del SSPE.

2.- Los tipos serológicos DR1, DR2, DR4, DRw11, DR7, DRw9, y DRw10 pueden ser caracterizados genómicamente en un solo paso al presentar patrones de reacción característicos con los Oligonucleótidos Específicos de Secuencia (SSO) del panel genérico; es necesaria una segunda fase (grupoespecífica) para poder distinguir entre los alelos genómicos que integran los tipos DR1, DR2 y DR4.

3.- Por el contrario, la definición de los tipos DR3, DRw12, DRw13, DRw14, y DRw8 requiere la realización de dos fases: genérica y específica para el grupo de alelos asociados a DRw52, pues la primera fase, por sí sola es incapaz de definir dichos tipos serológicos. La segunda fase discrimina además entre los alelos genómicos que

constituyen dicho grupo.

4.- Se puede obtener un panel básico mínimo de Oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) para tipaje genómico de todos los tipos HLA-DR serológicos. El panel básico lo hemos fijado en 31 oligonucleótidos.

5.- El tipaje genómico puede utilizarse independientemente del serológico con gran fiabilidad. Varias muestras sin datos serológicos han sido caracterizadas mediante PCR e hibridación con SSO. Por tanto, esta última metodología puede completar los tipajes serológicos incompletos ("blancos") o modificar aquellos que no sean concluyentes.

6.- El panel de SSO empleado sólo permite la asignación de alelos genómicos en cierto número de heterozigotos. Será necesario ampliar en un futuro dicho panel para cubrir la totalidad de combinaciones heterozigotas posibles.

7.- En el resto de los locus HLA clase II (DQ y DP), la actual metodología genómica sólo permite conocer el tipaje completo en algunos casos.

VII.- B I B L I O G R A F I A

---

- 1.- ABE, A; ITO, I.; OHKUBO, M.; et al.  
Two distinct subtypes of the HLA-DRw12 haplotypes in the  
Japanese population detected by nucleotide sequence  
analysis and oligonucleotide genotyping.  
*Immunogenetics*, 30: 422-426 (1989).
- 2.- ACHA-ORBEA, H.; McDEVITT, H.O.  
The first external domain of the nonobese diabetic mouse  
class II I-A B chain is unique.  
*Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 84: 2435-2439 (1987).
- 3.- ADKINS, B.; MUELLER, C.; OKADA, C.Y.; REICHERT,  
T.R.A.; WEISSMAN, I.L.; SPANGRUDE, G.J.  
Early events in T-cell maturation.  
*Ann. Rev. Immunol.*, 5: 325-365 (1987).
- 4.- ALLEN, F.S.H.  
Linkage of HLA and GBC.  
*Vox Sang.*, 27: 383 (1974).
- 5.- ALLISON, J.P.; WALKER, L.E.; RUSSEL, W.A.; PELLEGRINE,  
H.A.; FERRONE, S.; REISFELD, R.A.; FRELINGER, J.A.;  
SILVER, J.  
Murine Ia and human DR antigens: homology of amino-  
terminal sequences.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 3953 (1978).
- 6.- ALLISON, J.P.; MCINTYRE, B.W.; BLOCH, D.  
Tumor specific antigen of murine T lymphoma defined with  
monoclonal antibody.  
*J. Immunol.*, 129: 2293-2300 (1982).
- 7.- ALLISON, J.P.; RIDGE, L.; LUND, J.; GROSS-PELOSE, J.;  
LANIER, L.L.; MCINTYRE, B.W.  
The murine T cell antigen receptor and associated  
structures.  
*Immunol. Rev.*, 81: 145-160 (1984).
- 8.- ANDERSSON, G.; LARHAMMAR, D.; WIDMARK, E.; SERVENIUS,  
B.; PETERSON, P.A.; RASK, L.  
Class II genes of the human major histocompatibility  
complex. Organization and evolutionary relationship of  
the DR $\beta$  genes.  
*J. Biol. Chem.*, 262: 8748-8758 (1987).
- 9.- ANDO, A.; INOKO, H.; NAKATSUJO, T.; SATO, T.;  
AWATAGUCHI, S., et al.  
HLA in Asia and Oceania. Ed. M. Izawa. Hokkaido Univ.

Press. Sapporo. Japón. Pág.: 859-865.

- 10.- ANGELINI, G.; de PREVAL, C.; GORSKI, J.; MACH, B.  
High resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism  
by hybridization with sequence-specific oligonucleotide  
probes.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 4489-4493 (1986).
- 11.- AUFRAY, C.; LITTLE, J.W.; ARNOT, D.; GROSSBERGER,  
D.; KAPPES, D.; STROMINGER, J.L.  
Isotypic and allotypic variation of human class II  
histocompatibility antigen  $\alpha$ -chain genes.  
Nature, 308: 327-333 (1984).
- 12.- AUFRAY, C.; STROMINGER, J.L.  
Molecular genetics of the human major histocompatibility  
complex.  
Advances in Human Genetics. Eds.: H. Harris, K.  
Hirschhorn. Plenum. New York, 1986. Vol. 15: 197-247.
- 13.- AUSTIN, P.; TROWSDALE, J.; RUDD, C.; BODMER, W.;  
FELDMANN, M.; LAMB, J.  
Functional expression of HLA-DP genes transfected into  
mouse fibroblasts.  
Nature, 313: 61 (1985).
- 14.- BABBIT, D.P.; ALLEN, P.M.; MATSUEDA, G.; HEBER, E.;  
UNANUE, E.R.  
Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility  
molecules.  
Nature, 317: 359-361 (1985).
- 15.- BACH, F.H.; HIRSCHHORN, K.  
Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility  
test in vitro.  
Science, 143: 813-814 (1964).
- 16.- BACH, F.H.; AMOS, D.B.  
Hu-1: Major histocompatibility locus in man.  
Science, 156: 1506-1508 (1967).
- 17.- BACH, F.H.; OHTA, N.; ANICHINI, A.; REINSMOEN, N.L.  
Cellular detection of HLA class II encoded determinants  
subtype polymorphisms of HLA-D.  
HLA class II antigens. Eds.: B.G.Solheim, E.Moller,  
S.Ferrone. Springer, Berlin, 1986. Pag. 249.
- 18.- BAIN, B.; VAZ, M.R.; LOWENSTEIN, L.  
The development of large immature mononuclear cells in  
mixed lymphocyte cultures.  
Blood, 23: 108-116 (1964).

- 19.- BAKKE, O.; DOBBERSTEIN, B.  
MHC class II-associated invariant chain contains a sorting  
signal for endosomal compartments.  
Cell, 63: 707-716 (1990).
- 20.- BAKKER, E.; PEARSON, P.L.; MEERA KHAN, P.; SCHREUDER,  
G.M.  
Orientation of major histocompatibility (MHC) genes  
relative to the centromere of chromosome 6.  
Clin. Genet., 15: 199 (1979).
- 21.- BECK, S; BARRELL, B.G.  
Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to  
MHC class-I antigens.  
Nature, 331: 269-272 (1988).
- 22.- BECKER, J.W.; REECKE, G.N. Jr.  
Three dimensional structure of B2-microglobulin.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82: 4225-4229 (1985).
- 23.- BEGOVITCH, A.B.; BUGAWAN, T.L.; NEPOM, P.S.; KLITZ,  
W.; NEPOM, G.T.; ERLICH, H.A.  
A specific HLA -DP $\beta$  allele is associated with  
pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis but not adult  
rheumatoid arthritis.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 9489-9493 (1989).
- 24.- BELL, J.  
The polymerase chain reaction.  
Immunol. Today, 10: 351-355 (1989).
- 25.- BELL, J.I.; DENNEY, D. Jr.; FOSTER, L.; BELT, T.;  
TODD, J.A.; McDEVITT, H.O.  
Allelic variation in the DR subregion of the human major  
histocompatibility complex.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84: 6234-6238 (1987).
- 26.- BELL, J.I.; TODD, J.A.; McDEVITT, H.O.  
The molecular basis of HLA-Disease association.  
Advances in Human Genetics, 18: 1-41 (1989).
- 27.- BENACERRAF, B.; McDEVITT, H.  
Histocompatibility linked immune response genes. A new  
class of genes that control the formation of specific  
immune response has been identified.  
Science, 175: 273 (1972).
- 28.- BENACERRAF, B.  
Role of MHC-products in immune regulation.  
Science, 212: 1229-1238 (1981).
- 29.- BENACERRAF, B.; UNANUE, E.R.

Inmunología. Editorial Médica Panamericana, 2<sup>a</sup> edición.  
Buenos Aires (1986). Pág. 105.

- 30.- BENOIST, C.; MATHIS, D.  
Regulation of major histocompatibility complex class II genes: X, Y and Other Letters of the Alphabet.  
*Ann. Rev. Immunol.*, 8: 681-715 (1990).
- 31.- BERAH, M.; HORS, J.; DUSSET, J.  
A study on HLA antigens in human organs.  
*Transplantation*, 9: 1985 (1970).
- 32.- BEVAN, M.  
In a radiation chimaera host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells.  
*Nature*, 296: 417 (1977).
- 33.- BIDWELL, J.  
DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and -DQ antigens.  
*Immunol. Today* 9: 27-32 (1988).
- 34.- BIERER, B.E.; SLECKMAN, B.P.; RATNOFSKY, S.I.; BURAKOFF, S.J.  
The biologic roles of CD2, CD4 and CD8 in T-cell activation.  
*Ann. Rev. Immunol.*, 7: 579-599 (1989).
- 35.- BILL, J.; PALMER, E.  
Positive selection of CD4+ T cells mediated by MHC class II bearing stromal cell in the thymic cortex.  
*Nature*, 341: 649-651 (1989).
- 36.- BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C.  
Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2.  
*Nature*, 329: 506-512 (1987a).
- 37.- BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C.  
The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigen.  
*Nature*, 329: 512-518 (1987b).
- 38.- BLIGHT, M.A.; HOLLAND, I.B.  
Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators.  
*Molec. Microbiol.*, 4: 873-880 (1990).
- 39.- BODMER, J.; BODMER, W.  
Histocompatibility.

Immunol. Today, 5: 250-253 (1984).

40.- BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A.; MACH, B.; MAYR, W.R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M.T.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P.I.

Nomenclature for factors of the HLA system, 1990.  
Tissue Antigens, 37: 1-8 (1991).

41.- BODMER, W.F.; ALBERT, E.D.; BODMER, J.G.; DUPONT, B.; MACH, B.; MAYR, W.R.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M.T.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P.I.

Nomenclature for factors of the HLA system, 1987.  
Immunobiology of HLA (Vol. I, Histocompatibility testing, 1987). Ed. Bo Dupont. Springer-Verlag. Pag. 72-79 (1989)

42.- von BOEHMER, H.

The developmental biology of T lymphocytes.  
Ann. Rev. Immunol., 6:309-326 (1988).

43.- von BOEHMER, H.

Developmental biology of T cells in T cell receptor transgenic mice.

Ann. Rev. Immunol., 8: 531-556 (1990).

44.- BOHME, J.; ANDERSSON, M.; ANDERSSON, G.; MÖLLER, E.; PETERSON, P.A.; RASK, L.

HLA-DR  $\beta$  genes vary in number between different DR specificities, whereas the number of DQ $\beta$  genes is constant.  
J. Immunol., 135: 2149 (1985).

45.- BONO, M.R.; STROMINGER, J.L.

NH-2 terminal sequence of the  $\alpha$  and  $\beta$  chain of human DC-1 antigen isolated from the JY cell line. Homology with murine I-A molecules.  
Immunogenetics, 18: 453 (1983).

46.- BOSS, J.M.; STROMINGER, J.L.

Regulation of a transfected human class II MHC complex gene in human fibroblasts.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9139-9143 (1986).

47.- BOTSEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.  
Am. J. Genet., 32: 314-331 (1980).

48.- BOTTAZZO, G.F.; TODD, I.; MIRAKIAN, R.; BELFIORE, A.; PUJOL-BORRELL, R.

Organ-specific autoimmunity.

Immunol. Rev., 94: 137-169 (1986).

- 49.- BRADLEY, B.; FESTENSTEIN, H.  
Cellular typing.  
Br. Med. Bull., 34: 223-232 (1978).
- 50.- BREUNING, M.H.; BERG-LOONEN, E.M. van der.; BERNINI, M.F.; BIJLMSA, J.B.; van LOGHEN, E.; MEERAKHAN, P.; NIJENHUIS, R.E.  
Localization of HLA on the short arm of chromosome 6.  
Hum. Genet., 37: 131 (1977).
- 51.- BRIATA, P.; RADKA, S.F.; SARTORIS, S.; LEE, J.S.  
Alternative splicing of HLA-DQB transcripts and secretion of HLA-DQ  $\beta$ -chain proteins: allelic polymorphism in splicing and polyadenylation sites.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 1003-1007 (1989).
- 52.- BRODSKY, F.M.  
The invariant dating service.  
Nature, 348: 581-582 (1990).
- 53.- BROWN, J.H.; JARDETZKY, T.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BJORKMAN, P.J.; WILEY, D.C.  
A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules.  
Nature, 332: 845-850 (1988).
- 54.- BROWNE, H.; SMITH, G.; BECK, S.; MINSON, T.  
A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and  $\beta 2$ -microglobulin.  
Nature, 347: 770-772 (1990).
- 55.- BUGAWAN, T.L.; HORN, G.T.; LONG, C.M.; MICKELSON, E.W.; HANSEN, J.A.; FERRARA, G.B.; ANGELINI, G.; ERLICH, H.A.  
Analysis of HLA-DP allelic sequence polymorphism using the in vitro enzymatic DNA amplification of DP $\alpha$  and DP $\beta$  loci.  
J. Immunol., 141: 4024-4030 (1988).
- 56.- BUGAWAN, T.L.; ANGELINI, G.; LARRICK, J.; AURICCHIO, S.; FERRARA, G.B.; ERLICH, H.A.  
A combination of a particular HLA-DP $\beta$  allele and an HLA-DQ heterodimer confers susceptibility to coeliac disease.  
Nature, 339: 470-473 (1989).
- 57.- BUGAWAN, T.L.; BEGOVITCH, A.B.; ERLICH, H.A.  
Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and non-radioactive sequence-specific oligonucleotide probes.  
Immunogenetics, 32: 231-241 (1990).
- 58.- BUJJS, S.; COLON, S.; SMITH, C.; FREED, J.H.; MILES, C.; GREY, H.M.

Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 3968-3971 (1986).

59.- BUUS, S.; SETTE, A.; COLON, S.M.; GREY, H.M.  
Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site on Ia.  
Science, 242: 1045-1047 (1988).

60.- CAIRNS, J.S.; CURTSINGER, J.M.; DAHL, C.A.; FREEMAN, S. ALTER, R.J.; BACH, F.H.  
Sequence polymorphism of HLA DR $\beta$ 1 alleles relating to T-cell recognized determinants.  
Nature, 317: 166-168 (1985).

61.- CALABI, F. MILSTEIN, C.  
A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping on chromosome 6.  
Nature, 323: 540-543 (1986).

62.- CARLE, G.F.; FRANK, M.; OLSON, M.V.  
Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field.  
Science, 232: 65-68 (1986).

63.- CARRINGTON, M.N.; SALTER, R.D.; CRESSWELL, P.; TING, G.P.Y.  
Evidence for methylation as a regulatory mechanism in HLA-DR gene expression.  
Immunogenetics, 22: 219 (1985).

64.- CHAMBERLAIN, J.S.; GIBBS, R.A.; RANIER, J.E.; NGUYEN, P.N.; CASKEY, C.T.  
Deletion sequence of the Duchenne muscular dystrophy locus, via multiple DNA amplification.  
Nuc. Ac. Res., 16: 11141-11154 (1988).

65.- CHARRON, D. J.; McDEVITT, H.O.  
Characterization of HLA-D region antigens by two dimensional gel electrophoresis. Molecular genotyping.  
J. Exp. Med., 152: 18 (1980).

66.- CHIEN, Y.; BECKER, D.M.; LINDSTEN, T.; OKAMURA, M.; COHEN, D.I.; DAVIS, M.M.  
A third type of murine T-cell receptor gene.  
Nature, 312: 31-35 (1984).

67.- CHIEN, Y.; IWASHIMA, M.; KAPLAN, K.B.; ELLIOTT, J.F.; DAVIS, M.M.  
A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation.  
Nature, 327: 677 (1987).

- 68.- CLAESSEN-WELSH, L.; BARKER, P.E.; LARHAMMAR, D.; RASK, L.; RUDDLE, F.H.; PETERSON, P.A.  
The gene encoding the human class II antigen associated gamma chain is located on chromosome 5.  
*Immunogenetics*, 20: 89 (1984).
- 69.- CLEVERS, H.; ALARCON, B.; WILEMANN, T.; TERHORST, C.  
The T-cell receptor/C3 complex. A dynamic protein ensemble.  
*Ann. Rev. Immunol.*, 6: 629-662 (1988).
- 70.- COUNCE, S.; SMITH, P.; BARTH, R.; SNELL, G.D.  
Strong and weak histocompatibility differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumor and skin.  
*Ann. Surg.*, 144: 198 (1956).
- 71.- CRESWELL, P.  
Regulation of HLA class I and class II expression.  
*Br. Med. Bull.*, 43: 66-69 (1987).
- 72.- DAAR, A.S.; FUGGLE, S.V.; FABRE, J.M.; TING, A.; MORRIS, P.  
The detailed distribution of HLA-ABC antigens in human organs.  
*Transplantation*, 38: 287 (1984a).
- 73.- DAAR, A.S.; FUGGLE, S.V.; FABRE, J.M.; TING, A.; MORRIS, P.  
The detailed distribution of MHC class II antigens in human organs.  
*Transplantation*, 38: 293 (1984b).
- 74.- DAUSSET, J.  
Leucoagglutinins. IV Leucoagglutinins and blood transfusion.  
*Vox. Sang.*, 4: 190 (1954).
- 75.- DAVIS, M.M.; BJORKMAN, P.J.  
T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.  
*Nature*, 334: 395-402 (1988).
- 76.- DETRICK, R.L.; JONES, P.P.  
Sequence elements required for activity of a murine MHC class II promoter bind common and cell-type specific nuclear factor.  
*Mol. Cell. Biol.*, 10: 593-604 (1990).
- 77.- DEMBIC, Z.; HASS, W.; WEISS, S.; McCUBREY, J.; KIEFER, H.; von BOEHMER, H.; STEINMETZ, M.  
Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes.

Nature, 320: 232 (1986).

78.- DEMBIC, Z.; HAAS, W.; ZAMOYSKA, R.; PARNES, J.; STEINMETZ, M.; von BOEHMER, H.  
Transfection of CD8 gene enhances T-cell recognition.  
Nature, 326: 510 (1987).

79.- DENNIS, G.J.; MOND, J.J.  
Corticosteroid-induced suppression of murine B cell immune response antigens.  
J. Immunol., 136: 1600-1604 (1986).

80.- DEVERSON, E.V.; GOW, I.R.; COADWELL, W.J.; MONACO, J.J.; BUTCHER, G.W.; HOWARD, J.C.  
MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters.  
Nature, 348: 738-741 (1990).

81.- DIDIER, D.K.; SCHIFFENBAUER, J.; SHUMAN, S.; ABRUZZINI, L.F.; GORSKI, J.G.; WATLING, D.L.; TIEBER, V.L.; SCHWARTZ, B.D.  
Characterisation of two distinct DR $\beta$  chain alleles at the BIII locus of the DR5 haplotype: BIII alleles are highly conserved.  
J. Immunol., 137: 2627-2631 (1986).

82.- DOOLITTLE, R.F.  
The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins.  
TIBS, 10: 23-27 (1985).

83.- DORN, A.; DURAND, B.; MARFING, C.; LeMEUR, M.; BENOIST, C.; MATHIS, D.  
Conserved MHC complex class II boxes -X and Y- are transcriptional control elements and specifically bind nuclear proteins.  
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 84: 6249-6253 (1987).

84.- DUPONT, B.; VIRDIS, R.; LERNER, A.J.; POLLACK M.S.; NELSON, C.  
The salt-washing and simple-virilizing form of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency have different HLA-association.  
In: Histocompatibility Testing 1984. Albert, E.M., Baur, H.P. and Mayr, W.R. Eds. Springer-Verlag, Berlin (1985).

85.- ECKELS, D.D.; HARTZMANN, R.J.  
Characterization of human T-lymphocyte clones (TCL's) specific for HLA-region gene products.  
Immunogenetics, 16: 117-133 (1982).

86.- EIJSVOOGEL VP, et al.

Position of a locus determining mixed lymphocyte reaction  
distinct from the known HLA-loci.  
Eur. J. Immunol., 2: 41 (1972).

87.- ENGELKE, D.R.; HOENER, P.A.; COLLINS, F.S.  
Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic  
DNA.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 544-548 (1988).

88.- FALK, K.; ROTZSCHKE, O.; RAMMENSEE, H-G.  
Cellular peptide composition governed by major  
histocompatibility complex class I molecules.  
Nature, 348: 248-251 (1990).

89.- FAULK, W.P.; TEMPLE, A.  
Distribution of microglobulin and HLA in chorionic villi  
of human placentae.  
Nature, 262: 799 (1976).

90.- FESTENSTEIN, H.; GARRIDO, F.  
MHC antigens and malignancy.  
Nature, 322: 502 (1986).

91.- FISCHER, H.-G.; FROSCH, S.; RESKE, K.; RESKE-KUNZ,  
A.B.  
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates  
macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis  
of MHC class II molecules and to augmented antigen  
presentation function.  
J. Immunol., 141: 3882-3888 (1988).

92.- FOLSOM, V.; GAY, D.; TONEGAWA, S.  
The  $\beta_1$  domain of the murine  $E\beta$  chain is important for  
restricted antigen presentation to helper T cell  
hybridomas.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82: 1678-1682 (1985).

93.- FU, S.H.; KUNKEL, H.G.; BRUSMAN, H.P.; ALLEN, F.J.;  
FOTINOC, M.  
Evidence for linkage between HLA Histocompatibility genes  
and those induced in the synthesis of the second component  
of complement.  
J. Exp. Med., 140: 1108 (1974).

94.- FU, S.M.; CHIRAZZI, N.; WANG, C.Y. et al.  
Ia bearing T lymphocytes in man.  
J. Exp. Med., 148: 1423 (1978).

95.- GAMMON, G.; DUNN, K.; SHASTRI, N.; OKI, A.; WILBUR,  
S.; SERCARZ, E.E.  
Neonatal T-cell tolerance to minimal immunogenic peptides  
is caused by clonal inactivation.

Nature, 319: 413 (1986).

96.- GARRETT, T.P.J.; SAPER, M.A.; BJORKMAN, P.J.;  
STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C.  
Specificity pockets for the side chain of peptide antigens  
in HLA-Aw68.

Nature, 342: 692 (1989).

97.- GAY, D.; MADDON, P.; SEKALY, R.; TALLE, M.A.;  
GODFREY, M.; LONG, E.; GOLDSTEIN, G.; CHESS L.; AXEL, R.  
KAPPLER, J.W.; MARRACK, P.C.  
Functional interaction between human T cell protein CD4  
and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen.  
Nature, 328: 626-629 (1987).

98.- GERMAIN, R.N.  
The ins and outs of antigen processing and presentation.  
Nature, 322: 687 (1986).

99.- GIBBS, R.A.; NGUYEN, P.-N.; CASKEY, C.T.  
Detection of single DNA base differences by competitive  
oligonucleotide priming.  
Nuc. Ac. Res., 17: 2437-2448 (1989).

100.- GIDSON, T.; MEDAWAR, P.B.  
The fate of skin homografts in man.  
J. Anat., 77: 299 (1943).

101.- GILBERT, W.  
Why genes in pieces.  
Nature, 271: 501 (1978).

102.- GILES, R.C.; CAPRA, J.D.  
Biochemistry of MHC class II molecules.  
Tissue Antigens, 25: 57 (1985).

103.- GORER, P.A.  
The detection of a hereditary antigenic difference in the  
blood of mice by means of human group A serum.  
J. Genetics, 32: 17 (1936a).

104.- GORER, P.A.  
The detection of antigenic differences in mouse  
erythrocytes by employment of immune sera.  
Brit. J. Exp. Path., 17: 42 (1936b).

105.- GORER, P.A.  
The genetic and antigenic basis of tumour transplantation.  
J. Path. Bact., 44: 691 (1937).

106.- GORER, P.A.; LYMAN, S.; SNELL, G.D.  
Studies on the genetic basis of tumour transplantation.

Linkage between a histocompatibility gene and fused in mice. Proc. Roy. Soc. B., 135: 499 (1948).

107.- GORSKI, J.  
First domain sequence of the HLA-DRB1 chain from two HLA-DRw14 homozygous typing cell lines.  
Hum. Immunol., 24: 145-149 (1989a).

108.- GORSKI, J.  
The HLA-DRw8, lineage was generated by a deletion in the DRB region followed by first domain diversification.  
J. Immunol., 142: 4041-4045 (1989b).

109.- GORSKI, J.; TOSI, R.; STRUBIN, M.; RABOURDIN-COMBE, C.; MACH, B.  
Serological and immunochemical analysis of the products of a single HLA DR- $\alpha$  and DR- $\beta$  chain gene expressed in a mouse cell line after DNA-mediated cotransformation reveals that the  $\beta$  chain carries a known specificity.  
J. Exp. Med., 162: 105-116 (1985).

110.- GORSKI, J.; MACH, B.  
Polymorphism of human Ia antigens: gene conversion between two DR $\beta$  loci results in a new HLA-D/DR specificity.  
Nature, 322, 67-70 (1986).

111.- GORSKI, J.; ROLLINI, P; MACH, B.  
Structural comparison of the genes of two HLA-DR supertypic groups: the loci encoding DRw52 and DRw53 are not truly allelic.  
Immunogenetics, 25: 397-402 (1987).

112.- GORSKI, J.; IRLE, C.X.; MICKELSON, E.M.; SHEEHY, M.J.; TERMIJTELEN, A.M.; ULLA, C.; MACH, B.  
Correlation of structure with T cell responses of the three members of the HLA-DRw52 allelic series.  
J. Exp. Med., 170: 1027-1032 (1989).

113.- GOWANS, J.L.; McGREGOR, D.D.; COWEN, D.M.; FORD, C.E.  
Initiation of immune response by small lymphocytes.  
Nature, 192: 651 (1962).

114.- GOYERT, S.M.; SHIVELY, J.E.; SILVER, J.  
Biochemical characterization of a second family of human Ia molecules, HLA-DS, equivalent to murine I-A subregion molecules.  
J. Exp. Med., 156: 550 (1982).

115.- GREGERSEN, P.K.; SHEN, M.; SONG, Q.-L.; MERRYMAN, P.; DEGAR, S.; SEKI, T.; MACCARTI, J.; GOLDBERG, D.; MURPHY, H.; SCHWENZER, J.; WANG, C.Y.; WINCHESTER, R.J.

- NEPOM, G.T.; SILVER, J.  
Molecular diversity of HLA-DR haplotypes.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 2642-2646 (1986a)
- 116.- GREGERSEN, P.K.; MORIUCHI, T.; KARR, R.W. et al.  
Polymorphism of HLA-DR  $\beta$  chains in DR4, -7 and -9  
haplotypes: implications for the mechanisms of allelic  
variation.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9149-9153 (1986b).
- 117.- GREGERSEN, P.K.; GOYERT, S.M.; SONG, Q.-L.; SILVER,  
J.  
Microheterogeneity of HLA-DR4 haplotypes. DNA sequence  
analysis of LD "KT2" and LD "TAS" haplotypes.  
Hum. Immunol., 19: 287-292 (1987).
- 118.- GREGERSEN, P.K.; TODD, J.A.; ERLICH, H.A.; LONG, E.;  
SERVENIUS, B.; CHOI, E.; KAO, H.T.; LEE, J.S.  
First domain sequence diversity of DR and DQ subregion  
alleles.  
Immunobiology of HLA (Vol. I, Histocompatibility Testing,  
1987). Ed. B. Dupont. Springer-Verlag. Pag. 1027-1034  
(1989).
- 119.- GUSTAFFSON, K.; WIDMARK, E.; JOHNSON, A-K.;  
SERVENIUS B.; SACHS, D.H.; LARHAMMAR, D.; RASK, L.;  
PETERSON, P.A.  
Class II genes of the human major histocompatibility  
complex. Evolution of the DP region as deduced from  
nucleotide sequences of the four genes.  
J. Biol. Chem., 262: 8778-8786 (1987).
- 120.- GYLLENSTEN, U.B.; ERLICH, H.A.  
Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain  
reaction and its application to direct sequencing of HLA-  
DQA locus.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 7652-7656 (1988).
- 121.- HAAS, D.A.; BOSS, J.M.; STROMINGER, J.L.; SPIES, T.  
A highly diverged  $\beta$ 1 exon in the DR region of the human  
MHC: sequence and evolutionary implications.  
Immunogenetics, 25: 15-20 (1987).
- 122.- HALDANE, J.B.S.  
The genetics of cancer.  
Nature, 132: 265 (1933).
- 123.- HALLORAN, P.F.; WADGYMAR, A.; AUTENRIED, P.  
The regulation of expression of major histocompatibility  
complex products.  
Transplantation, 41: 1-3 (1986).

- 124.- HAMMERLING, G.; MORENO, J.  
The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules.  
*Immunol Today*, 11: 337-340 (1990).
- 125.- HARDY, D.A.; BELL, J.I.; LONG, E.O.; LINDSTEN, T.; McDEVITT, H.O.  
Mapping of the class II region of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis.  
*Nature*, 323: 453-455 (1986).
- 126.- HARMON, W.E.; PARKMAN, R.; GAUM, P.T.; GRUPE, W.E.; INGELFINGER, J.R.; YUNIS, E.J.; LEVEY, R.H.  
Comparison of cell-mediated lympholysis and mixed lymphocyte culture as the immunologic evaluation for renal transplantation.  
*J. Immunol.*, 129: 1573-1577 (1982).
- 127.- HEDRICK, S.M.; COHEN, D.I.; NIELSEN, E.A.; DAVIS, M.M.  
Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane associated proteins.  
*Nature*, 308: 149-153 (1984a).
- 128.- HEDRICK, S.M.; NIELSEN, E.A.; KAVALER, J.; COHEN, E.I.; DAVIS, M.M.  
Sequence relationship between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins.  
*Nature*, 308: 153-158 (1984b).
- 129.- HIGUCHI, R.; von BEROLDINGEN, C.H.; SENSABAUGH, G.F.; ERLICH, H.A.  
DNA typing from single hairs.  
*Nature*, 332: 543-546 (1988).
- 130.- HIRSCHBERG, H.; KAGKINEN, H.; THORSBY, E.  
Typing for HLA-D determinants. Comparison of typing results using homozygous stimulating cells and primed cultures.  
*Tissue Antigens*, 7: 213-219 (1976).
- 131.- HIRSCHBERG, H.; MOEN, T.; THORSBY, E.  
Complement and cell mediated specified destruction of human endothelia treated with anti DRw antisera.  
*Transplant. Proc.*, 11: 776 (1979).
- 132.- HOLMES, N.  
New HLA class I molecules.  
*Immunol. Today*, 10: 52-53 (1989).
- 133.- HORN, G.T.; BUGAWAN, T.L.; LONG, C.M.; ERLICH, H.A.

Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci.  
Relationship to serology and to insulin-dependent diabetes  
mellitus.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 6012-6016 (1988a).

134.- HORN, G.T.; BUGAWAN, T.L.; LONG, C.M.; MANOS, M.M.  
ERLICH, H.A.

Sequence analysis of HLA class II genes from insulin-  
dependent diabetic individuals.  
Hum. Immunol., 21: 249-263 (1988b).

135.- HUMPHREYS, R.E.; McCUNE, J.M.; CHESS, L., et al.  
Isolation and immunologic characterization of a human B-  
lymphocyte specific cell surface antigen.  
J. Exp. Med., 114: 98-112 (1976).

136.- HURLEY, C.K.; SHAW, S.; NADLER, L.; SCHLOSMAN, S.;  
CAPRA, J.D.  
Alpha and beta chains of SB and DR antigens are  
structurally distinct.  
J. Exp. Med., 156: 1557 (1982).

137.- HURLEY, C.K.; GREGERSEN, P.K.; GORSKI, J.; STEINER,  
N.; ROBBINS, F.M.; HARTZMAN, R.; JOHNSON, A.H.; SILVER, J.  
The DR3 (w18), DQw4 haplotypes differs from DR3 (w17),  
DQw2 haplotypes at multiple class II loci.  
Hum. Immunol., 25: 37-50 (1989).

138.- HURLEY, C.K.; LEE, K.W.; MICKELSON, E.; MASEWICZ,  
S.; JOHNSON, A.H.  
DRw8 microvariation : a new DRB1 allele identified in  
association with DQw7 in American Blacks.  
Hum. Immunol., 1991 en prensa.

139.- INNIS, M.A.; MYAMBO, K.B.; GELFAND, D.H.; BROW,  
M.A.D.  
DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and  
direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified  
DNA.  
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 85: 9436-9440 (1988).

140.- JANeway, C. Jr.  
T cell development: accessories or coreceptors?.  
Nature, 335: 208-210 (1988).

141.- JONES, P.P.; MURPHY, D.B.; McDEVITT, H.O.  
Two gene control of the expression of a murine Ia antigen.  
J. Exp. Med., 148: 92 (1978).

142.- JONES, P.P.; MURPHY, P.B.; HEWGILL, D.; McDEVITT,  
M.O.  
Detection of a common polypeptide chain in I-A and I-E

subregion immunoprecipitates.  
Mol. Immunol., 16: 51 (1979).

143.- JONSSON, A.K.; ANDERSON, L.; RASK, L.  
A cellular and functional split in the DRw8 haplotype is  
due to a single aminoacid replacement (DR $\beta$  ser57-asp57).  
Immunogenetics, 29: 308-316 (1989).

144.- JONSSON, A.K.; RASK, L.  
Human class II "DNA" and "DOB" genes display low sequence  
variability.  
Immunogenetics, 29: 411-413 (1989).

145.- KAPPES, D.J.; ARNOT, D.; OKADA, K.; STROMINGER, J.L.  
Structure and polymorphism of the HLA class II SB light  
chain gene.  
EMBO Journal, 3: 2985-2993 (1984).

146.- KAPPES, D.; STROMINGER, J.L.  
Human class II major histocompatibility complex genes and  
proteins.  
Ann. Rev. Biochem., 57: 991-1028 (1988).

147.- KAPPLER, J.; KUBO, R.; HASKINS, K.; HANNUM, C.;  
MARRACK, P.; PIGEON, M.; MCINTYRE B.; ALLISON, J.;  
TROWBRIDGE, I.  
The major histocompatibility complex restricted antigen  
receptor on T cells in mouse and man. Identification of  
constant and variable peptides.  
Cell, 35: 295-302 (1983).

148.- KARR, R.W.; GREGERSEN, P.K.; OBATA, F.; GOLDBERG,  
D.; MACCARI, J.; ALBER, C.; SILVER, J.  
Analysis of DR $\beta$  and DQ $\beta$  chain cDNA clones from a DR7  
haplotype.  
J. Immunol., 137: 2886-2890 (1986).

149.- KATZ, D.H.; HAMAOKA, T.; BENACERRAF, B.  
Cell interactions between histocompatible T and B  
Lymphocytes. Failure of physiologic cooperative  
interactions between T and B lymphocytes from allogeneic  
donor strains in humoral response to hapteneprotein  
conjugates.  
J. Exp. Med., 137: 1405 (1973).

150.- KAUFFMAN, J.F.; STROMINGER, J.L.  
Both chains of HLA-DR bind to the membrane with a  
penultimate hydrophobic region and the heavy chain is  
phosphorylated at its hydrophylic carboxy terminus.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76: 6304-6308 (1979).

151.- KAUFFMAN, J.F.; STROMINGER, J.L.

HLA-DR light chain has a polymorphic N-terminal region and a conserved Immunoglobulin-like C-terminal region.  
Nature, 297: 694-696 (1982).

152.- KAUFMAN, J.F.; STROMINGER, J.L.  
The extracellular region of light chains from human and murine MHC class II antigens consist of two domains.  
J. Immunol., 130: 808 (1983).

153.- KAUFFMAN, J.F.; AUFRAY, C.; KORMAN, A.J.; SHACKLEFORD, D.A.; STROMINGER, J.L.  
The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex.  
Cell, 36: 1-13 (1984a).

154.- KAUFFMAN, J.F.; KRANGEL, M.S.; STROMINGER, J.L.  
Cysteines in the transmembrane region of MHC antigens are fatty acylated via thioester bonds.  
J. Biol. Chem., 259: 7230-7238 (1984b).

155.- KAWAI, J.; ANDO, A.; SATO, T.; NAKATSUJI, T.; TSUJI, K.; INOKO, H.  
Analysis of gene structure and antigen determinants of DR2 antigens using DR gene transfer into mouse L cells.  
J. Immunol., 142: 312-317 (1989).

156.- KISSMEYER-NIELSEN, F.  
ed. Histocompatibility testing.  
Copenhagen: Munksgaard. (1975).

157.- KLARESKOG, L.; TJERNLUND, U.M.; FORSUM, U.; PETERSON, P.A.  
Epidermal Langerhans cells express Ia antigens.  
Nature, 268: 248 (1977).

158.- KLEIN, J.  
Immunology, the science of self-nonself discrimination.  
John Wiley & sons, New York, 1<sup>a</sup> edición. Pág. 305 (1982).

159.- KOCH, W.; BENOIST, C.; MATHIS, D.  
Anatomy of a new B-cell-specific enhancer.  
Mol. Cell. Biol., 9: 303-311 (1989).

160.- KOHLER, G.; MILSTEIN, C.  
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.  
Nature, 256: 495-497 (1975).

161.- KOLLER, B.H.; GERAGHTY, D.E.; SHIMIZU, Y.; DeMARS, R.; ORR, H.T.  
HLA-E: a novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes.

J. Immunol., 141: 897-904 (1988).

162.- KOLLER, B.H.; GERAGHTY, D.E.; DeMARS, R.; DUVICK, L.; RICH, S.S.; ORR, H.T.  
Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family.  
J. Exp. Med., 169: 469-480 (1989).

163.- KORMAN, A.J.; BOSS, J.M.; SPIES, T.; SORRENTINO, B.; OKADA, K.; STROMINGER, J.L.  
Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens.  
Immunol. Rev., 85: 45-86 (1985).

164.- KOURILSKY, P.; CLAVERIE, J.M.  
The peptidic self model: a hypothesis on the molecular nature of the immunological self.  
Ann. Inst. Pasteur, 137D: 3-21 (1986).

165.- KOURILSKY, P.; CLAVERIE, J.M.  
MHC restriction, alloreactivity and thymic education: a common link.  
Cell, 56: 327-329 (1989).

166.- KRONENBERG, M.; SIU, G.; HOOD, L.E.; SHASTRI, N.  
The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition.  
Ann. Rev. Immunol., 4: 529-591 (1986).

167.- KVIST, S.; HAMANN, U.  
A nucleoprotein peptide of influenza A virus stimulates assembly of HLA B27 heavy chain and  $\beta$ -2 microglobulin translated in vitro.  
Nature, 348: 446-448 (1990).

168.- LANCHBURY, J.S.S.; JAEGER, E.E.M.; WELSH, K.; PANAYI, G.S.  
Nucleotide sequence of a novel HLA-DR4B1 allele DRB1\*0409.  
Immunogenetics, 33: 210-212 (1991).

169.- LANDSTEINER, K.  
Über agglutinationserscheinungen normalen Menslichen Blutes.  
Wien. Klin. Wochenschr., 14: 1132-1134 (1901).

170.- LANDSTEINER, K.  
Individual differences in human blood.  
Science, 73: 403 (1931).

171.- LARHAMMAR, D.; SCHENNING, L.; GUSTAFSSON, K. et al.  
Complete aminoacid sequence of an HLA-DR antigen-like  $\beta$  chain as predicted from the nucleotide sequence:

similarities with immunoglobulins and HLA-A, B and C antigens.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA : 3687-3691 (1982).

172.- LEE, K.W.; JOHNSON, A.H.; HURLEY, C.K.  
Two divergent routes of evolution gave rise to the DRw13 haplotypes.

J. Immunol., 145: 3119-3125 (1990).

173.- LENARDO, M.J.; BALTIMORE, D.  
NF- $\kappa$ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control.

Cell, 58: 227-229 (1989).

174.- LENCH, N.; STANIER, P.; WILLIAMSON, R.  
Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis.

Lancet i: 1356-1358 (1988).

175.- LEW, A.M.; LILLEHOJ, E.P.; COWAN, E.P.; MALOY, W.L.;  
VAN SCHRAVENDIJK, M.R.; COLIGAN, J.E.  
Class I genes and molecules: an update.

Immunology, 57: 3-18 (1986).

176.- LI, H.; GYLLENSTEN, U.B.; CUI, X.; SAIKI, R.K.;  
ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N.  
Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells.

Nature, 335: 414-417 (1988).

177.- LITTLE, C.C.  
A possible mendelian explanation for a type of inheritance apparently non-mendelian in nature.

Science, 40: 904 (1914).

178.- LITTLE, C.C.; TYZZER, E.E.  
Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumour, carcinoma (J.W.A.) of the Japanese waltzing mice.

J. Med. Res., 33: 393 (1915).

179.- LIU, C.-P.; BACH, F.H.; WU, S.  
Molecular studies of a rare DR2/LD-5a/DQw3 HLA class II haplotype. Multiple genetic mechanisms in the generation of polymorphic HLA class II genes.

J. Immunol., 140: 3631-3639 (1988).

180.- LOPEZ de CASTRO, J.A.; ORR, H.T.; ROBB, P.R.;  
KOSTYK, T.G.; MAMM, D.L.; STROMINGER, J.L.  
Complete aminoacid sequence of a papain solubilized human histocompatibility antigen HLA-B7.  
I. Isolation and aminoacid composition of fragments and of

tryptic and chymotryptic peptides.  
Biochem., 18: 5704 (1979).

181.- LOPEZ de CASTRO, J.A.; STROMINGER, J.L.; STRONG, D.M.; ORR, H.T.

Structure of cross reactive human histocompatibility antigens HLA-A28 and HLA-A2: possible implication for generation of HLA polymorphismn.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 3813 (1982).

182.- LOPEZ DE CASTRO, J.; BARBOSA, J.A.; KRANGEL, M.S.; BIRO, F.A.; STROMINGER, J.L.

Structural analysis of the funcional sites of class I antigens.

Immunol. Rev., 85: 149-168 (1985).

183.- LORENZ, R.G.; ALLEN, P.M.

Direct evidencie for functional self protein/Ia-molecule complexes in vivo.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5220-5223 (1988).

184.- LOTTEAU, V.; TEYTON, L.; BURROUGHS,D.; CHARRON, D. A novel HLA class II molecule (DR $\alpha$ -DQ $\beta$ ) created by mismatched isotype pairing.

Nature, 329: 339-341 (1987).

185.- LOTTEAU, V.; TEYTON, L.; PELETAUX, A.; NILSSON, T.; KARLSSON. L.; SCHMID, S.L.; QUARANTA,V.; PETEFSON, P.A. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain.

Nature, 348: 600-605 (1990).

186.- LU, C.Y.; CHANGELIAN, P.S.; UNANUE, E.R.  $\alpha$ -fetoprotein inhibits macrophage expression of Ia antigens.

J. Immunol., 132: 1722-1727 (1984).

187.- MALISSEN, M.; MALISSEN, B.; JORDAN, B.R.

Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of a HLA gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79: 893 (1982).

188.- MARRACK P.; KAPPLER, J.

The T-cell repertoire for antigen and MHC.

Immunol. Today, 9: 308-315 (1988).

189.- MARSH, S.G.E.; BODMER, J.G. HLA-DR and -DQ epitopes and monoclonal antibody specificity.

Immunol. Today, 10: 305-312 (1989).

190.- MARSH, S.G.E.; BODMER, J.G.

HLA class II nucleotide sequences, 1991.  
Immunogenetics, 33: 321-334 (1991).

191.- MARTIN, L.H.; CALABI, F.; MILSTEIN, C.  
Isolation of CD1 genes: a family of major  
histocompatibility complex-related differentiation  
antigens.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9154-9158 (1986).

192.- MASSA, P.T.; TER MEULEN, V.; FONTANA, A.  
Hiperinducibility of Ia antigens on astrocytes correlates  
with strain-specific susceptibility to experimental  
autoimmune encephalomyelitis.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84: 4219 (1987).

193.- MAWAS, C.; CHAUSSOT, D.; SASPORTES, M.  
Secondary responses of in vitro primed human lymphocytes  
to allogeneic cells.  
I. Role of HLA antigens and mixed lymphocyte reaction  
stimulating determinants in secondary in vitro  
proliferative responses.  
Immunogenetics, 2: 449-463 (1975).

194.- McBREEN, P.; ENGEL, E.; CROCE, C.M.  
Assignment of gene for glyoxilase-1 to region p21 pter on  
human chromosome 6.  
Cytogenet. Cell. Genet., 19: 205 (1977).

195.- MCCLURE, G.R.; RUBERTI, G.; FATHMAN, C.G.; ERLICH,  
H.A.; BEGOVICH, A.B.  
DRB1\*LY10 - a new DRB1 allele and its haplotypic  
association.  
Immunogenetics, 32: 214-217 (1990).

196.- McDEVITT, H.O.; TYAN, M.L.  
Genetic control of the antibody response in inbred mice.  
Transfer of response by spleen cells and linkage to the  
major histocompatibility (H-2) locus.  
J. Exp. Med., 128: 1 (1968).

197.- McDEVITT, H.O.; CHINITZ, A.  
Genetic control of antibody response. Relationship between  
immune response and histocompatibility (H-2) type.  
Science, 163: 1207 (1969).

198.- McDUFFIE, M.; ROEHM, N.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P.  
Involvement of major histocompatibility complex products  
in tolerance induction in the thymus.  
J. Immunol., 141: 1840-1847 (1988).

199.- MEDAWAR, P.B.  
The behaviour and fate of skin autografts and skin homo-

- grafts in rabbits.  
J. Anat. (London), 98: 176 (1944).
- 200.- MERRYMAN, P.; GREGERSEN, P.K.; LEE, S.; SILVER, J.; NUÑEZ-ROLDAN, A.; CRAPPER, R.; WINCHESTER, R.  
Nucleotide sequence of a DRw10  $\beta$  chain cDNA clone.  
J. Immunol., 140: 2447-2452 (1988).
- 201.- MIESCHER, P.; FAUCONNET, M.  
Mise en évidence de différentes groupes leucocitaires chez  
l'homme.  
Schweiz. Med. Wochr., 84: 597 (1954).
- 202.- MITCHELL, P.J.; TIAN, R.  
Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.  
Science, 245: 371-378 (1989).
- 203.- MITCHINSON, N.A.  
Passive transfer of transplantation immunity.  
Proc. Roy. Soc. (London), 142: 72 (1954).
- 204.- MOLLER, G.  
Antigenic requirements for activation of MHC restricted responses.  
Immunol. Rev., 98: 1-187 (1987).
- 205.- MOND, J.J.; SEGHAL, E.; KUNG, J.; FINKELMAN, F.D.  
Increased expression of I-region-associated antigen (Ia)  
on B cells after cross-linking of surface immunoglobulin.  
J. Immunol., 127: 881-885 (1981).
- 206.- MOND, J.J.; CARMAN, J.; SARMA, C.; OHARA, J.;  
FINKELMAN, F.D.  
Interferon- $\tau$  suppresses B cell stimulation factor (BSF-1)  
induction of class II MHC determinants on B cells.  
J. Immunol., 137: 3534-3537 (1986).
- 207.- MORIUCHI, J.; MORIUCHI, T.; SILVER, J.  
Nucleotide sequence of an HLA-DQ $\alpha$  chain derived from a  
DRw9 cell line: genetic and evolutionary implications.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82: 3420-3424 (1985).
- 208.- MUELLER, D.L.; JENKINS, M.K.; SCHWARTZ, R.H.  
Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a  
costimulatory signalling pathway determines the outcome of  
T cell antigen receptor occupancy.  
Ann. Rev. Immunol., 7: 445-480 (1989).
- 208bis.- NAGY, Z.A.; LEHMANN, P.V.; FALCIONI, F.; MULLER,  
S.; ADORINI, L.  
Why peptides? Their possible role in the evolution of MHC-

restricted T-cell recognition.  
Immunol. Today, 10: 132-138 (1989).

209.- NATALI, P.G.; BIGOTTI, A.; NICOTRA, M. R.; VIORA, M.; MANFREDI, D.; FERRONE, S.  
Distribution of human class I (HLA-A,B,C) histocompatibility antigens in normal and malignant tissues of nonlymphoid origin.  
Cancer Res., 44: 4679 (1984a).

210.- NATALI, P.G.; SEGATTO, O.; FERRONE, S.; TOSI, R.; CORTE, G.  
Differential tissue distribution and ontogeny of CD-1 and HLA-DR antigens.  
Immunogenetics, 19: 109 (1984b).

211.- NATHESON, S.G.; CULLEN, S.E.  
Biochemical properties and immunochemical relationships of mouse H-2 alloantigens.  
Biochem. Biophys. Acta, 344: 1 (1974).

212.- NAVARRETE, C.; SEKI, T.; MIRANDA, A.; WINCHESTER, R.; GREGERSEN, P.K.  
DNA sequence analysis of the HLA-DRw12 allele.  
Hum. Immunol., 25: 51-58 (1989).

213.- NEPOM, G.T.; HANSEN J.A.; NEPOM, B.S.  
The molecular basis for HLA class II association with rheumatoid arthritis.  
J. Clin. Immunol., 7: 1 (1987).

214.- NEWTON, C.R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, L.E.; POWELL, S.J.; SUMMERS, S.; KALSHEKER, N.; SMITH, J.C.; MARKHAM, A.F.  
Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutant system.  
Nuc. Ac. Res., 17: 2503-2516 (1989).

215.- NOELLE, R.J.; KUZIEL, W.A.; MALISZEWSKI, C.R.; McADAMS, E.; VITETTA, E.S.; TUCKER, P.W.  
Regulation of the expression of multiple class II genes in murine B cells by B cell stimulatory factor-1 (BSF-1).  
J. Immunol., 137: 1718-1723 (1986).

216.- NUCHTERIN, J.G.; BIDDISON, W.E.; KLAUSNER, R.D.  
Class II MHC molecules can use theogenous pathway of antigen presentation.  
Nature, 343: 74-76 (1990).

217.- OBATA, F.; ABE, A.; OHKUBO, M.; ITO, I.; KANEKO, T.; OTANI, F.; WATANABE, K.; KASHIWAGI, N.  
Sequence analysis and oligonucleotide genotyping of HLA-DR

"JX6", a DR "blank" haplotype found in the Japanese population.  
Hum. Immunol., 27: 269-284 (1990a).

218.- OBATA, F.; ITO, I.; ITO, K. et al.  
Sequence analysis and HLA-DR genotyping of a novel HLA-DRw14 allele.  
Immunogenetics, 32: 313-320 (1990b).

218bis.- ODUM, N.; PLATZ, P.; JAKOBSEN, B.K.; PETERSEN, C.; JAKOBSEN, N.; MOLLER, J.; RYDER, L.P.; LAUM, L.; SVEJGAARD, A.  
HLA-DP and bone marrow transplantation. DP  
incompatibility and severe acute graft-versus-host disease.  
Tissue Antigens, 30: 213-216 (1987).

219.- OKADA, K.; PRENTICE, H.L.; BOSS, J.M. et al.  
SB subregion of the human major histocompatibility complex: Gene organization, allelic polymorphism and expression in transformed cells.  
EMBO. J., 4: 739 (1985).

220.- OLLERUP, O.; SMITH, C.I.E.; HAMMARSTROM, L.  
Different aminoacids at position 57 of the HLA-DQ $\beta$  chain associated with susceptibility and resistance to IgA deficiency.  
Nature, 347: 289-290 (1990).

221.- ORR, H.T.; LOPEZ DE CASTRO, J.A.; LANCET, D.; STROMINGER, J.L.  
Complete aminoacid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7.  
2. Sequence determination and search for homologies.  
Biochemistry, 18: 5711-5719 (1979).

222.- ORR, H.T.; DE MARS, R.  
Class I-like HLA genes map telomeric to the HLA-A2 locus in human cells.  
Nature, 302: 532 (1984).

223.- OZATO, K.; SACHS, D.H.  
Detection of at least two distinct mouse I-E antigens molecules by the use of a monoclonal antibody.  
J. Immunol., 128: 807 (1982).

224.- PARHAM, P.  
A profitable lesson in heresy.  
Nature, 340: 426-428 (1989).

225.- PARHAM, P.  
Antigens processing: transporters of delight.

Nature, 348: 674-675 (1990).

226.- PAYAMI, H.; THOMSON, G.; KHAN, M.A.; GERMAN, D.M.; SANDERS., P.; DYER, P.; DOSTAL, C.  
Genetics of the rheumatoid arthritis.  
Tissue Antigens, 27: 57-63 (1986).

227.- PAYNE, M.; ROLFS, M.R.  
Fetomaternal leukocyte incompatibility.  
J. Clin. Invest., 32: 1756 (1958).

228.- PÉRARNAU, B; SIEGRIST, C-A; GILLET, A.; VINCENTI, C;  
KIMURA, S; LEMMONIER,F.A.  
 $\beta$ 2 microglobulin restriction of antigen presentation.  
Nature, 346: 751-754 (1990).

229.- PERNIS, B.; VOGEL, J.H.  
Cell biology of the major histocompatibility complex.  
1<sup>a</sup> Edición. Orlando Academic Press Inc. XXI (1985).

230.- PETERSDORF, E.W.: GRIFFITH, R.L.; ERLICH, H.A. et al.  
Unique sequences for two HLA-DRB1 genes expressed on distinct DRw6 haplotypes.  
Immunogenetics, 32: 96-103 (1990).

231.- PETERSDORF, E.W.; SMITH, A.G.; MICKELOSON, E.M.; MARTIN, P.J.; HANSEN, J.A.  
Ten HLA-DR4 alleles defined by sequence polymorphisms within the DRB1 first domain.  
Immunogenetics, 33: 267-275 (1991).

232.- PETERSON, M.; MILLER, J.  
Invariant chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules.  
Nature, 345: 172-174 (1990).

233.- PETERSON, P.A.; CUNNINGHAM, B.A; BERGGARD, I.; EDELMAN, G.M.  
 $\beta$ 2-microglobulin - A free immunoglobulin domain.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69: 1697-1701 (1972).

234.- PFIZENMAIER, K.; WEURICH, P.; SCHLUTER, C.; KRONKE, M.;  
Tumor necrosis factor enhances HLA-A,B,C and HLA-DR gene expression in human tumor cells.  
J. Immunol., 138: 975-980 (1987).

235.- REDMAN, C.W.G.; McMICHAEL, A.J.; STIRRATS, G.M.; SUNDERLAND, C.A.; TING, A.  
Class I MHC antigens on human extravillous trophoblast.  
Immunology, 52: 4547 (1984).

- 236.- REITH, W.; SATOLA, S. HERRARO-SANCHEZ, H.; AMALDI, I.; LISOWSKA-GROSSPIERRE, B.; GRISCELLI, C.; HADAM, M.R.; MACH, B.  
Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lacks a specific HLA-DR promoter binding protein, RF-X.  
*Cell*, 53: 897-906 (1988).
- 237.- ROBINSON, P.J.; LUNDIN, L. SEGE, K.; GRAFT, L.; WIGZELL, M.; PETERSON, P.A.  
Location of the mouse  $\beta$ 2-microglobulin gene determined by linkage analysis.  
*Immunogenetics*, 14: 449 (1981).
- 238.- ROCHE, P.A.; CRESWELL, P.  
Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding.  
*Nature*, 345: 615-618 (1990).
- 239.- ROLLINI, P.; MACH, B.; GORSKI, J.  
Linkage map of three DR $\beta$ -chain genes. Evidence for a recent duplication event.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82: 7197-7201 (1985).
- 240.- ROLLINI, P.; MACH, B.; GORSKI, J.  
Characterisation of an HLA-DR $\beta$  pseudogene in the DRw52 supertypic group.  
*Immunogenetics*, 25: 336-342 (1987).
- 241.- RONCHESE, F.; SCHWARTZ, R.H.; GERMAIN, R.N.  
Functionally distinct susites on a class II major histocompatibility complex molecule.  
*Nature*, 329: 254-256 (1987).
- 242.- van ROOD, J.J.; EERNISSE, J.G.; VAN LEEUWEN, A.  
Leucocyte antibodies in sera from pregnant women.  
*Nature*, 181: 1731 (1958).
- 243.- van ROOD, J.J.; van LEUWEN, A.; KEUNING, J.J.; van OUD ALBAS.  
The serological recognition of the human MLC determinants using a modified cytotoxicity technique.  
*Tissue Antigens*, 5: 73-80 (1975).
- 244.- ROSA, F.; HATAT, D.; ABADIE, A.; WALLACH, D.; REVEL, M.; FELLOUS, M.  
Differential regulation of HLA-DR mRNAs and cell surface antigens by interferon.  
*EMBO J.*, 2: 1585-1589 (1983).
- 245.- ROSENTHAL, A.S.; SEVACH, E.M.

Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes.

I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes.

J. Exp. Med., 138: 1194 (1973).

246.- ROTTER, J.I.; LANDLAW, E.M.  
Measuring the genetic contribution of a single locus to a multilocus disease.

Clin. Genet., 26: 529 (1984).

247.- SAIKI, R.K.; SCHAFER, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N.  
Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science, 230: 1350-1354 (1985).

248.- SAIKI, R.K.; BUGAWAN, T.L.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A.  
Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes.

Nature, 324: 163-166 (1986).

249.- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHAFER, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A.  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science, 239: 487-491 (1988a).

250.- SAIKI, R.K.; CHANG, C.-A.; LEVENSON, C.H.; WARREN, T.C.; BOEHM, C.D.; KAZAZIAN, H.H.; ERLICH, H.A.  
Diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia with enzymatically amplified DNA nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes.

N. Engl. J. Med., 319: 537-541 (1988b).

251.- SAIKI, R.K.; WALSH, P.S.; LEVENSON, C.H.; ERLICH, H.A.  
Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 6230-6234 (1989).

252.- SAITO, H.; KRANZ, D.M.; TAKAGAKI, Y.; HAYDAY, A.C.; EISEN, H.N.; TONEGAWA, S.  
A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes.

Nature, 312: 36-40 (1984).

253.- SAITO, T.; GERMAIN, R.N.  
The generation and selection of the T cell repertoire:  
insights from studies of the molecular basis of T cell

- recognition.  
Immunol. Rev., 101: 81-113 (1988).
- 254.- SALTER, R.D.; ALEXANDER, J.; LEVINE, F.; PIOUS, D.; CRESSWELL, P.  
Evidence for two trans-acting genes regulating HLA class II antigen expression.  
J. Immunol., 135: 4235-4238 (1985).
- 255.- SALTER, R.D.; BENJAMIN, R.J.; WESLEY, P.K.; BUXTON, S.E.; GARRET, T.P.J.; CLAYBERGER, C.; KRENSKY, A.M.; NORMENT, A.M.; LITTMAN, D.R.; PARHAM, P.  
A binding site for the T-cell coreceptor CD8 on the  $\alpha 3$  domain of HLA-A2.  
Nature, 345: 41-46 (1990).
- 256.- SANT, A.J.; BRAUNSTEIN, N.S.; GERMAIN, R.N.  
Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class II major histocompatibility complex  $\alpha\beta$  dimer expression.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84: 8065-8069 (1987).
- 257.- SANT, A.J.; GERMAIN, R.N.  
Intracellular competition for component chains determines class II MHC Cell surface phenotype.  
Cell, 57: 797-805 (1989).
- 258.- SCHARF, S.J.; FRIEDMAN, A.; BRAUTBAR, C.; SZAFER, F.; STEINMAN, L.; HORN, G.; GYLLENSTEN, U.; ERLICH, H.A.  
HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 3504-3508 (1988).
- 259.- SCHENDEL, D.J.; JENNERT, W.; BICKERT, K.; WANK, R.  
Joint report. CML: a method for cellular typing.  
Histocompatibility Testing. E.D. Albert, M.P. Baur, W.R. Mayo, editores. Springer-Verlag, K.G. Berlin; pag. 306-312 (1985).
- 260.- SCHWARTZ, R.H.  
T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex.  
Ann. Rev. Immunol., 3: 237-261 (1985).
- 261.- SCHWARTZ, R.H.  
Acquisition of immunologic self-tolerance.  
Cell, 57: 1073-1081 (1989).
- 262.- SERVENIUS, B.; RASK, L.; PETERSON, P.A.  
Class II genes of the human major histocompatibility complex.  
J. Biol. Chem., 262: 8759-8763 (1987).

263.- SETTE, A.; BUUS, S.; COLON, S.; SMITH, J.A.; MILES, C.; GREY, H.M.

Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells.  
Nature, 328: 395-399 (1987).

264.- SEVACH, E.M.; ROSENTHAL, A.S.

Function of macrophages in antigens recognition by guinea pig T lymphocytes. II: Role of the macrophage in the regulation of genetic control of immune system.  
J. Exp. Med., 138: 1213 (1973).

265.- SHACKELFORD, D.A.; KAUFMAN, J.F.; KORAN, A.J.; STROMINGER, J.L.

HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulation, gene cloning and function.  
Immunol. Rev., 66: 133 (1982).

266.- SHACKELFORD, D.A.; STROMINGER, J.L.

Analysis of the oligosaccharides on the HLA-DR and DC1 B cell antigens.  
J. Immunol., 130: 274-282 (1983).

267.- SHAW, S.; JOHNSON, A.; SHEARER, G.

Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulates secondary allogeneic proliferative and cytotoxic responses.  
J. Exp. Med., 152: 565-580 (1980).

268.- SHEEHY, M.; SONDEL, P.; BACH, M.; WANK, R.; BACH, F. HLA LD (lymphocyte defined) typing: a rapid assay with primed lymphocytes.  
Science, 188: 1308-1310 (1975).

269.- SHERMAN, P.A.; BASTA, P.V.; TING, J.P.-Y.

Upstream DNA sequences required for tissue-specific expression of the HLA-DR $\alpha$  gene.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84: 4254-4258 (1987).

270.- SHERMAN, P.A.; BASTA, P.V.; HEGUY, A.; WLOCH, M.K.; ROEDER, R.G.; TING, J.P.-Y.

The octamer motif is a B-lymphocyte-specific regulatory element of the HLA-DR $\alpha$  gene promoter.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 6739-6743 (1989).

271.- SHOWS, T.B.; ALPER, C.A.; BOOTSMA, D.; et al.

International system for human gene nomenclature, 1979.  
Cytogenet. Cell. Genet., 25: 96-116 (1979).

272.- SILVER, J.; FERRONE, S.

Structural polymorphism of human DR antigens.

Nature, 279: 436 (1979).

273.- SINHA, A.A.; BRAUTBAR, C.; SZAFAER, F.; FRIEDMANN, A.; TZFONI, E.; TODD, J.A.; STEINMAN, L.; McDEVITT, H.O. A newly characterized HLA DQ $\beta$  allele associated with Pemphigus vulgaris. Science, 239: 1026-1029 (1988).

274.- SMITH, W.I.; RABIN, B.S.; HUELLMANTEL, A.; VAN THIEL, D.H.; DRASH, A. Immunopathology of juvenile-onset diabetes mellitus. I. IgA deficiency and juvenile diabetes. Diabetes, 27: 1092-1097 (1978).

275.- SNELL, G.D. Methods for the study of histocompatibility genes. J. Genet., 49: 87-108 (1948).

276.- SNELL, G.D. Histocompatibility genes of the mouse. II. Production and analysis of isogenic resistant lines. J. Nat. Cancer Inst., 21: 843 (1958).

277.- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98: 503-517 (1975).

278.- SPIES, T.; SORRENTINO, R.; BOSS, J.; OKADA, K.; STROMINGER, J. Structural organization of the DR subregion of the human major histocompatibility complex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82: 5165-5169 (1985).

279.- SPIES, T.; BRESNAHAN, M.; BAHRAM, S.; ARNOLD, D.; BLANCK, G.; MELLINS, E.; PIOUS, D.; DeMARS, R. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. Nature, 348: 744-747 (1990).

280.- SPRENT, J.; LO, D.; GAO E.-K.; RON, Y. T cell selection in the thymus. Immunol. Rev., 101: 173-190 (1988).

281.- SPRINGER, T.; STROMINGER, J.L. Detergent-soluble HLA antigens contain a hydrophylic region at the COOH-terminus and a penultimate hydrophobic region. Proc. Acad. Sci. U.S.A., 73: 2481 (1976).

- 282.- SPRINGER, T.A.; KAUFFMAN, J.F.; TERHORST, C.; STROMINGER, J.L.  
Purification and structural characterisation of human HLA-linked B cell antigens.  
*Nature*, 268: 213-218 (1977).
- 283.- STEIMLE, V.; HINKKANEN, A.; SCHLESIER, M.; EPPLER,  
J.T.  
A novel HLA DR $\beta$ 1 sequence from the DRw11 haplotype.  
*Immunogenetics*, 28: 208-210 (1988).
- 284.- STEINMETZ, M.; HOOD, L.  
Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man.  
*Science*, 222: 727 (1983).
- 285.- STERKERS, G.; ZELISZEWSKI, D.; FREIDEL, A.C.; GEBUHRER, L.; BETUEL, H.; LEVY, J.P.  
Both HLA-DR and HLA-DQ determinants contribute to HLA-Dw typing.  
*Hum. Immunol.*, 20: 233-247 (1987).
- 286.- STOFFLET, E.S.; KOEBERL, D.D.; SARKAR, G.; SOMMER,  
S.S.  
Genomic amplification with transcript sequencing.  
*Science*, 239: 491-494 (1988).
- 287.- STRACHAN, T.  
Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens.  
*Br. Med. Bull.*, 43: 1-14 (1987).
- 288.- STROMINGER, J.L.; CHESS, L.; HERRMAN, H.C.; HUMPHREYS, R.E.; HALENKA, D.; HANN, D.; Mc DUNE, J.M.; PARHAM, P.; ROBB, R.; SPRINGER, T.A.; TERHOST, C.  
Isolation of histocompatibility antigens and of several B cell specific proteins from cultured human lymphocytes.  
*Histocompatibility Testing 1975*. Ed. F.Kissmeyer-Nielsen.  
Munksgaard, Copenhagen; pág. 719-730 (1975).
- 289.- STROMINGER, J.L.; ORR, H.T.; ROBB, R.J.; PARMAN, P.; PLOEGT, H.L.; HANN, D.L.; BILOFSKY, M.; SAROFF, H.A.; WU, T.T.; KABAT, E.A.  
Homology of amino acids in human histocompatibility antigens (HLA-A and HLA-B) with those in immunoglobulins.  
*Scan. J. Immunol.*, 11: 573 (1980).
- 290.- STROMINGER, J.L.  
The  $\tau\delta$  T cell receptor and class Ib MHC-related proteins:  
enigmatic molecules of immune recognition.  
*Cell*, 57: 895-898 (1989).

- 291.- SUTTON, V.; KIENZLE, E.K.; KNOWLES, R.W.  
An altered splice site is found in the DRB4 gene that is  
not expressed in HLA DR7 Dw11 individuals.  
*Immunogenetics*, 29: 317-322 (1989).
- 292.- SVEJGAARD, A.; PLATZ, P.; RYDER, L.P.  
HLA and disease -a survey-.  
*Immunol. Rev.*, 70: 193-218 (1983).
- 293.- SVEJGAARD, A.  
HLA and disease.  
*Clinical Laboratory Immunology*. Editores: N.R. Rose; H.  
Friedman; J.L. Fahey. American Society for Microbiology.  
Washington, 1986. Pág. 912-920.
- 294.- SWAIN, S.L.  
T cell subsets and the recognition of MHC class.  
*Immunol. Rev.*, 74: 129-142 (1983).
- 295.- TAKETANI, S.A.; KRANGEL, M.S.; SPITS, H.; DeVRIES,  
J.; STROMINGER, J.L.  
Structural analysis of HLA-B7 antigen variant detected by  
cytotoxic T lymphocytes.  
*J. Immunol.*, 133: 816-821 (1984).
- 296.- TEISBERG, P.; OLAISEN, B.; JONASSEN, R.; GEDDE-DAHI,  
T.; THORSBY, E.  
The genetic polymorphism of the fourth component of human  
complement: methodological aspects and presentation of  
linkage and association date relevant to its localization  
in the HLA region.  
*J. Exp. Med.*, 146: 1380 (1977).
- 297.- TEYTON, L.; O'SULLIVAN, D.; DICKSON, P.W.; LOTTEAU,  
V.; SETTE, A.; FINK, P.; PETERSON, P.A..  
Invariant chain distinguishes between the exogenous and  
endogenous antigen presentation pathways.  
*Nature*, 348: 39-44 (1990).
- 298.- TIEBER, V.L.; ABRUZZINI, L.F.; DIDIER, D.K.;  
SCHWARTZ, B.D.; ROTWEIN, P.  
Complete characterisation and sequence of an HLA class II  
DR beta chain cDNA from the DR5 haplotype.  
*J. Biol. Chem.*, 261: 2738-2742 (1986).
- 299.- TIERCY, J.-M.; GORSKI, J.; BETUEL, H.; FREIDEL,  
A.C.; GEBUHRER, L.; JEANNET, M.; MACH, B.  
DNA typing of DRw6 subtypes: correlation with DRB1 and  
DRB3 allelic sequences by hybridisation with  
oligonucleotide probes.  
*Hum. Immunol.*, 24: 1-14 (1989).

- 300.- TIERCY, J-M; JEANNET, M.; MACH, B.  
A new HLA-DR $\beta$ 1 allele within the DRw52 supertypic specificity (DRw13-HAG): sequencing and direct identification by oligonucleotide typing.  
*Eur. J. Immunol.*, 20: 237-241 (1990).
- 301.- TING, J.; CARRINGTON, M.; SALTER, S.; DeMARS, R.; CRESSWELL, P.  
Evidence for chromatin structure as a regulatory determinant in HLA-DR  $\alpha$  gene expression.  
*Immunogenetics*, 22: 571 (1985).
- 302.- TODD, J.A.; BELL, J.I.; McDEVITT, H.O.  
HLA-DQ $\beta$  gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus.  
*Nature*, 329: 599-604 (1987).
- 303.- TODD, J.A.; ACHA-ORBEA, H.; BELL, J.I.; CHAO, N.; FRONEK, Z.; JACOB, C.O.; McDERMOTT, M.; SINHA, A.A.; TIMMERMAN, L.; STEINMAN, L.; McDEVITT, H.O.  
A molecular basis for MHC associated autoimmunity.  
*Science*, 240: 1003-1009 (1988).
- 304.- TONNELLE, C.; DeMARS, R.; LONG, E.O.  
DOB, a new D chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression.  
*EMBO J.*, 4: 2839-2847 (1985).
- 305.- TOWNSEND, A.R.M.; GOTCH, F.M.; DAVEY, J.  
Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein.  
*Cell*, 42: 457-467 (1985).
- 306.- TOWNSEND, A.R.M.; BAHADUR, G.; WRAITH, D.; McMICHAEL, A.J.  
The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides.  
*Cell*, 44: 959 (1986).
- 307.- TOWNSEND, A.; OHLIN, C.; BASTIN, J.; LJUNGGREN, H-G.; FOSTER, L.; KARRE, K.  
Association of class I major histocompatibility heavy and light chain induced by viral peptides.  
*Nature*, 340: 443-448 (1989).
- 308.- TROWSDALE, J.; KELLY, A.  
The human HLA class II  $\alpha$  chain gene DZ $\alpha$  is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions.  
*EMBO J.*, 4: 2231-2237 (1985).

309.- TROWSDALE, J.; YOUNG, J.A.T.; KELLY, A.P.; AUSTIN P.J.; CARSON, S.; MEUNIER, H.; SO, A.; ERLICH, H.A.; SPIELMAN, R.S.; BODMER, J.; BODMER, W.F.  
Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region.  
*Immunol. Rev.*, 85: 5-43 (1985).

310.- TROWSDALE, J.; HANSON, I.; MOCKFIDGE, I.; BECK, S.; TOWNSEND, A.; KELLY, A.  
Sequences encoded in the class II region of MHC related to the ABC superfamily of transporters.  
*Nature*, 348: 741-744 (1990).

311.- TSANG, S.Y.; NAKANISHI, M.; PETERLIN, B.M.  
A mutational analysis of the DRA promoter: cis-acting sequences and trans-acting factors.  
*Mol. Cell. Biol.*, 10: 711-719 (1990).

312.- TYZZER, E.E.  
A study of inheritance in mice with reference to their susceptibility to transplantable tumours.  
*J. Med. Res.*, 21: 519 (1909).

313.- UNANUE, E.R.  
Antigen-presenting function of the macrophage.  
*Ann. Rev. Immunol.*, 2: 395-428 (1984).

314.- UNANUE, E.R.; ALLEN, P.M.  
The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells.  
*Science*, 236: 551 (1987).

315.- URYU, N.; MAEDA, M.; OTA, M.; TSUJI, K.; INOKO, H.  
A simple and rapid method for HLA-DRB and -DQB typing by digestion with allele specific restriction endonucleases.  
*Tissue Antigens*, 35: 20-31 (1990).

316.- VIDOVIC, D.; ROGLIC, M.; McCUNE, K.; GUERDE, S.; MCKAY, C.; DEMBIC, Z.  
Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a T<sub>8</sub> T-cell hybridoma.  
*Nature*, 340: 646-650 (1989).

317.- VITETTA, E.S.; CAPRA, J.D.  
The protein products of the murine 17th chromosome: genetics and structure.  
*Adv. Immunol.*, 26: 147 (1978).

318.- WAKE, C.T.; LONGH, E.O.; MACH, B.  
Allelic polymorphism and complexity of the genes for HLA-DR  $\beta$ -chains. Direct analysis by DNA-DNA hybridization.  
*Nature*, 300: 372-374 (1982).

- 319.- WALLNY, H.J.; RAMMENSEE, H.G.  
Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide.  
*Nature*, 343: 275-278 (1990).
- 320.- WANK, R.; SCHENDEL, D.J.; HAUSEN, J.A.; DUPONT, B.  
The lymphocyte reestimulation system: evaluation by intra HLA-D group priming.  
*Immunogenetics*, 6: 107-115 (1975).
- 321.- WARREN, M.K.; VOGEL, S.N.  
Opposing effects of glucocorticoids on interferon- $\gamma$ -induced murine macrophage Fc receptor and Ia antigen expression.  
*J. Immunol.*, 134: 2462-2469 (1985).
- 322.- WILLIAMS, A.F.; BARCLAY, A.N.  
The immunoglobulin superfamily: domains for cell surface recognition.  
*Ann. Rev. Immunol.*, 6: 381-405 (1988).
- 323.- WINCHESTER, R.I.; HJ, S.M.; WERNER, P.; KUNKEL, H.G.; DUPONT, B.; JERSILD, C.  
Recognition by pregnancy serum of non-HLA alloantigens selectively expressed on B lymphocytes.  
*J. Exp. Med.*, 141: 924 (1975).
- 324.- WINCHESTER, R.I.; KUNKEL, H.G.  
The human Ia system.  
*Adv. Immunol.*, 28: 221 (1979).
- 325.- WOOD, W.I.; GITSCHEDE, J.; LASKY, L.A.; LAUN, R.M.  
Base composition-independent hybridization in tetramethyl ammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82: 1585-1588 (1985).
- 326.- WU, S.; SAUNDERS, T.L.; BACH, F.H.  
Polymorphism of human Ia antigen generated by reciprocal intergenic exchange between two DR $\beta$  loci.  
*Nature*, 324: 676-679 (1986).
- 327.- YAMAMOTO, R.; SCHAFER, R.; FRANCKE, U.; KOCH, N.; LAUER, W.; DOBBERSTEIN, B. SCHAFER, R.; HAMMERLING, G.S.  
The gene encoding the Ia associated invariant chain is located on chromosome 18 in the mouse.  
*Immunogenetics*, 21: 83 (1985).
- 328.- YANAGI, Y.; YOSHIVAI, Y.; LEGGETT, K.; CLARK, S.P.; ALEKSANDER, I.; MAK, T.W.  
A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains.

Nature, 309: 145-149 (1984).

329.- OYAMA, K.; NATHESON, S.G.  
Intramolecular organization of class I H-2 MHC antigens:  
Localization of the alloantigenic determinants and the  $\beta$ 2m  
binding site to different regions of the H-2k  
glycoprotein.  
J. Immunol., 135: 1419 (1983).

330.- YOUNG, J.; TROWSDALE, J.  
A processed pseudogene in an intron of the HLA DP $\beta$ 1 gene  
is a member of the ribosomal protein L32 gene family.  
Nuc. Ac. Res., 13: 8883-8891 (1985).

331.- YUNIS, E.J.; PLATE, M.; WARD, F.E.; SEIGLER, H.F.;  
AMOS, D.B.  
Anomalous MLR responsiveness among siblings.  
Transpl. Proc., 3: 118-126 (1971).

332.- ZIJLSTRA, M.; BIX, M.; SIMISTER, N.E.; LORING, J.M.;  
RAULET, D.H.; JAENISCH, R.  
 $\beta$ -2 microglobulin deficient mice lack CD4+ cytolytic  
cells.  
Nature, 344: 742-746 (1989).

333.- ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C.  
Restriction of in vitro T-cell mediated cytotoxicity in  
lymphocyte choriomeningitis within a syngeneic or semi-  
allogenic system.  
Nature, 248: 701 (1974).