



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Τσακρής MD, PhD, FRCPath

Διδακτορική Διατριβή

**ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΜΙΣΑ
ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

Βασίλειος Μπίρτσας, M.Sc.
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

ΑΘΗΝΑ, 2021

Τά ἀγαθὰ κόποις κτῶνται
Ἠθικά Νικομάχεια
Αριστοτέλης

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Όνοματεπώνυμο υποψήφιου: Βασίλειος Μπίρτσας M.Sc.

Ημερομηνία κατάθεσης Αίτησης: 8-9-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 3-11-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής

Βασιλική Γεννηματά, Ομ. Καθηγήτρια

Ιωάννης Ρούτσιας, Επίκουρος Καθηγητής

Τίτλος: ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΜΙΣΑ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Ημερομηνία κατάθεσης θέματος: 21-1-2010

Ημερομηνία κατάθεσης α΄ προόδου: 1-3-2019

Ημερομηνία κατάθεσης β΄ προόδου: 13-12-2019

Ημερομηνία κατάθεσης γ΄ προόδου: 17-2-2020

Ημερομηνία Υποβολής Πρότασης Ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 31-3-2021

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 6-4-2021

Μέλη Επταμελούς εξεταστικής Επιτροπής:

- 1) Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής
- 2) Βασιλική Γεννηματά, Ομ. Καθηγήτρια
- 3) Ιωάννης Ρούτσιας, Επίκουρος Καθηγητής
- 4) Γεωργία Βρυώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
- 5) Κλειώ Αναστασοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
- 6) Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Αναπληρώτης Καθηγητής
- 7) Θεόδωρος Πιτταράς, Επίκουρος Καθηγητής



Το άγαλμα του Ιπποκράτη που βρίσκεται στο προαύλιο της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. (Φωτ. Προσωπικό αρχείο)

Ο Ὀρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωὔτεου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῶσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπί τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ ὄ ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρεὶ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῶρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιπορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Βιογραφικό Σημείωμα
(επικαιροποίηση Αύγουστος 2020)

1. ΠΤΥΧΙΟ

Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων
Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, ΤΕΙ Αθήνας
Ημερομηνία κτήσης: 14-10-1998

2. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ

M.Sc. in Transfusion and Transplantation Sciences
Faculty of Medicine, UNIVERSITY OF BRISTOL
Ημερομηνία απονομής: 18-10-2001 Σπουδές με υποτροφία ΙΚΥ
Αναγνώριση Ισοτιμίας ΔΙΚΑΤΣΑ (νυν ΔΟΑΤΑΠ) 29-108/17-7-2002

3. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

ΕΘΝΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (ΕΟΦ)

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων
Απρίλιος 2003 έως Σήμερα

Νοσοκομείο «ΕΡΡΙΚΟΣ ΝΤΥΝΑΝ», Τμήμα Αιμοδοσίας
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων
Νοέμβριος 2001 έως Μάρτιος 2003

Περιφερικό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ. Γεννηματάς», Ανοσολογικό
Εργαστήριο – Μονάδα Ειδικών Λοιμώξεων
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων
Νοέμβριος 1999 έως Οκτώβριος 2000

Περιφερικό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ», Αιμοδοσία
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων
Δεκέμβριος 1998 έως Ιούνιος 1999

Ινστιτούτο Μονοκλωνικών Αντισωμάτων
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων
Οκτώβριος 1998 έως Δεκέμβριος 1998

ΟΕΕΚ – ΙΕΚ ΑΙΓΑΛΕΩ

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων (καθηγητής μικροβιολογίας)
Οκτώβριος 1999 έως Ιούνιος 2000

4. ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

ΤΕΙ Αθήνας - ΙΔΒΕ

Πρόγραμμα δια βίου εκπαίδευσης «Στατιστική Ανάλυση μέσω SPSS &
Μεθοδολογία Ερευνητικής Εργασίας στις Επιστήμες Υγείας.
Νοέμβριος 2016 ως Δεκέμβριος 2016. Σύνολο ECTS (4)

Δρακοπούλειο Κέντρο Αιμοδοσίας
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων (Εξάμηνο Εξειδίκευσης Αιμοδοσίας).
Απρίλιος 2009 ως Οκτώβριος 2009

Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ)
Εξουσιοδοτημένος υπεύθυνος υπογραφής για το Μικροβιολογικό Εργαστήριο
ΕΟΦ, από Διαπίστευση ΕΣΥΔ

5. ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΣΕ ΙΔΡΥΜΑΤΑ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ) Αθήνας, Τμήμα Ιατρικών
Εργαστηρίων

Εργαστηριακός Συνεργάτης (Στα μαθήματα: Αιμοδοσία, Αιματολογία Ι,
Αιματολογία ΙΙ, Αιματολογία ΙΙΙ, Τεχνικές λήψης Βιολογικών Υγρών. Επίβλεψη
πτυχιακών εργασιών. Συμμετοχή σε τριμελείς επιτροπές πτυχιακών)
Οκτώβριος 2006 έως Φεβρουάριος 2018. Με εξάμηνες συμβάσεις

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Εργαστηριακός Συνεργάτης, Φεβρουάριος 2018 Ιούλιος 2018 και
Ακαδημαϊκός Υπότροφος και Φεβρουάριο 2020 έως Ιούνιος 2020

6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

6.1 Σε επίσημα περιοδικά αναγνωρισμένου κύρους με κριτές
Heart valve cryopreservation: protocol for addition of dimethyl sulphoxide and
amelioration of putative amphotericin B toxicity, V. Birtsas and W. J. Armitage,
Cryobiology, 2005, Vol 50, σ. 139-143

6.2 Σε πρακτικά συνεδρίων με κριτές
MICA gene allelic diversity and MICA/HLA-B haplotypic variation in Greek
population, November 2009, Human Immunology 70, Authors: Maria
Spyropoulou-Vlachou, Melina Dinou, Vasilios Mpirtsas, Elissavet Kondou,
Vasiliki Vrani, Alike Iniotaki

Frequency of HLA-DP and MICA antibodies in hyperimmunized renal
transplant candidates, May 2009 Tissue Antigens, Conference: 23rd
European Immunogenetics and Histocompatibility Conference Volume: 73,
Authors: Angeliki G. Vittoraki, Maria D. Apostolaki, Elisavet N. Kontou,
Vasilios P. Mpirtsas, Petroula G. Stravoskoufi, Sofia I. Ioannou, Maria S.
Spyropoulou-Vlachou, Alike G. Iniotaki

Ανίχνευση παραχθέντων De novo ειδικών στο μόσχευμα HLA αντισωμάτων
A. Ινιωτάκη, Ι. Ντόκου, Μ. Αποστολάκη, Σ. Μαρινάκη, Ε. Θεοδωροπούλου, B.
Μπίρτσας, Α. Σταυροπούλου – Γκιοκά, Α. Κωστάκης, Ι Μπολέτης.,
Μεταμόσχευση Οργάνων και Ιστών, 2007, Vol 12, Suppl., σ. 15

Graft specific alloreactivity and clinical status of renal transplant recipients., A.
Iniotaki – Theodoraki, P. Douramani, N. Giapraka, V. Birtsas, V. Filiopoulos,
A. Kostakis, C. Stavropoulos – Giokas, J.N. Boletis, Transplantation, 2004,
Vol 78, Number 2, 166

Ανίχνευση ειδικής κυτταρικής και χυμικής αλλοαπάντησης σε λήπτες νεφρικού
μοσχεύματος. Ινιωτάκη-Θεοδωράκη Α., Ντουραμάνη Π., Γιαπράκα Ν.,
Μπίρτσας Β., Φιλιόπουλος Β., Κωστάκης Α., Σταυροπούλου-Γκιοκά Αικ.,
Μπολέτης Ι.Ν., 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, 2004, Βιβλ. Περ. σελ.
85

Ειδική αλλοαπάντηση σε λήπτες νεφρικού μοσχεύματος υπό συγκεκριμένη ανοσοκαταστολή και πορεία της μεταμόσχευσης., Ντουραμάνη Π., Ινιωτάκη-Θεοδωράκη Α., Γιαπράκα Ν., Μπίρτσας Β., Κωστάκης Α., Μπολέτης Ι.Ν., Σταυροπούλου-Γκιόκα Αικ., 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταμοσχεύσεων, 2003, Βιβλ. Περ. σελ. 35

7. ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Μέλος της συντακτικής - μεταφραστικής ομάδας της Ελληνικής Φαρμακοποιίας, έκδοση Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων 2009

8. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

«Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας στο Εργαστήριο» θέμα εισήγησής: «Διαπίστωση Αιμοδοσίας και ο ρόλος του Τεχνολόγου Ιατρικών Εργαστηρίων», Βασίλης Μπίρτσας, 29^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 1-4 Νοεμβρίου 2018, ομιλητής σε στρογγυλό τραπέζι

“Μικροβιολογικός έλεγχος ποιότητας σε γενόσημα φάρμακα”, Σ. Γαζή, Β. Μπίρτσας “ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΟΥ ΕΟΦ”, Αθήνα, 4 Νοεμβρίου 2017

Επίπεδα πρωτεΐνης Z σε ασθενείς με συνδυασμένη θρομβοεμβολική νόσο. Παύλου Ε, Καπελέρη Χ, Φόρτσα Π, Σιουμάλα Μ, Ντελίκου Σ, Μπέλλια Μ, Απέργης Γ, Τσεβρένης Β, Μπίρτσας Β. Θεοδοσιάδης Γ, Κριεμπάρδης Α. (2015) 25ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη. Haema, 5(1):208-9

«Επίπεδα παράγοντα VIII κατά τη διάρκεια κύησης σε γυναίκες με χορήγηση και μη χαμηλής μοριακού βάρους ηπαρίνης» Χ.Λοκόση, Ρ.Μπρεγκο, Μ.Σιουμάλα, Π.Χαραλάμπους, Γ.Απέργης, Μ.Μπέλλια, Π.Δρόσος, Β.Μπίρτσας, Α.Κριεμπάρδης, Ε.Παύλου. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, 21-23 Μαΐου 2015, Ελεύθερη Ανακοίνωση

«Επίπεδα πρωτεΐνης Z σε ασθενείς με θρομβωτικά επεισόδια και φυσιολογικό έλεγχο θρομβοφιλίας» Π.Φόρτσα, Χ.Καπελέρη, Σ.Ντελίκου, Μ.Σιουμάλα, Μ.Μπέλλια, Γ.Απεργής, Κ.Μαραγκός, Β.Μπίρτσας, Ε.Νομικού, Π.Δρόσος, Α.Κριεμπάρδης, Ε.Παύλου. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, 21-23 Μαΐου 2015, Ελεύθερη Ανακοίνωση

«Επίπεδα πρωτεΐνης Z σε ασθενείς με συνδυασμένες θρομβωτικές διαταραχές» Χ.Καπελέρη, Π.Φόρτσα, Σ.Ντελίκου, Μ.Σιουμάλα, Μ.Μπέλλια, Γ.Απέργης, Β.Μπίρτσας, Ε.Νομικού, Π.Δρόσος, Α.Κριεμπάρδης, Ε.Παύλου, 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, 21-23 Μαΐου 2015, Αναρτημένη Ανακοίνωση

HLA τάξης II ασύμβατα αντιγόνα στη μεταμόσχευση νεφρού: ανοσολογικός κίνδυνος για την ανάπτυξη χυμικής αλλοαπάντησης. Ι.Σ. Ντόκου, Σ. Μαρινάκη, Μ. Αποστολάκη, Χ. Μπαλάσκα, Β. Μπίρτσας, Α. Ινιωτάκη, Ι. Μπολέτης. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας Αθήνα, Ιούνιος 2008

Νεότερες εξελίξεις στη μελέτη της HIV λοίμωξης με Κυτταρομετρίας Ροής. B. Μπίρτσας, 5η Πανελλήνια ημερίδα επιστημονικών και επαγγελματικών θεμάτων Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, Θεσσαλονίκη, 1 Δεκεμβρίου 2007

Ο Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων στην Ευρώπη. B. Μπίρτσας, 4η Πανελλήνια επιστημονική διημερίδα ΠΕΤΙΕ, Αθήνα, 24-25 Νοεμβρίου 2006

Δυνατότητες για μεταπτυχιακές σπουδές. B. Μπίρτσας, 4η Πανελλήνια επιστημονική διημερίδα ΠΕΤΙΕ, Αθήνα, 24-25 Νοεμβρίου 2006

Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής στον έλεγχο ασθενών με HIV λοίμωξη. B. Μπίρτσας, 3η Πανελλήνια επιστημονική και επαγγελματική ημερίδα Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, Θεσσαλονίκη 12 Νοεμβρίου 2005

Ευκαιρίες και δρόμοι για Μεταπτυχιακές σπουδές. B. Μπίρτσας, 3η Πανελλήνια επιστημονική και επαγγελματική ημερίδα Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, Θεσσαλονίκη 12 Νοεμβρίου 2005

De novo production of HLA class II donor specific antibodies following renal transplantation. A. Iniotaki – Theodoraki, J.N. Boletis, P. Douramani, E. konstantinidou, G. Trigas, V. Birtsas, A. Kostakis, C. Stavropoulos – Giokas. Visuals of the European Clinical Histocompatibility Workshop 2002, Berlin, Germany. 26-30/6/2002, p 29-31

9. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ (Proficiency και Μεταπτυχιακός τίτλος Βρετανικού Πανεπιστημίου).

10. ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

Υπότροφος από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) 2000 – 2001, για πραγματοποίηση μεταπτυχιακών σπουδών στο Εξωτερικό (Ηνωμένο Βασίλειο)

11. ΑΛΛΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

Μέλος σε επιστημονικές Εταιρείες
Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας
Ελληνική Εταιρεία Μελέτης και Αντιμετώπισης AIDS
Πανελλήνια Ένωση Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων (ΠΕΤΙΕ) – Μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου περιόδου 2018 – 2020
Συνδικαλιστική Ένωση Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων Ελλάδος (ΣΕΤΙΕΕ) - Ιδρυτικό μέλος

Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής στο 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων και 1ο Επιστημονικό Συμπόσιο Βιοϊατρικών Εργαστηριακών Επιστημών, Αθήνα, 29-31 Μαρτίου 2019

Μέλος Επιστημονικής Επιτροπής και Επιτροπής Κρίσης Υποτροφίας στο 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, Αθήνα 21-23 Μαΐου 2015

Μέλος Επιστημονικής Επιτροπής Regional European Biomedical Laboratory Science Congress RBSC2013, Αθήνα 5-7 Δεκεμβρίου 2013

Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής στην 5η Πανελλήνια επιστημονική και επαγγελματική ημερίδα Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, Θεσσαλονίκη 1-12-2007

Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής στην 4η Πανελλήνια επιστημονική και επαγγελματική ημερίδα Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, Αθήνα, 24 & 25-11-2006

Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής στην 3η Πανελλήνια επιστημονική και επαγγελματική ημερίδα Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων, Θεσσαλονίκη 12-11-2005

Παρακολούθηση συνεδρίων, εκπαιδευτικών σεμιναρίων, ημερίδων επιστημονικών εταιρειών και φορέων σε θέματα Αιματολογίας - Αιμοδοσίας, AIDS, Ανοσολογίας, κυτταρομετρίας ροής, μικροβιολογίας Φαρμάκων κ.ά.

Πρόλογος

Ο καταστροφικός ρόλος των HLA αντισωμάτων απέναντι σε αλλομοσχεύματα, που περιγράφηκε πριν τουλάχιστον τέσσερις δεκαετίες και στη συνέχεια αμφισβητήθηκε, έχει επανακτήσει τη σημασία του τα τελευταία χρόνια.

Σήμερα είναι γνωστό ότι HLA -A, -B, -Cw, -DR και -DQ αντισώματα παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση με την απόρριψη αλλομοσχεύματος.

Τα αντιγόνα MICA περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1994 σαν μία νέα οικογένεια πολυμορφικών μορίων των οποίων τα γονίδια κωδικοποιούνται στον HLA-B τόπο στο χρωμόσωμα 6. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν MICA στην επιφάνεια τους και είναι γνωστό ότι τα αντιγόνα αυτά μπορεί να είναι στόχοι χυμικής και κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης.

Η έρευνα, που σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας - Ανοσολογικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Γ. Γεννηματάς», είχε σκοπό τον καθορισμό της συχνότητας των πολυμορφισμών των MICA αλληλομόρφων στον ελληνικό πληθυσμό. Τα HLA τάξης I και II έχουν μελετηθεί και αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό. Αντίθετα η βιβλιογραφία για τα MICA είναι περιορισμένη, ενώ στον ελληνικό πληθυσμό στοιχεία μέχρι τώρα ήταν ελάχιστα.

Από το ξεκίνημα της προσπάθειας αυτής είχα τη στήριξη και τη βοήθεια πολλών ατόμων, που με τον τρόπο του ο καθένας είχε μερίδιο συμβολής στην ολοκλήρωση της προσπάθειας. Τους ευχαριστώ πολύ όλους, ιδιαίτερα όμως θα ήθελα να αναφερθώ στους παρακάτω.

Τον Καθηγητή Μικροβιολογίας και αντιπρύτανη του Ε.Κ.Π.Α. κ. Αθανάσιο Τσακρή που ως επιβλέπων τη διατριβή, πάντα καθοδηγούσε την πορεία μου με τις εύστοχες επισημάνσεις του, με ευγένεια και προσήνεια. Μου έδωσε την ευκαιρία για μάθηση και νέα γνώση. Παρόλο που ήταν πάντοτε απασχολημένος με πολλά πράγματα, ποτέ δεν αρνήθηκε να μου διαθέσει χρόνο.

Την Καθηγήτρια κ. Βασιλική Γεννηματά, ευχαριστώ θερμά, για τις πολύτιμες συμβουλές της και την ανταλλαγή απόψεων.

Ευχαριστίες επίσης οφείλονται στον Επ. Καθηγητή κ. Ιωάννη Ρούτσια, του οποίου ακολουθούσα τις προτροπές και μελετούσα τα σχόλια και τις παρατηρήσεις του.

Μεγάλη ήταν η βοήθεια που μου προσέφερε από το ξεκίνημα της προσπάθειας η κ. Αλίκη Ινωτάκη, Επιμελήτρια τότε και αργότερα Συντονίστρια Διευθύντρια στο Εθνικό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας - Ανοσολογικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Γ. Γεννηματάς». Οι γνώσεις της και η συσσωρευμένη εμπειρία της ήταν σύμβουλος της πορείας μου. Πάντοτε βρισκόταν δίπλα μου, καθοδηγώντας με σε κάθε στάδιο μέχρι την ολοκλήρωση της προσπάθειας και την ευχαριστώ θερμότατα.

Εξίσου σημαντικός ήταν και ο ρόλος της κ. Μαρίας Σπυροπούλου-Βλάχου, Συντονίστριας Διευθύντριας του Τμήματος Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας, ΓΝΑ «Ελενα Βενιζέλου - Αλεξάνδρα» σήμερα, για αυτό και εκφράζω τις ευχαριστίες μου. Οι οδηγίες και κατευθύνσεις της όχι μόνο στη θεωρία αλλά και στο εργαστήριο ήταν πολύτιμες.

Εδώ θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη μνεία στην κ. Αικατερίνη Σταυροπούλου-Γκιόκα νυν Διευθύντρια, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών. Ήταν αυτή που πίστεψε σε εμένα και παρότρυνε άλλους να με στηρίξουν, στην αρχή αυτής της προσπάθειας.

Ξεχωριστή αναφορά αξίζει και το προσωπικό του Ανοσολογικού Εργαστηρίου του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Γ. Γεννηματάς» που με την εμπειρία του με βοήθησε στο εργαστήριο, ιδιαίτερα όμως στη βιολόγο Μελίνα Ντίνου, που ήταν δίπλα μου στο εργαστήριο, συμβάλλοντος με την οργανωτικότητά της στην εφαρμογή στην πράξη της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής και στη θεωρητική προσέγγιση.

Την επ. Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής (ΠΑ.Δ.Α.) κ. Ανθιμία Μπατρίνου, με την οποία αναλύσαμε, τα δεδομένα και γενικά τα ευρήματα της

μελέτης αυτής, ώστε να σχηματισθούν στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται, ευχαριστώ πολύ.

Ο Μέγας Αλέξανδρος αναφέρει για το δάσκαλό του Αριστοτέλη «Στους γονείς μου οφείλω το ζειν, στους δασκάλους μου το ευ ζειν». Θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό, επειδή οι γονείς μου ήταν και δάσκαλοι, κατ' επάγγελμα και λειτούργημα, που καθοδήγησαν στη ζωή τόσο εμένα όσο και τα αδέρφια μου.

Κλείνοντας, να γράψω ένα ακόμα ευχαριστώ σε αυτούς που υποστήριξαν την προσπάθεια μου αυτή και δεν τους ανέφερα ονομαστικά.

Η παρούσα παράγραφος γράφεται μετά την ανάπτυξη – υποστήριξη της διατριβής ενώπιον της επταμελούς επιτροπής, σε ένδειξη ευχαριστίας ξεχωριστά προς καθεμία και καθένα από τις Καθηγήτριες και τους Καθηγητές που αναφέρονται στη σελίδα iv, για τον κόπο και το χρόνο που αφιέρωσαν.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Περίληψη στην Αγγλική (Abstract)	3
Ευρετήριο σχημάτων	5
Ευρετήριο Πινάκων	6
Συντομογραφίες ακρωνύμια Αγγλικά	7
A. Γενικό μέρος	9
Εισαγωγή	10
Φυσική και επίκτητη ανοσία	10
B λεμφοκύτταρα	13
T Λεμφοκύτταρα	13
Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας	15
Ονοματολογία HLA	19
Πολυμορφισμοί HLA	23
Ρόλος HLA.....	25
Μεταμόσχευση.....	25
HLA και συσχέτιση με νοσήματα	26
HLA και νεοπλασίες	27
Test πατρότητας.....	29
HLA και άλλοι συσχετισμοί	29
Major Histocompatibility Complex Class I-related chain A gene MICA	31
Γενετικές πτυχές και βιοχημική δομή	31
Εκφραση γνωρισμάτων (Προφίλ) των πρωτεϊνών MIC	33
Πολυμορφισμοί MICA.....	34
Διμορφισμός MICA-129.....	35
Ανοσιακή απόκριση των MICA.....	37
Αλληλόμορφα MICA και συσχέτιση με ασθένειες	39
MICA γονιδιακή έκφραση και πρωτεϊνική λειτουργία.....	41
Αντισώματα MICA: Σημασία στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων	42
B. Ειδικό μέρος	44
Πρωτόκολλο.....	45
Υλικό.....	46
Μέθοδος.....	47
Στατιστική Ανάλυση.....	51
Αποτελέσματα.....	51
Συζήτηση	56
Συμπεράσματα	65
Βιβλιογραφία.....	68
Παραρτήματα.....	85
I Μέθοδος LABType® SSO προσδιορισμού των Αντιγόνων MICA	85
II Μέθοδος Πυροαλληλούχησης Pyrosequencing.....	104
III Πρωτογενή Αποτελέσματα	107
Δημοσιεύσεις - Παρουσιάσεις	117
I Paper Human Immunology.....	117
II Oral Abstract Transplantation	122

III Abstract, 35 th ASHI Meeting - Human Immunology	123
IV Abstract for Poster Presentation, Tissue Antigens	124

Περίληψη

Περίληψη

Εισαγωγή: Το γονίδιο MICA είναι ένα πολύ πολυμορφικό λειτουργικό γονίδιο που βρίσκεται κοντά στον τόπο HLA-B. Ορισμένα αλληλόμορφα MICA έχουν συσχετιστεί με φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες, ενώ τα αντισώματα MICA έχουν εμπλακεί σε απόρριψη αλλομοσχεύματος οργάνων ή νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD).

Σκοπός: Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να εντοπίσει τις συχνότητες των αλληλόμορφων MICA στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς, όσο γνωρίζουμε, αυτά τα δεδομένα είναι ακόμη περιορισμένα. Τα δεδομένα συσχετίστηκαν με τα HLA-B.

Μέθοδοι: Ελήφθη DNA από 277 μη συγγενείς μεταξύ τους, υγιείς, Καυκάσιους, Έλληνες, εθελοντές δότες Προγονικών Αιμοποιητικών κυττάρων (Stem Cells) Ο γονότυπος MICA* πραγματοποιήθηκε με αντίστροφη PCR-SSOP.

Αποτελέσματα: Συνολικά 18 MICA αλληλόμορφα τυποποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τα πέντε πιο συχνά αλληλόμορφα στον ελληνικό πληθυσμό ήταν MICA*008 (24,6%), MICA*009 (22,36%), MICA 018 (16,03%), MICA*002 (8,02%) και MICA*004 (7,17%) τα οποία συνολικά αντιπροσωπεύουν το 77,8% όλων των αλληλίων. Σε συσχέτιση με τα HLA-B πιο συνηθισμένοι απλότυποι MICA ~ HLA-B που εντοπίστηκαν ήταν οι MICA*018 ~ B*18 (12,5%) και MICA*009 ~ B*51 (11,5%).

Συμπεράσματα: Τα πέντε πιο συχνά αλληλόμορφα MICA στον ελληνικό πληθυσμό ήταν *008, *009, *018, *002, *004. Σε άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς, δύο από αυτά τα αλληλόμορφα (*008 και *004) παρατηρήθηκαν σε παρόμοιες συχνότητες. Το MICA*002 παρατηρήθηκε λιγότερο συχνά (8,02%) στον ελληνικό πληθυσμό σε σύγκριση με άλλες Καυκάσιες ομάδες (συχνότητες > 15%). Επίσης, τα MICA*009 και MICA*018 είχαν αυξημένες

συχνότητες (πάνω από 15%), ενώ σε άλλους πληθυσμούς βρέθηκαν περίπου 10% ή λιγότερο. Αυτά τα δεδομένα μπορεί να είναι σημαντικά για την αποσαφήνιση του ρόλου που παίζουν οι πολυμορφισμοί MICA στη μεταμόσχευση οργάνων και βλαστικών κυττάρων και για τον προσδιορισμό της σχέσης ορισμένων MICA με την συσχέτιση με συγκεκριμένες ασθένειες.

Περίληψη στην Αγγλική (Abstract)

Abstract

Introduction: The Major Histocompatibility Complex Class I-related chain A gene (MICA) is a highly polymorphic functional gene located close to the HLA-B locus. Certain MICA alleles have been related to inflammatory and autoimmune diseases while MICA antibodies have been implicated in organ allograft rejection or graft-versus-host disease (GVHD).

Aim: The aim of this study was to identify the frequencies of MICA alleles and MICA ~ HLA-B haplotypes in the Greek population since, as far as we know, these data are still limited.

Methods: DNA was obtained from 277 unrelated healthy Greek individuals of Caucasian origin, volunteer donors of blood stem cells. HLA-B* and MICA* genotyping was performed by reverse PCR-SSOP.

Results: A total of 18 MICA alleles were defined in the present study. The five most frequent alleles in the Greek population were MICA*008 (24.6%), MICA*009 (22.36%), MICA*018 (16.03%), MICA*002 (8.02%) and MICA*004 (7.17%) which altogether account for 77.8% of all alleles. The most common MICA ~ HLA-B haplotypes were MICA*018 ~ B*18 (12.5%) and MICA*009 ~ B*51(11.5%).

Conclusions: The five most frequent MICA alleles in the Greek population were *008, *009, *018, *002, *004. In other Caucasian populations, two of these alleles (*008, and *004) were observed in similar frequencies. MICA*002 was observed less frequently (8.02%) in the Greek population compared to other Caucasian groups (frequencies >15%). Also, MICA*009 and MICA*018 had elevated frequencies (above 15%) whereas in other Caucasian populations they were found around 10% or less. These data may

be important for the elucidation of the role that MICA polymorphisms play in organ and stem cell transplantation and to identify the relation of certain MICA with susceptibility to specific diseases.

Ευρετήριο σχημάτων

- Σχήμα A1. Συνολική άποψη των μορίων MHC τάξης I και II.
- Σχήμα A2. Σημεία δέσμευσης πεπτιδίων.
- Σχήμα A3. Διάγραμμα που εμφανίζεται ο αριθμός των αλληλομόρφων που ονομάζονται ανά έτος
- Σχήμα A4. Απεικόνιση της ονοματολογίας του HLA
- Σχήμα A5. Τα γονίδια του γενετικού τόπου του ανθρώπινου MHC.
- Σχήμα A6. Γονίδια MICA στο χρωμόσωμα 6
- Σχήμα A7. Δομή και ομοιότητες MHC τάξης I και II με MICA.
-
- Σχήμα B1. Εμφανίζονται οι γονιδιακές περιοχές που έγινε pyrosequencing
- Σχήμα B2. Πυρόγραμμα
- Σχήμα B3. Διάγραμμα στο οποίο εμφανίζεται για κάθε χώρα η συχνότητα αλληλόμορφων MICA
- Σχήμα B4. Διάγραμμα στο οποίο εμφανίζεται κάθε συχνότητα αλληλόμορφων MICA ανά χώρα
- Σχήμα B5. Διάγραμμα στο οποίο εμφανίζεται για κάθε χώρα η συχνότητα απλοτύπων MICA* ~ HLA-B
- Σχήμα B6. Διάγραμμα στο οποίο εμφανίζεται κάθε συχνότητα απλοτύπων MICA* ~ HLA-B ανά χώρα

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας A1. HLA και συσχέτιση με νοσήματα

Πίνακας A2. Νεοπλασματικές παθήσεις που σχετίζονται με HLA

Πίνακας B1. Καθορισθέντα MICA αλληλόμορφα

Πίνακας B2. Συνδυασμοί MICA αλληλομόρφων

Πίνακας B3. MICA αλληλόμορφα στον Ελληνικό πληθυσμό, όπως καθορίστηκαν στην παρούσα μελέτη

Πίνακας B4. Τα πέντε πιο κοινά αλληλόμορφα MICA στον ελληνικό πληθυσμό και οι συχνότητές τους σε σχέση με άλλες ομάδες

Πίνακας B5. Κατανομή των πιο κοινών συχνοτήτων απλότυπων MICA* ~ HLA-B* στον ελληνικό πληθυσμό

Πίνακας B6. Οι συσχετιζόμενες συχνότητες των απλότυπων MICA* ~ HLA-B* στον ελληνικό πληθυσμό σε σύγκριση με διάφορους πληθυσμούς

Συντομογραφίες ακρωνύμια Αγγλικά

Παρατίθενται οι σημαντικότερες αγγλικές συντομογραφίες

aGVHD	acute Graft Versus Host Disease	Οξεία νόσος του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή
AMR	Antibody-Mediated Rejection	
APC	Antigen Presenting Cells	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
ATG	Anti-Thymocyte Globulin	Αντι-θυμοκυτταρική σφαιρίνη
AS	ankylosing spondylitis	αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα
BD	Behçet's disease	
CD3	cluster of differentiation 3	
CD4	cluster of differentiation 4	
CD8	cluster of differentiation 8	
cGVHD	chronic Graft Versus Host Disease	Χρόνια νόσος του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή
CRP	C-Reactive Protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes	κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα
DC	Dendritic cells	Δενδριτικά κύτταρα
DNA	Deoxyribonucleic acid	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DSA	Donor Specific Antibodies	αντισώματα ειδικών προς τον δότη
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay	
GVHD	Graft Versus Host Disease	νόσος του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή
HLA	Human Leukocyte Antigens	αντιγόνα των λευκοκυττάρων του ανθρώπου ή HLA αντιγόνα
HSCT	Haemopoietic Stem Cell Transplantation	
Ig	Immunoglobulin	Ανοσοσφαιρίνη
IgA	Immunoglobulin A	
IgD	Immunoglobulin D	
IgE	Immunoglobulin E	

IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IL-4	Interleukin-4
IMGT	THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM®
INF- γ	Interferone- γ
LD	Linkage Disequilibrium Ανισορροπία Σύνδεσης
MHC	Major Histocompatibility Complex Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
MICA	Major Histocompatibility Complex Class I-related chain A gene
MICB	Major Histocompatibility Complex Class I-related chain B gene
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPS	Massively Parallel Sequencing
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Natural Killer cells
NKC	Natural Killer gene Complex
NKG2D	Natural Killer Group 2D κύτταρα φυσικοί φονείς ομάδα 2 μέλος D
PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid, Ριβονουκλεϊκό οξύ
SBT	Sequence-based typing τυποποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μετά από σύνθεση
SNP	Single-nucleotide polymorphisms μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί
SSOP	Sequence-Specific Oligonucleotide Probing
TCR	T-cell Receptor υποδοχέας T-κυττάρων
Th1	T-helper cells βοηθητικά-επαγωγικά κύτταρα
TM	Transmembrane region διαμεμβρανική περιοχή
TNF	Tumor Necrosis Factor
WHO	World Health Organization

A. Γενικό μέρος

Εισαγωγή

Ένα εργαστήριο ανοσολογίας μπορεί να αντιμετωπίσει πολλές και διαφορετικές περιπτώσεις ασθενών και ασθενειών, που ενώ φαίνονται μεταξύ τους ασύνδετες έχουν ένα κοινό παρονομαστή. Αυτός ο κοινός παρονομαστής είναι το αντιγόνο των λευκοκυττάρων του ανθρώπου, ή HLA αντιγόνα (Human Leukocyte Antigens) [1]. Τα HLA αντιγόνα εκφράζονται με διαφορετική κατανομή στην επιφάνεια των περισσότερων εμπύρηνων κυττάρων, καθώς επίσης και στα Ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια [2].

Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC, Major Histocompatibility Complex) υπάρχει σε όλα τα σπονδυλωτά και είναι ένα σύνολο από γονίδια στενά συνδεδεμένα και εξαιρετικά πολύμορφα. Επειδή τα γονίδια είναι στενά συνδεδεμένα, στο σύνολο τους καλούνται σύμπλεγμα. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν την παραγωγή γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες στον άνθρωπο ονομάζονται HLA αντιγόνα (Human Leukocyte Antigens) [3].

Με τον όρο ανοσία, ετυμολογικά προέρχεται από το α (στερητικό) και το νόσος, καλούμε την άμυνα του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων μέσα από κάποιο μηχανισμό. Ειδικότερα, ανοσία είναι η άμυνα του οργανισμού έναντι λοιμώξεων ή η αντίδραση σε κάθε ξένο όπως μικρόβια, ιούς, παράσιτα ή ακόμα μακρομόρια όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Τα κύτταρα και τα μόρια που συμμετέχουν σε αυτήν την αντίδραση αποτελούν το ανοσιακό σύστημα και η συνδυασμένη αντίδραση τους, την οποία συνεπάγεται η επαφή με τις ξένες ουσίες, αποτελεί την ανοσιακή απάντηση [3].

Φυσική και επίκτητη ανοσία

Η ανοσία διαχωρίζεται στη φυσική και την επίκτητη. Στη πρόληψη ανεπιθύμητων παθογόνων, όπως είναι τα βακτήρια, οι ιοί, τα παράσιτα και οι μύκητες από την είσοδο τους στο σώμα και πρόκληση ζημιάς συμβάλλουν διάφορα επίπεδα της άμυνας. Το δέρμα είναι ο πρώτος φραγμός ενάντια στη μόλυνση και όταν διαπερνάται, τα κύτταρα και οι παράγοντες της φυσικής

ανοσίας μπορεί να καταστρέψουν γρήγορα τα παθογόνα. Ο επόμενος φραγμός της άμυνας παρέχεται από την επίκτητη ανοσία, κατά την οποία τα κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν «μνήμη» της πρώτης επαφής τους με το ειδικό αντιγόνο και όταν ξαναεμφανιστεί το ίδιο αντιγόνο πάλι, η ανταπόκριση είναι πιο γρήγορη και αποτελεσματική [4].

Φυσική ανοσία, όπως υποδηλώνει το όνομα της, είναι παρούσα από τη γέννηση και διαρκεί για όλη τη ζωή του ατόμου. Ο όρος μη-ειδική ανοσία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί, όχι μόνο για τη μεσολάβηση κυττάρων για την άμυνα έναντι παθογόνων, αλλά και για τα φυσικά και ανατομικά εμπόδια που έχουν σχεδιαστεί για να αποτρέψουν την είσοδο ενός ξένου οργανισμού στο σώμα. Η πρώτη φυσική άμυνα, που πρέπει να παραβιαστεί από ένα παθογόνο για τη δημιουργία λοίμωξης, είναι οι επιθηλιακές επιφάνειες, όπως το δέρμα, που παρέχει την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι της μόλυνσης με έναν αδιαπέραστο φραγμό. Τα επιθήλια του αναπνευστικού [5], του γαστρεντερικού και ουρογεννητικού [6] είναι πιο ευάλωτα στη λοίμωξη. Είναι γνωστοί ως βλεννογόνοι και συνεχώς καλύπτονται με βλέννα, που εκκρίνεται από το επιθήλιο σχηματίζοντας ένα παχύ στρώμα υγρού που περιέχει γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και ένζυμα που προστατεύουν τα επιθηλιακά κύτταρα και περιορίζουν τις ευκαιριακές λοιμώξεις [7]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων εκκρίσεων είναι τα δάκρυα και το σάλιο που περιέχουν ένζυμα τα οποία έχουν αντιβακτηριδιακές ιδιότητες, όπως η λυσοζύμη [8]. Το όξινο περιβάλλον του στομάχου μπορεί επίσης να εξαλείψει παθογόνα που εισέρχονται από το στόμα [9].

Κύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα (DC), συλλογικά να αναφέρονται ως φαγοκύτταρα, έχουν πρωταρχική λειτουργία του εντοπισμού, της φαγοκυττάρωσης και της λύσης των μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα, μεσολαβούν στην φλεγμονώδη απόκριση. Τα μακροφάγα είναι τα πρώτα φαγοκύτταρα που θα έρθουν σε επαφή με ένα μικροοργανισμό - εισβολέα, εκκρίνουν κυτταροκίνες που προσελκύουν άλλα κύτταρα, όπως τα ουδετερόφιλα στη θέση της μόλυνσης [10]. Τα ουδετερόφιλα είναι εξειδικευμένα για φαγοκυττάρωση των παθογόνων, κινητοποιούνται ταχέως, μπορούν να δράσουν σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και συχνά πεθαίνουν στο σημείο της λοίμωξης δημιουργώντας πύον

[11]. Οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα φαγοκύτταρα μπορεί να επάγουν τοπική διαστολή των τριχοειδών αγγείων και να αλλάξουν τις ιδιότητες πρόσφυσης του αγγειακού επιθηλίου επιτρέποντας φαγοκύτταρα και άλλα λευκά αιμοσφαίρια να δεσμευθούν και να μεταναστεύουν από το αίμα στο φλεγμαίνοντα ιστό [12].

Συμπληρωματικά προς τα φαγοκύτταρα δρουν και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (Natural killer ή NK). Αναγνωρίζουν μολυσμένα κύτταρα και ανταποκρίνονται γρήγορα και άμεσα, σκοτώνοντας τα με την έκκριση των ισχυρών φλεγμονωδών κυτταροκινών που θανατώνουν χωρίς προηγούμενη ενεργοποίηση, εξ ου και ο όρος "Natural Killer". Επιπλέον ενεργοποιούν τα μακροφάγα, ώστε να καταστρέψουν τα φαγοκυτταρωθέντα μικρόβια με την έκκριση ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) [3], [13].

Ένας άλλος μηχανισμός άμυνας είναι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Complement). Το συμπλήρωμα είναι μια ομάδα πρωτεϊνών του πλάσματος που εμπλέκονται σε ενζυμικό καταρράκτη σταδιακής ενεργοποίησης. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι ένας μηχανισμός του ανοσοποιητικού συστήματος, που προκαλεί κυτταρική λύση. Τα διαλυτά μέρη του συμπληρώματος απελευθερώνονται και επιτρέπουν πρόσληψη πρόσθετων φαγοκυττάρων στη περιοχή της φλεγμονής με ενίσχυση της κάθαρσης του παθογόνου [3], [14].

Στην περίπτωση όμως κατά την οποία με την φυσική ανοσία δεν επιτευχθεί η καταστροφή των ξένων ουσιών, προς τον οργανισμό, θα ενεργοποιηθούν πιο ειδικοί μηχανισμοί αυξάνοντας την αμυντική ικανότητα του οργανισμού κατά την τυχόν μελλοντική επαφή του με τις ίδιες ουσίες. Αυτό το σκέλος ανοσίας ονομάζεται ειδική ή επίκτητη. Οι ιδιότητες που έχουν αυτά τα κύτταρα είναι η ειδικότητά τους για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο και η ικανότητά της μνήμης από προηγούμενη αντιγονική επαφή. Με αυτό τον τρόπο η έκθεση οδηγεί σε ταχύτερη και πιο ισχυρή κυτταροτοξική απόκριση [3], [4]. Αυτό γίνεται με τα λεμφοκύτταρα, που καθώς ωριμάζουν διαφοροποιούνται σε T-κύτταρα και B-κύτταρα, ονόματά που αντανακλούν τις διαφορετικές τοποθεσίες στις οποίες υφίστανται ωρίμανση: ο θύμος (Thymus για T-κύτταρα) και ο μυελός των

οστών (Bone marrow για Β-κύτταρα) [3], [15]. Τ-κύτταρα και Β-κύτταρα χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς δείκτες στην επιφάνεια του κυττάρου τους.

Β Λεμφοκύτταρα

Κατά την ενεργοποίηση, Β-κύτταρα διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και να έχουν μια μοναδική λειτουργία στην ανοσία, καθώς είναι το μόνο είδος κυττάρου που μπορεί να συνθέτει και να εκκρίνει αντίσωμα. Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες γνωστές ως ανοσοσφαιρίνες (Ig), κυκλοφορούν στο σώμα ως κύριο συστατικό του πλάσματος στο αίμα και της λέμφου και συνδέονται με ειδικότητα προς το αντιγόνο. Υπάρχουν πέντε κατηγορίες ή ισοτύποι ανοσοσφαιρίνης: IgG, IgA, IgM, IgD και IgE που διαφέρουν ως προς τη δομή και τις λειτουργίες τους. Η σύνδεση του αντισώματος καθιστά το παθογόνο ευπαθές σε άλλα συστατικά και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, σηματοδοτώντας την καταστροφή του. Κάθε αντίσωμα έχει μια μοναδική εξειδίκευση για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο που καλύπτει ευρύ φάσμα ουσιών με τις οποίες μπορεί να έρθει σε επαφή ένα άτομο, κατά τη διάρκεια ζωής του [3], [4].

Τ Λεμφοκύτταρα

Τα Τ-κύτταρα είναι μέρος της επίκτητης ανοσοαπόκρισης και παρόλο που προέρχονται από το μυελό των οστών, ωριμάζουν στο θύμο αδέν. Τα Τ-κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν την κυτταρική ανοσία έναντι ενδοκυτταριών παθογόνων συμπεριλαμβανομένων των ιών, βακτηρίων και παρασίτων. Όπως τα Β-κύτταρα έτσι και αυτά παράγουν μνήμη, και έχουν μεγάλη ειδικότητα. Υπάρχουν δύο μεγάλες υποκατηγορίες των Τ-κυττάρων με βάση την έκφρασή τους δεικτών κυτταρικής επιφάνειας CD4 ή CD8 και το καθένα από αυτά έχει διαφορετικές λειτουργίες. CD8+ Τ-κύτταρα είναι γνωστά ως κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CTLs) και μπορούν να σκοτώσουν άμεσα

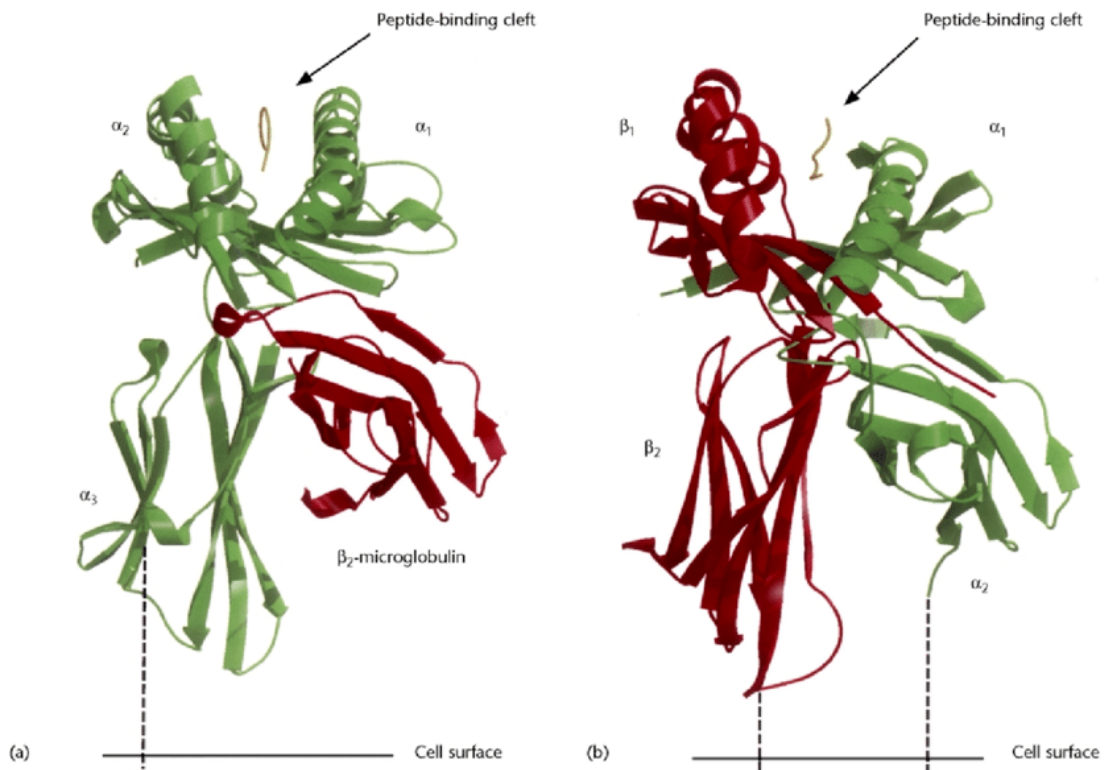
κύτταρα που έχουν μολυνθεί [16]. CD4+ T-κύτταρα δίνουν "βοήθεια" σε άλλους τύπους κυττάρων και είναι γνωστά ως T-βοηθητικά - επαγωγικά (T-helper - Th), κύτταρα που μπορούν να διαιρεθούν σε Th1 και Th2. Τα Th1 κύτταρα μπορεί να διεγείρουν και να ενεργοποιήσουν μακροφάγα και B-κύτταρα μέσω της έκκρισης κυτταροκινών [17] ενώ τα Th2 κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν B-κύτταρα τα οποία έχουν συναντήσει το αντιγόνο τους μέσω συνεργικής αναγνώρισης αντιγονικού πεπτιδίου που παρουσιάζεται στον υποδοχέα των B-κυττάρων, δίνοντας με αυτό το τρόπο βοήθεια σε B-κύτταρα να διαφοροποιούνται σε πλάσματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα.

Τα παραπάνω αναφέρονται στην περίπτωση που ο οργανισμός εκτεθεί σε κάποιο ξένο αντιγόνο και με αυτό το τρόπο επιτυγχάνεται η ενεργητική ανοσία. Ειδική ανοσία όμως μπορεί να αποκτήσει ένας οργανισμός και με τη χορήγηση κυττάρων ή ορού (εμβολιασμός). Αυτή η μορφή ευαισθητοποίησης ονομάζεται παθητική ανοσία [18].

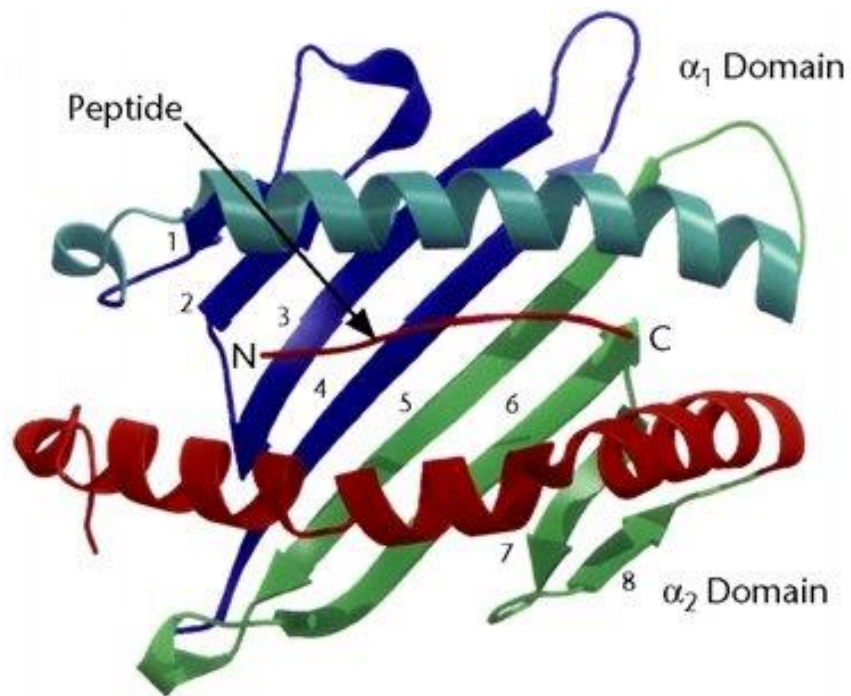
Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

Τα μόρια MHC είναι απαραίτητα για τη διασφάλιση ότι τα κατάλληλα T-κύτταρα ενεργοποιούνται με διέγερση από συγκεκριμένη πηγή μόλυνσης. Υπάρχουν δύο τύποι ή κατηγορίες, των MHC μορίων, γνωστών ως MHC τάξης I και MHC τάξης II, με το καθένα να παρουσιάζουν πεπτίδια στα CD8 και CD4 T-κύτταρα, αντίστοιχα. Τα CD8 T-κύτταρα αναγνωρίζουν πεπτίδια ενδοκυτταρικής προέλευσης που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης I και τα CD4 T-κύτταρα παρουσιάζουν πεπτίδια από αντιγόνα εξωκυτταρικής προέλευσης μέσω μορίων MHC τάξης II. Ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γλυκοπρωτεϊνών CD4 ή CD8 και των MHC τάξης I ή II μπορούν να συμβούν όταν ένας υποδοχέας T κυττάρων - TCR - αναγνωρίζει συγκεκριμένο πεπτίδιο και το MHC μόριο. Αυτή η συμμετοχή των CD4 και CD8 με την ανοσιακή αναγνώριση, δίνει το ρόλο των συν-υποδοχέων [3], [19]. Τα MHC τάξης I και τάξης II μόρια έχουν παρόμοιες τρισδιάστατες δομές, αποτελούμενες από διαφορετικά στοιχεία. Το MHC τάξης I μόριο έχει μία διαμεμβρανική βαριά πρωτεϊνική α-αλυσίδα, μη ομοιοπολικά συμπλεγμένη με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται β2-μικροσφαιρίνη (ελαφριά αλυσίδα). Οι τρεις εξωκυττάριες περιοχές της βαριάς αλυσίδας που ονομάζονται α-1, α-2 και α-3, με την αναδίπλωση των α-1 και α-2 περιοχών που είναι ιδιαίτερα πολυμορφικές, σχηματίζουν την περιοχή δέσμευσης (αύλακα) πεπτιδίου, παρουσιάζεται στα CD8 θετικά κύτταρα και υποστηρίζεται από τη β2-μικροσφαιρίνη [20]. Η α-3 περιοχή που είναι λιγότερο πολυμορφική από τις α-1 και α-2 περιοχές, παρέχει τη θέση δέσμευσης για CD8 συν-υποδοχείς [3], [21]. Τα MHC τάξης II μόρια αποτελούνται από μία διαμεμβρανική α αλυσίδα (με α1 και α2 περιοχές) και μία διαμεμβρανική β αλυσίδα (με β1 και β2 περιοχές) [3]. Η περιοχή δέσμευσης (αύλακα) των τάξης II σχηματίζεται από τις α1 και β1 περιοχές και κωδικοποιείται από το πιο πολυμορφικό εξόνιο (β1) των τάξης II γονιδίων ενώ η β2 περιοχή που είναι πλησιέστερα στην κυτταρική μεμβράνη παρέχει θέση δέσμευσης για τους CD4 συν-υποδοχείς [22], σχηματική αναπαράσταση εμφανίζεται στο Σχήμα A1. Τα πεπτίδια που συνδέονται στα HLA τάξης II μόρια είναι πιο μεγάλα σε σύγκριση με αυτά που συνδέονται στα HLA τάξης I

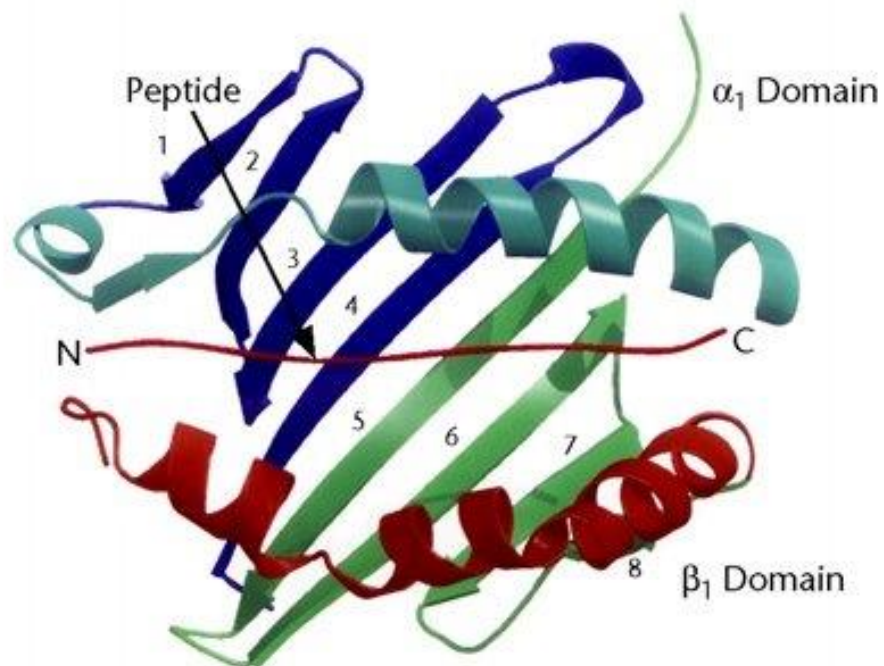
μόρια. Η στερεοδομή των HLA μορίων πιστεύεται ότι είναι χαλαρή, επειδή τα πεπτίδια μπορούν να συνδεθούν στο ίδιο HLA μόριο με διαφορετικούς τρόπους. Τα HLA τάξης II μόρια εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα που συμμετέχουν στην αναγνώριση ενός αντιγόνου, όπως τα Β λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα. Πρωτεΐνες που παράγονται από βακτήρια ή ιούς, καθώς και πρωτεΐνες που προέρχονται από αυτο-μόρια πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία και παρουσιάζονται ως πεπτίδια από τα MHC τάξης I και II μόρια για να αναγνωριστούν από έναν υποδοχέα TCR. Οι πρωτεΐνες από το εσωτερικό του κυττάρου επεξεργάζονται από τα MHC τάξης I και οι εξωκυττάρια πρωτεΐνες από τα MHC τάξης II [23]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα HLA τάξης I και τάξης II μόρια έχουν διαφορά στο μέγεθος του πεπτιδίου το οποίο μπορεί να δεσμεύεται. Πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια HLA τάξης I είναι περίπου εννέα αμινοξέα σε μήκος και δεσμεύουν το μόριο HLA σε κάθε άκρο του πεπτιδίου. Τα πεπτίδια που συνδέονται με τα μόρια τάξης II είναι γενικά μεγαλύτερα, μεταξύ 10-34 αμινοξέων. Ανοίγματα σε κάθε άκρο της αύλακας σύνδεσης βοηθούν τη σύνδεση των μεγαλύτερων σε μήκος πεπτιδίων [24] όπως φαίνεται και στο σχήμα Α2. Ο υποδοχέας TCR είναι ικανός να αναγνωρίζει άπειρο αριθμό πεπτιδίων με αναδιάταξη των τμημάτων γονιδίου, με παρόμοιο τρόπο που δρα το αντίσωμα στις υπερμεταβλητές περιοχές. Επιπλέον, η θυμική εκπαίδευση προσπαθεί να εξασφαλίσει ότι η ανοσοαπόκριση δεν θα ενεργοποιηθεί κατά των αυτο-αντιγόνων, με ένα μηχανισμό γνωστό ως περιφερική ανοχή [25]. Η ανοσοαπόκριση έναντι παθογόνων ή μη αυτο-αντιγόνων μπορεί επίσης να ενισχυθεί με την διαμόρφωση των πεπτιδίων, καθώς αυτά δεσμεύονται σε μόρια HLA και ανάλογα με το μόριο HLA, μπορεί να δεσμευθεί ένα μεγάλο εύρος πεπτιδίων. Αυτά τα χαρακτηριστικά, που αποκτήθηκαν μέσω πολυμορφισμού των μορίων HLA, έχουν εμφανιστεί μέσω της εξέλιξης και της φυσικής επιλογής ως μηχανισμός για την εξασφάλιση ότι σε περιπτώσεις πανδημίας, κάποια άτομα δεν θα νοσήσουν [26], [27].



Σχήμα Α1. Συνολική άποψη των μορίων MHC τάξης I και II. (α) Σχηματική αναπαράσταση MHC τάξης I. Η βαριά αλυσίδα (με πράσινο χρώμα) περιλαμβάνει τις περιοχές α -1, α -2 και α -3. Η ελαφριά αλυσίδα, β -2 μικροσφαιρίνη (με κόκκινο χρώμα), και το πεπτίδιο που δεσμεύεται στην σχισμή που παρουσιάζει αντιγόνο είναι με κίτρινο. (β) Σχηματική αναπαράσταση MHC τάξης II. Η α αλυσίδα (πράσινη) και η β αλυσίδα β (κόκκινο) διπλώνονται με το πεπτίδιο (κίτρινο) για να σχηματίσουν το σύμπλοκο. Οι α -1 και β -1 από κάθε αλυσίδα σχηματίζουν την αύλακα σύνδεσης πεπτιδίου. Η κυτταρική μεμβράνη είναι στη βάση του σχήματος μια οριζόντια γραμμή. (Τροποποίηση από Adnane Achour 2001) [28]



(a)

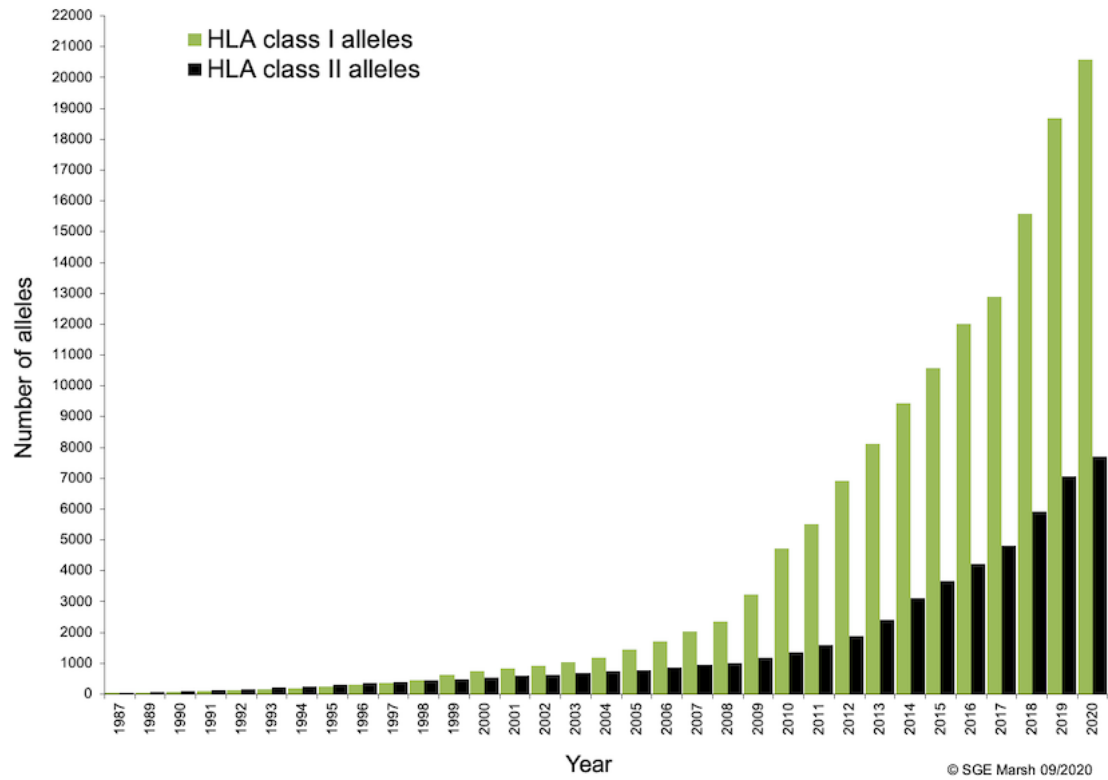


(b)

Σχήμα A2. Σημεία δέσμησης πεπτιδίων. Το πεπτίδιο συνδέεται στην αύλακα. Τα άκρα N- και C- είναι σε κάθε άκρο του πεπτιδίου. Επισημαίνεται ότι στο (b) το καρβοξυ-τερματικό της α-ελικοειδούς περιοχής στη σχισμή δέσμησης MHC τάξης II είναι πολύ μικρότερο και παραμορφώνεται στη βάση, ώστε να ανοίγει τα άκρα της αυλάκωσης, επιτρέποντας σε μεγαλύτερα πεπτίδια να συνδεθούν με MHC τάξης II μόρια. (Τροποποίηση από Adhane Achour 2001) [28]

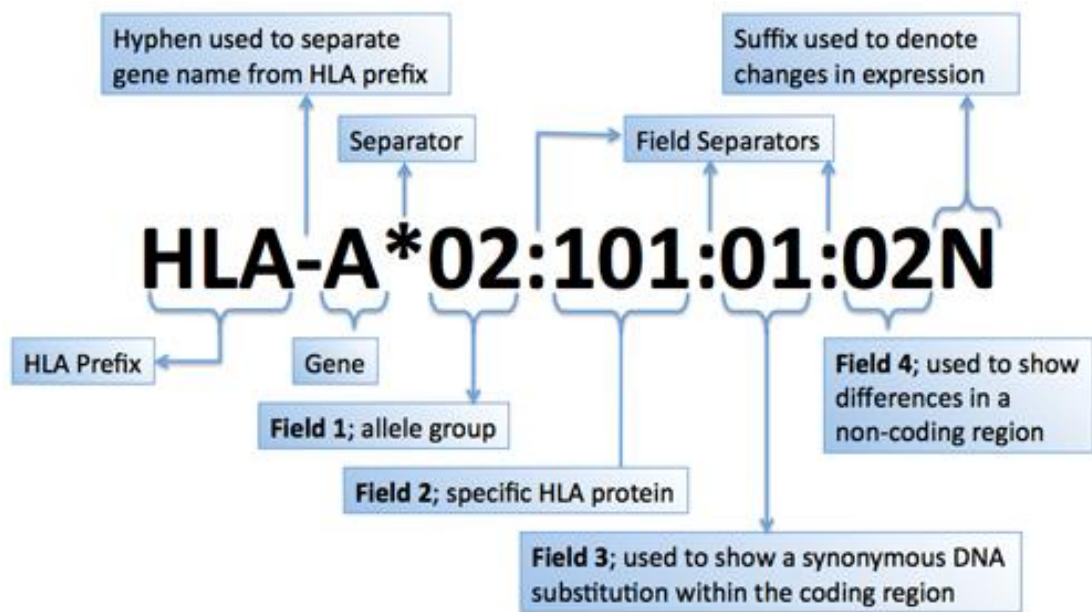
Ονοματολογία HLA

Τα μόρια που ανήκουν στο σύστημα HLA ορίστηκαν αρχικά χρησιμοποιώντας αντισώματα: τα αντιγόνα τάξης I (A, B και C) και το αντιγόνο τάξης II (D). Στην αρχή, αυτά τα αντιγόνα D φάνηκαν να σχετίζονται με αντιγόνα που προκάλεσαν απόρριψη μοσχεύματος και ονομάστηκαν DR για "D Related". Αυτό προκάλεσε όμως σύγχυση. Οι εξελίξεις στις μοριακές γενετικές μεθόδους αποκάλυψαν πολύ περισσότερες διαφορές μεταξύ ατόμων από αυτές που θα μπορούσαν να εκτιμηθούν χρησιμοποιώντας αντισώματα. Καθώς περισσότεροι άνθρωποι τυποποιούνται γενετικά για HLA, τόσο περισσότερα αλληλόμορφα HLA ανακαλύπτονταν. Μέχρι το Δεκέμβριο 2020 υπήρχαν στη βάση δεδομένων 29.417 HLA και σχετιζόμενα αλληλόμορφα, όπως περιγράφονται <http://hla.alleles.org/alleles/index.html> και <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/> (πρόσβαση Φεβρουάριος 2021) IPD-IMGT/HLA Database [29]. Στο Σχήμα A3 που εμφανίζεται ο αριθμός των αλληλομόρφων που ονομάζονται ανά έτος.



Σχήμα A3. Διάγραμμα που εμφανίζεται ο αριθμός των αλληλομόρφων που ονομάζονται ανά έτος, από το 1987 μέχρι το τέλος Σεπτεμβρίου 2020 [29]

Κάθε όνομα αλληλόμορφου HLA έχει έναν μοναδικό αριθμό που αντιστοιχεί σε έως και τέσσερα σύνολα ψηφίων διαχωρισμένα με άνω και κάτω τελεία. Το μήκος του προσδιορισμού αλληλόμορφων εξαρτάται από την ακολουθία του αλληλόμορφου και εκείνου του πλησιέστερου συγγενή του. Όλα τα αλληλόμορφα λαμβάνουν τουλάχιστον τετραψήφιο όνομα, το οποίο αντιστοιχεί στα δύο πρώτα σετ ψηφίων, τα μεγαλύτερα ονόματα εκχωρούνται μόνον όταν είναι απαραίτητο [30]. Η ονοματολογία έχει αλλάξει αρκετές φορές, αυτό γίνεται από την επιτροπή του ΠΟΥ “WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System” και “International Histocompatibility Workshops”, που διοργανώνει συναντήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η πρώτη τέτοια συνάντηση έγινε το 1964 και η επόμενη - 18^η - προγραμματίστηκε για το 2021 στην Ολλανδία αλλά αναβλήθηκε για το 2022. Τα ψηφία πριν από την πρώτη άνω και κάτω τελεία περιγράφουν τον τύπο, ο οποίος συνήθως αντιστοιχεί στο ορολογικό αντιγόνο που μεταφέρεται από έναν αλλότυπο. Με την ορολογική τυποποίηση κάθε ατόμου προσδιορίζονται τα HLA αντιγόνα, δηλαδή ο HLA φαινότυπος του ατόμου. Το επόμενο σύνολο ψηφίων χρησιμοποιείται για την καταχώριση των υποτύπων, οι αριθμοί εκχωρούνται με τη σειρά με την οποία έχουν καθοριστεί οι ακολουθίες DNA. Με τη μοριακή τυποποίηση (DNA μεθοδολογία) προσδιορίζεται ο HLA γονότυπος, δηλαδή το σύνολο των HLA αλληλόμορφων γονιδίων. Τα αλληλόμορφα, των οποίων οι αριθμοί διαφέρουν στα δύο σύνολα ψηφίων, πρέπει να διαφέρουν σε μία ή περισσότερες νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις που αλλάζουν την αλληλουχία αμινοξέων της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης. Τα αλληλόμορφα που διαφέρουν μόνο από συνώνυμες νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις (που ονομάζονται επίσης σιωπηλές ή μη κωδικοποιητικές υποκαταστάσεις) εντός της κωδικοποιητικής ακολουθίας διακρίνονται με τη χρήση του τρίτου συνόλου ψηφίων. Τα αλληλόμορφα που διαφέρουν μόνο από πολυμορφισμούς αλληλουχίας στα εσώνια ή στις μη μεταφρασμένες περιοχές 5' ή 3' που πλαισιώνουν τα εξόνια και τα εσώνια, διακρίνονται με τη χρήση του τέταρτου συνόλου ψηφίων. Συνοψίζοντας, το κάθε αλληλόμορφο ξεκινά με ένα γράμμα, που δηλώνει το γονίδιο, ακολουθεί ο αστερίσκος (*) ως δηλωτικό της μοριακής τυποποίησης και ακολουθούν τα ψηφία. Απεικόνιση της ονοματολογίας φαίνεται στο σχήμα A4.



© SGE Marsh 04/10

Σχήμα A4. Απεικόνιση της ονοματολογίας του HLA [30]

Τα HLA τάξης I και II μόρια κωδικοποιούνται από κληρονομούμενα γονίδια και διασφαλίζουν την ποικιλομορφία με δύο μηχανισμούς. Για κάθε τόπο, εκφράζονται δύο γονίδια, ένα κληρονομείται από τη μητέρα και το άλλο από τον πατέρα, κατά συνέπεια δώδεκα συνολικά διαφορετικά μόρια HLA μπορούν να εκφραστούν από τους έξι κλασικούς HLA γονιδιακούς τόπους. Ο δεύτερος μηχανισμός δημιουργίας ποικιλομορφίας του MHC είναι μέσω του γενετικού πολυμορφισμού, που προκύπτει από αλλαγές στη δομή νουκλεοτιδίων του γονιδίου HLA τόπων και ως εκ τούτου η δομή αμινοξέων μπορεί να τροποποιηθεί. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εξέλιξη των χιλιάδων HLA αλληλόμορφων παραλλαγών, καθιστώντας τα γονίδια HLA το πιο πολυμορφικό γενετικό σύστημα που έχει ανακαλυφθεί.

Εκτεταμένος πολυμορφισμός στα αλληλόμορφα HLA εξασφαλίζει ότι τα περισσότερα άτομα θα κληρονομήσουν ένα διαφορετικό αλληλόμορφο από κάθε γονέα και επομένως θα είναι ετερόζυγα για όλα τα HLA γονίδια τους. Αυτό είναι γνωστό ως το πλεονέκτημα ετεροζυγωτίας, επειδή υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα ότι μια πιθανή μόλυνση μπορεί να καταπολεμηθεί με δύο διαφορετικές εκδοχές ενός μορίου HLA, καθώς είναι σε θέση να παρουσιάσει ελαφρώς διαφορετικά πεπτίδια [33]. Η γενετική ποικιλομορφία των αλληλόμορφων HLA έχει εξελιχθεί μέσα από θετική επιλογή οδηγεί σε διαφορές που βρίσκονται συγκεντρωμένες σε περιοχές που περιλαμβάνουν πεπτίδιο που δεσμεύεται και αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα TCR (περιοχές α-1 και α-2 του τάξης I τόπου και β-1 τάξης II γονιδιακών προϊόντων). Η κληρονομικότητα ακολουθεί τους νόμους του Mendel και τα γονίδια είναι συνεπικρατούντα δηλαδή τα γονίδια και από τους δύο απλότυπους (πατρικό και μητρικό), εκφράζονται ταυτόχρονα στον απόγονο. Ως αποτέλεσμα, κάθε άτομο εκφράζει δύο αλληλία ανά γενετικό τόπο. Οι HLA απλότυποι μεταβιβάζονται από τους γονείς στα παιδιά ως σύνολο (en block). Σε σπάνιες όμως περιπτώσεις μπορεί να υπάρξει διαχωρισμός και ανασυνδυασμός με αποτέλεσμα έναν καινούριο απλότυπο. Οι ανασυνδυασμοί παρατηρούνται συχνότερα στις γυναίκες και σε ορισμένες θέσεις του HLA. Γι' αυτό το λόγο, η πιθανότητα δύο αδέρφια να κληρονομήσουν τον ίδιο απλότυπο από τους γονείς τους είναι περίπου 25% [22]. Ο συνδυασμός των αλληλόμορφων που

μπορεί να κληρονομηθεί σε κάθε χρωμόσωμα 6 ονομάζεται απλότυπος και τα ετερόζυγα άτομα έχουν δύο απλότυπους [33].

Ρόλος HLA

Το ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιεί το HLA για τη διαφοροποίηση των δικών του κυττάρων από τα ξένα κύτταρα. Κάθε κύτταρο που εμφανίζει τον τύπο HLA ενός ατόμου ανήκει σε αυτό το άτομο και κατά συνέπεια δεν είναι εισβολέας. Για το ρόλο των HLA τάξης I και II στην ανοσία και τη συμβολή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC), έγινε αναλυτική αναφορά παραπάνω.

Μεταμόσχευση

Ιδιαίτερως έχουν μελετηθεί τα HLA, στη μεταμόσχευση ανθρωπίνων οργάνων. Από την πρώτη μεταμόσχευση νεφρού από συγγενή, ζώντα δότη το 1954 στη Βοστώνη των ΗΠΑ, από τον Murray που του χάρισε αργότερα (το 1990) το Βραβείο Nobel [34] και τις προηγηθείσες απόπειρες του Medawar [35] μέχρι και σήμερα, έχει μελετηθεί ο ανοσολογικός μηχανισμός της απόρριψης μοσχεύματος, της ανάπτυξης ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, εξελίξεις αξιοσημείωτες στην ιατρική επιστήμη σε σημείο επαναστατικό. Σήμερα, πραγματοποιούνται μεταμοσχεύσεις οργάνων σε πολλά κέντρα ανά τον κόσμο, για να θεραπεύσουν πολλά νοσήματα, δίνοντας σε ασθενείς όχι μόνο παράταση ζωής, αλλά και ποιότητα ζωής. Ενδεικτικά, αναφέρονται μεταμοσχεύσεις: νεφρού σε νεφρική ανεπάρκεια, καρδιάς σε συγγενείς καρδιοπάθειες, πνευμόνων και συνδυασμού καρδιάς / πνευμόνων σε κυστική ίνωση, νησιδίων παγκρέατος σε διαβήτη, ήπατος και λεπτού εντέρου σε κακοήθειες, κερατοειδούς σε οφθαλμικές παθήσεις, καθώς ακόμα και υγρού ιστού – stem cells για αιματολογικές κακοήθειες. Τα HLA αντιγόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόρριψη μοσχευμάτων. Μία από τις σημαντικές αιχμές του μη συμβατού μοσχεύματος είναι η ανάπτυξη αντισωμάτων ειδικών προς τον δότη (DSA donor specific antibodies), η οποία προκαλεί απόρριψη

μοσχεύματος εξ αίτιας αντισώματος, απώλεια μοσχεύματος και επαναλαμβανόμενη μεταμόσχευση καθώς και συνεχείς τυποποιήσεις ιστών. Τα αντισώματα αυτά παράγονται από ξένους επίτοπους που υπάρχουν στα λευκοκύτταρα που δεν είναι συμβατά με τα αντιγόνα HLA του δότη [36]. Η παρουσία αντισωμάτων πριν τη μεταμόσχευση σε μεταμοσχεύσεις πτωματικού δότη, αποτελεί δείκτη κινδύνου για απώλεια μοσχεύματος, ενώ μη ειδικά anti-HLA αντισώματα δεν σχετίζονται με μικρότερη επιβίωση μοσχεύματος και ευαισθητοποιημένοι ασθενείς με αυτά τα αντισώματα να στρέφονται κατά των τάξης I και II μπορεί να είναι δείκτης κινδύνου για απώλεια μοσχευμάτων μακροπρόθεσμα [37]. Αυτά τα αντισώματα μπορούν να αναπτυχθούν μέσω κυήσεως (στις γυναίκες), μεταγγίσεων αίματος ή προηγούμενων μεταμοσχεύσεων οργάνων. Μετά από ιογενή λοίμωξη ή εμβολιασμό, τα αντισώματα που παράγονται μπορεί να έχουν την ικανότητα να προκαλούν διασταυρούμενη αντίδραση με τα HLA, που ονομάζεται ετερόλογη ανοσία και προκαλείται από αλλοαντιδραστικότητα των T-κυττάρων ή από παρισταμένη ενεργοποίηση αδρανών HLA-ειδικών B κυττάρων μνήμης [38].

HLA και συσχέτιση με νοσήματα

Το HLA είχε σημαντικό ρόλο στην ανοσοπαθολογία πολλών ασθενειών. Η ισχυρότερη συσχέτιση είναι το HLA-B27 με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Ενδεικτικά αναφέρονται στην κλινική σημασία και το ρόλο των HLA-B27 στη σπονδυλοαρθρίτιδα και HLA-B51 στη νόσο του Behçet καθώς και HLA-DQ2 / DQ8 σε κοιλιοκάκη και HLA-DRB1 στη ρευματοειδή αρθρίτιδα [39]. Στον πίνακα A1 φαίνονται κάποια από τα νοσήματα και η συσχέτιση τους με συγκεκριμένο αλληλόμορφο [40].

Νόσημα	HLA αλληλόμορφο
αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα	B27
Νοσος Reiters	B27
Οξεία πρόσθια ραγοειδίτιδα	B27
Υποξεία θυρεοειδίτιδα	B35
Ψωρίαση κατά πλάκας	Cw6
Ναρκοληψία	DQ6
Νόσος Grave's	DR3
Βαρειά μυασθένεια	DR3
Νόσος του Addison	DR3
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	DR4
Νεανική ρευματοειδής αρθρίτιδα	DR8
Κοιλιοκάκη	DQ2
Σκλήρυνση κατά πλάκας	DR2, DQ6
Διαβήτης τύπου I	DQ8

Πίνακας A1. HLA και συσχέτιση με νοσήματα. Προσαρμογή από E. Thorsby [40]

HLA και νεοπλασίες

Έχει παρατηρηθεί η συσχέτιση των πολυμορφισμών HLA σε κακοήθεις και καρκίνους, με κάποιους συσχετισμούς HLA να είναι σαφείς και άλλοι πιθανοί, δρώντας ως παράγοντες, ή συμπαράγοντες, στην παθογένεση κακοήθους νόσου. Έχει επίσης διατυπωθεί ως υπόθεση εργασίας, ότι τα HLA ενδέχεται να προδιαθέτουν ορισμένα άτομα σε συγκεκριμένες κακοήθειες. Επιπλέον, τα HLA θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ευαισθησία ή την πρόοδο μιας κακοήθειας, και αυτό μπορεί να είναι πιο εμφανές σε ιούς που σχετίζονται με καρκίνους. [41]

Στον πίνακα A2 φαίνονται νεοπλασματικές παθήσεις που σχετίζονται με HLA

Disease	Associated HLA locus/allele	Relative Risk
Hodgkin's disease	DPB1*0301 DPB1*0401 DPB1*0901	2.0 0.9 -
Cutaneous T-cell lymphoma	DR5 DQB1*03	3.9 2.7
Burkitt's lymphoma	A1, B12, DR7	3.4 (DR7)
Childhood common Acute Lymphoblastic Leukaemia	DPB1*0201 and/or DPB1*0501	2.8
Enteropathy-associated T-cell lymphoma	DQA1*0501, DQB1*0201	44.2
Cervical intraepithelial neoplasia	DQB1*03 DQB1*0602	2.6 2.2
Cervical squamous cell carcinoma	DQB1*0301 DQB1*0303 DQB1*0602	8.7 4.5 3.4
Kaposi's sarcoma	DR5	4.8
Colorectal carcinoma	DQB1*0301	-
Cutaneous basal cell carcinoma	DR1	2.1–3.0

Πίνακας Α2. Νεοπλασματικές παθήσεις που σχετίζονται με HLA [42]

Test πατρότητας

Στο τεστ πατρότητας συγκρίνονται οι γενετικοί δείκτες ενός παιδιού, της βιολογικής μητέρας και του πιθανού πατέρα για να προσδιορίσουν τον αποκλεισμό ή μη του υποτιθέμενου πατέρα. Υπάρχουν ορισμένα πλεονεκτήματα της χρήσης HLA τυποποίησης στο τεστ πατρότητας. Το σύστημα HLA, που ακολουθεί την κληρονομικότητα του Mendel, είναι πολυμορφικό, το ποσοστό ανασυνδυασμού του είναι χαμηλό, δεν έχει παρατηρηθεί μετάλλαξη σε οικογενειακές μελέτες και οι συχνότητες αντιγόνων είναι γνωστές για πολλές διαφορετικές εθνοτικές ομάδες. Το σύστημα HLA, ωστόσο, δεν παρέχει υψηλή πιθανότητα αποκλεισμού, όταν η υπόθεση περιλαμβάνει έναν πατρικό HLA απλότυπο που είναι κοινός στη συγκεκριμένη εθνοτική ομάδα. Οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούν μη HLA γενετικά συστήματα χρησιμοποιούνται ευρέως [43] και η τυποποίηση HLA σπάνια χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των γονέων. Παρόλα αυτά, μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι με την τεχνολογία MPS (massively parallel sequencing MPS) μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα, συμπληρωματικά προς την ιατροδικαστική γενετική [44].

HLA και άλλοι συσχετισμοί

Τους τελευταίους μήνες που προηγήθηκαν της ολοκλήρωσης της συγγραφής της παρούσας διδακτορικής διατριβής (τέλη του έτους 2020 με αρχές του 2021) εμφανίστηκαν ενδιαφέρουσες δημοσιεύσεις που αφορούν το HLA, σε σχέση:

α) με το φλέγον θέμα της πανδημίας από τον ιό COVID-19. Σε αυτά ενδεικτικά γίνεται αναφορά στη συσχέτιση με HLA αλληλόμορφα και θνησιμότητα [45], [46], [47] [48] [49] HLA και σοβαρότητα της νόσου [50], HLA και προγνωστικοί δείκτες των ασθενών με COVID-19 [51] [52], στοχευμένη θεραπεία της COVID-19 με HLA-E και HLA-G μόρια [53] και δευτερευόντως:

β) τη γενετική αντιστοιχία (genetic matchmaking) δηλαδή τη μη τυχαία επιλογή συντρόφου σε σχέση με ορισμένα γενετικά χαρακτηριστικά [54]–[56], κάτι όμως που όμως αντιμετωπίζεται με σκεπτικισμό.

Major Histocompatibility Complex Class I-related chain A gene

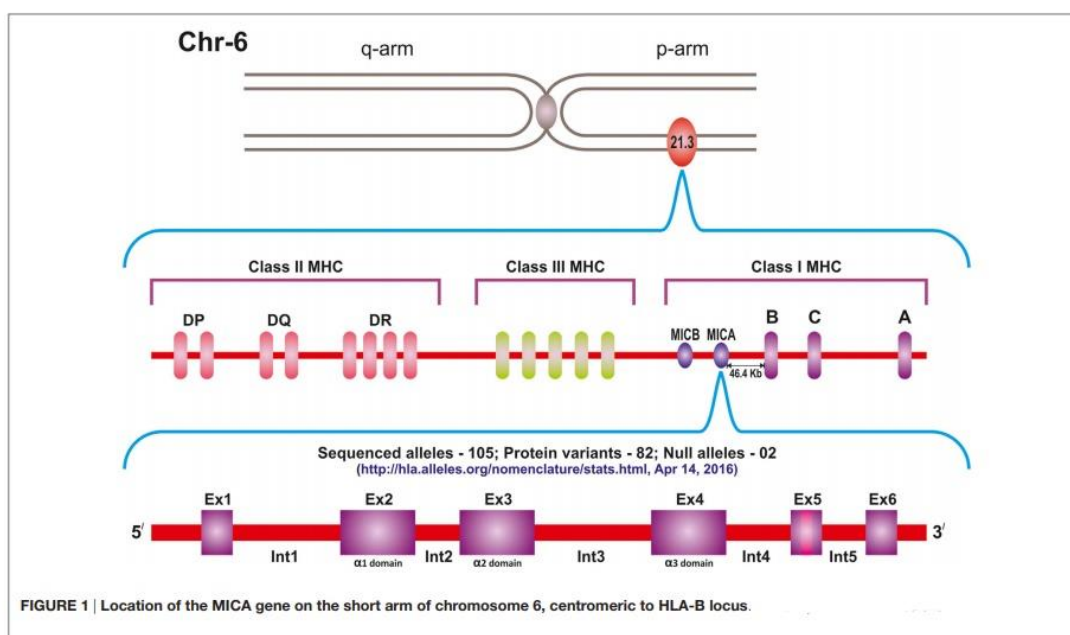
MICA

Τα MICA και MICB είναι μια νέα οικογένεια πρωτεϊνών που σχετίζονται με το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) τάξης I, που κωδικοποιούνται εντός των ανθρώπινων γονιδίων HLA τάξης I και περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1994 από δύο ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών [57], [58]. Ενώ η δεύτερη ομάδα τους ανέφερε ως “Perth beta block transcript 11”, ο Bahram και συν. τους ονόμασαν MIC, μια ορολογία που υιοθετήθηκε αργότερα από την επιτροπή ονοματολογίας του συστήματος HLA του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Σε αντίθεση με τα κλασικά μόρια HLA, αυτές οι πρωτεΐνες δεν είναι αντιγόνοπαρουσιαστικά των T κύτταρων. Αντιθέτως, δρουν ως συνδέτες (ligands) για τον ενεργοποιητικό υποδοχέα τύπου λεκτίνης τύπου C, αναφερόμενα ως κύτταρα φυσικοί φονείς (NK, Natural Killers) ομάδα 2, μέλος D (NKG2D) που εκφράζεται σε κύτταρα NK, γδ T κύτταρα και CD8 + αβ T κύτταρα. Η αλληλεπίδραση των MICA με το NKG2D οδηγεί σε ενεργοποίηση της T-λεμφοκυτταρικής απόκρισης κυτταροτοξικότητας, της απόκρισης των NK κυττάρων και στην παραγωγή κυτταροκίνης [59]. Εκτός αυτού, τα πολυμορφικά αντιγόνα MICA είναι ικανά να επάγουν αντισώματα, τα οποία μπορεί να θανατώνουν κύτταρα στόχους παρουσία του συμπληρώματος [60]. Ως εκ τούτου, οι MICA πρωτεΐνες είναι μοναδικές στο βαθμό που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη σύνδεση των διαφορετικών ανοσοαποκρίσεων στη μεταμόσχευση οργάνων: της φυσικής και επίκτητης.

Γενετικές πτυχές και βιοχημική δομή

Τα γονίδια MIC βρίσκονται εντός της περιοχής τάξης I MHC του χρωμοσώματος 6p21.3. Συνολικά έχουν περιγραφεί συνολικά επτά γονίδια, που ορίζονται από MICA ως MICG, από τα οποία τα MICA και MICB είναι τα

μόνα λειτουργικά γονίδια, ενώ τα MICC ως MICG είναι ουσιαστικά ψευδογονίδια [61], [62]. Το γονίδιο των MICA βρίσκεται κεντρομερικώς στον γενετικό τόπο HLA-B σε απόσταση 46,4 kb και αυτή η στενή εγγύτητα έχει ως αποτέλεσμα ένα πολύ ισχυρό αποτέλεσμα ανισοροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) μεταξύ των δύο (Σχήμα A6).

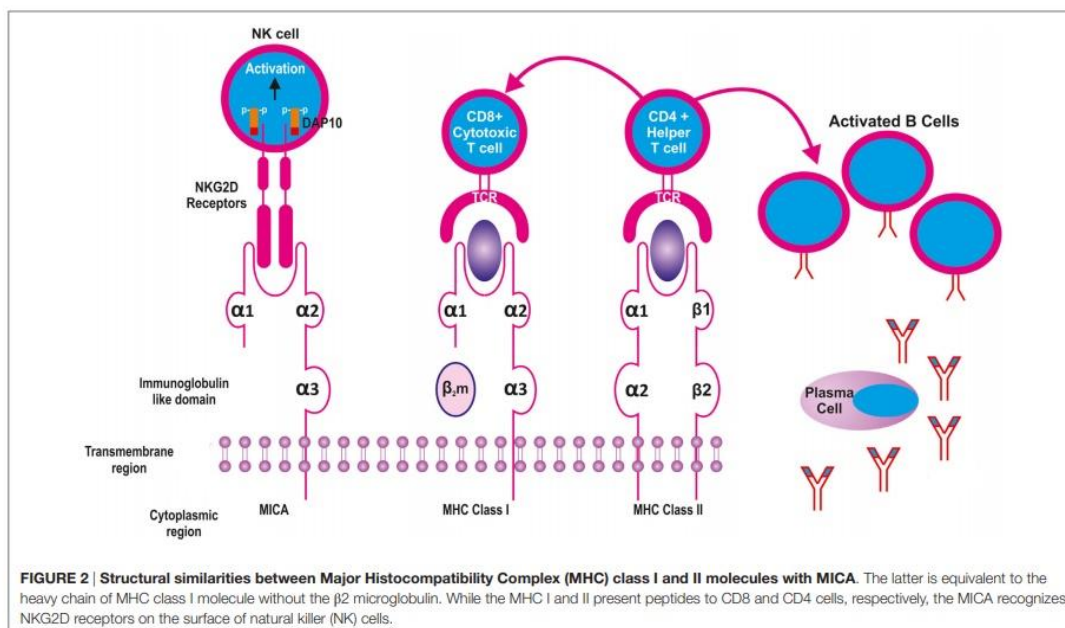


Σχήμα A6. Γονίδια MICA στο χρωμόσωμα 6, δίπλα από το HLA-B (Τροποποίηση από Baranwal, 2017) [63]

Η δομή του MICA είναι παρόμοια με αυτή των κλασσικών μορίων HLA τάξης I με 30% ομολογία αλληλουχίας και τρεις εξωκυτταρικές περιοχές. Από αυτές, η περιοχή α1 κωδικοποιείται από το εξόνιο 2, η α2 από το εξόνιο 3 και η α3 από το εξόνιο 4. Η διαμεμβρανική περιοχή (transmembrane region, TM) κωδικοποιείται από το εξόνιο 5, ενώ η καρβοξυτελική κυτταροπλασματική ουρά κωδικοποιείται από το εξόνιο 6. Υπάρχουν πέντε εσώνια από τα οποία το πρώτο είναι το μεγαλύτερο εσώνιο [64]. Το γονίδιο εκτείνεται σε περιοχή 11.7 kb και μεταγράφεται σε mRNA 1.382 bp, το οποίο δημιουργεί πολυπεπτίδια 383 αμινοξέων των 43 kDa που συμπεριλαμβάνουν το πεπτίδιο οδηγό.

Σε αντίθεση με τα μόρια HLA τάξης I, το MICA δεν δεσμεύει β2-μικροσφαιρίνη (β2-m) (Σχήμα A7). Αν και η δομή του MICA μοιάζει πολύ με την αντίστοιχη

κλασική τάξης I, η α-2 έλικα του, η οποία είναι μία από τις έλικες που καθορίζουν την αυλάκωση, είναι μη διατεταγμένη και εύκαμπτη καθιστώντας την ακατάλληλη για δέσμευση πεπτιδίων. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα μόρια HLA τάξης I, η πλατφόρμα που σχηματίζεται από τις α1 και α2 περιοχές του μορίου MICA δείχνει προς τα κάτω - προς την κυτταρική μεμβράνη - εκθέτοντας έτσι την κάτω πλευρά της στον ενδοκυτταρικό χώρο. Ωστόσο, όταν τα MICA αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα του NKG2D, η εύκαμπτη α2 έλικα διατάσσεται με επιπλέον δύο άλφα-ελικοειδείς στροφές και οι περιοχές α1 και α2 γυρίζουν κατά 96° [65].



Σχήμα A7. Δομή και ομοιότητες MHC τάξης I και II με MICA. (Τροποποίηση από Baranwal, 2017) [63]

Εκφραση γνωρισμάτων (Προφίλ) των πρωτεϊνών MIC

Σε αντίθεση με την γενικευμένη έκφραση των κλασικών μορίων HLA τάξης I, οι πρωτεΐνες MIC έχουν περιορισμένη κατανομή στους ιστούς που εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα ειδικά στη γαστρεντερική οδό [66], τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες, τα μονοκύτταρα, τα κερατινοκύτταρα [67], και τα δενδριτικά κύτταρα [68]. Ο Zwierner και συν. απέδειξαν ότι τα μόρια MIC δεν εκφράζονται σε λεμφοκύτταρα T ή B, και αντίθετα με τα αντιγόνα HLA τάξης I,

δεν ρυθμίζονται από την INF- γ . Παρόλα αυτά, η έκφραση των MICA μπορεί να προκληθεί σε ενεργοποιημένα T κύτταρα CD4 + μέσω απελευθέρωσης IL-2 που επάγει ισχυρώς τα MICA μέσω καλσινευρίνης (calcineurin) και άλλων οδών σε συνεργασία με εμπλοκή των CD3. Με τη χρήση ομοεστιακής μικροσκοπίας, οι ερευνητές βρήκαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης MICA στην επιφάνεια ενεργοποιημένων CD4 T κυττάρων και αναφέροντας ότι αυτό πιθανώς υποδηλώνει προστατευτικό μηχανισμό της κυτταρικής προσβολής εξαρτώμενης από T κύτταρα [69]. Τα MICA μέσω δέσμησης των NK κυττάρων βοηθούν στην επίτευξη της απομάκρυνσης των ενεργοποιημένων T - κυττάρων αφού ολοκληρωθεί η τελική φάση της ανοσολογικής απόκρισης. Σε μελέτη, που περιλάμβανε ολική σάρωση σωματικού ιστού αμφοτέρων μεταγράφων των γονιδίων MICA και MICB με την μέθοδο Northern blot, οι Schrambach και συν. ανέφεραν ότι και τα δύο γονίδια μεταγράφονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς του σώματος εκτός από το κεντρικό νευρικό σύστημα [70]. Η επιφανειακή έκφραση του MICA ενισχύεται υπό συνθήκες στρες, όπως αυτοάνοσα νοσήματα [71], βλάβη DNA [72], βλάβη ισχαιμίας - επαναιμάτωσης [73], ιογενείς λοιμώξεις [74] και φλεγμονή [75]. Δεδομένου ότι τα αντιγόνα MICA εντοπίζονται επίσης συχνά σε καρκινικά κύτταρα [76], υποδηλώνεται ότι είναι δείκτες κυτταρικού στρες και η έκφραση τους είναι σήμα για καταστροφή από τα NK κύτταρα.

Πολυμορφισμοί MICA

Το MICA είναι το πλέον πολυμορφικό μη κλασικό τάξης I γονίδιο, που είναι γνωστό μέχρι στιγμής (Δεκέμβριος 2020) με 112 αλληλόμορφα που έχουν ήδη αναφερθεί και νέα αλληλόμορφα να ταυτοποιούνται συνεχώς. Αυτός ο πολυμορφισμός διαφέρει από αυτόν των γονιδίων HLA σε διάφορες πτυχές. Πρώτον, το μέγεθος του πολυμορφισμού είναι πολύ μικρότερο από αυτό που παρατηρείται στο σύστημα HLA. Δεύτερον, σε αντίθεση με τα μόρια HLA τάξης I, όπου ο πολυμορφισμός εντοπίζεται κυρίως σε εγγύτητα με αύλακα σύνδεσης αντιγόνου, ο πολυμορφισμός MICA διασκορπίζεται και στις τρεις εξωκυτταρικές περιοχές με τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα στην περιοχή a2, που κωδικοποιείται από το εξόνιο 3. Μια άλλη ενδιαφέρουσα πτυχή του

πολυμορφισμού των MICA είναι οι παρατηρούμενες παραλλαγές στην διαμεμβρανική περιοχή (TM) για διάφορα αλληλόμορφα MICA παρά το γεγονός ότι έχουν ταυτόσημες εξωκυτταρικές περιοχές. Επομένως, είναι απαραίτητο να μελετήσουμε τον πολυμορφισμό στην διαμεμβρανική περιοχή TM για να αποφύγουμε τυχόν ασάφειες κατά την τυποποίηση [77]. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις πολυμορφικές θέσεις του HLA που τυπικά αποτελείται από αρκετά αμινοξέα, ο πολυμορφισμός MICA παράγεται κυρίως με αντικαταστάσεις απλού αμινοξέος (εκτός των θέσεων 90 και 91) με αποτέλεσμα τον διμορφισμό (εκτός από τα αμινοξικά κατάλοιπα 156 και 251). Ο γενετικός πολυμορφισμός του MICB, σε αντίθεση με το MICA, περιορίζεται με συνολικά 45 αλληλόμορφα που έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής. Δεν υπάρχουν συγκεκριμένα στοιχεία που να δείχνουν τη συνάφεια του με το αποτέλεσμα των μεταμοσχεύσεων.

Διμορφισμός MICA-129

Παρά την ιδιαίτερα πολυμορφική φύση των γονιδίων MICA, έχει εντοπιστεί μόνο μία λειτουργική θέση που φαίνεται να επηρεάζει τη δέσμευση συνδέτη MICA στον υποδοχέα της NKG2D. Συνεπώς, μια μη συνώνυμη μεταβολή της μεθειονίνης σε βαλίνη στη θέση 129 της περιοχής α2 κατηγοριοποιεί τα αλληλόμορφα MICA σε "MICA-129 met", το οποίο είναι ισχυρό συνδετικό μέσο του υποδοχέα NKG2D και στο "MICA-129 val", που έχει ασθενή ικανότητα δέσμευσης. Αυτός ο διμορφισμός εντοπίζεται σε έναν μόνο SNP rs1051792 A > G πολυμορφισμό στη θέση 454 στο εξόνιο 3 του γονιδίου MICA, που αντιστοιχεί στη θέση αμινοξέος 129 της πρωτεΐνης MICA. Έχει αποδειχθεί ότι το MICA-129 met έχει 10 - έως 50 - φορές μεγαλύτερη ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκο με NKG2D από αυτά με MICA-129 val [78]. Η λειτουργική συνέπεια αυτού του διμορφισμού έχει μελετηθεί πρόσφατα με μεγάλη λεπτομέρεια από την ομάδα με επικεφαλής τον Ralf Dressel στη Γερμανία [79], που απέδειξε ότι οι ισομορφές MICA-129 met είναι σε θέση να προάγουν την παραγωγή ισχυρότερου και ταχύτερου σήματος NKG2D οδηγώντας σε υψηλότερο βαθμό κυτταροτοξικότητας από τα NK-κύτταρα και απελευθέρωσης INF-γ. Αυτή η γενετική παραλλαγή βρέθηκε επίσης ότι

προκαλεί ταχύτερη συνδιέγερση και ενεργοποίηση των CD8+ T κυττάρων. Εντούτοις, τέτοιες επιδράσεις δεν διατηρήθηκαν, επειδή η παραλλαγή MICA-129 ήταν ικανή να προκαλέσει ταχεία μείωση της ρύθμισης του υποδοχέα NKG2D [79]. Επιπλέον, η ίδια ομάδα ερευνητών έδειξε ότι η ισομορφή που περιείχε MICA-129 met εκφράζεται λιγότερο αποτελεσματικά στην κυτταρική επιφάνεια σε σύγκριση με την παραλλαγή MICA-129 val. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ενδοκυτταρική συγκράτηση του πρώτου και στην αυξημένη απόρριψη του από την κυτταρική επιφάνεια [80]. Παρομοίως, όπως οι αντίστοιχοι υποδοχείς NKG2D τους που σύμφωνα με τον πολυμορφισμό στην περιοχή NKG μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε υψηλή κυτταροτοξικότητα NK κυττάρων και χαμηλή συνολική κυτταροτοξικότητα, οι παραλλαγές MICA-129 μπορούν επίσης να συσχετιστούν διαφορετικά σε παθολογικές καταστάσεις που απαιτούν κυτταροτοξικότητα λόγω των NK κυττάρων.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση του διμορφισμού val/met με διάφορες ασθένειες που περιλαμβάνουν την ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο [81], τον ρινοφαρυγγικό καρκίνο [82] και τον λανθάνοντα αυτοάνοσο διαβήτη [83]. Αν και υπάρχει περιορισμένη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του διμορφισμού met/val σε μεταμοσχεύσεις, μια μελέτη από τον Boukouaci και συν. [84] ανέφεραν ισχυρή συσχέτιση γονότυπου MICA val/val με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας Νόσου του Μοσχεύματος Έναντι Ξενιστή (cGVHD) σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT). Επιπλέον, η ίδια μελέτη αποκάλυψε ότι τα επίπεδα ορού της διαλυτής ισομορφής MICA και η παρουσία αντισωμάτων σε MICA συσχετίστηκαν με την cGVHD, η οποία αποτελεί μείζονα επιπλοκή μετά από μεταμόσχευση HSC [84]. Το 2015, η Isernhagen και συν., σε ομάδα από 452 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε HSCT, έδειξε ότι το MICA-129 τείνει να αυξήσει τον κίνδυνο οξείας Νόσου του Μοσχεύματος Έναντι Ξενιστή (aGVHD). Η παρουσία ακόμη και ενός αλληλόμορφου με MICA-129 met μείωσε την πιθανότητα ανάπτυξης σοβαρής ή θανατηφόρου aGVHD [79]. Ο αυξημένος κίνδυνος aGVHD εξηγείται από το γεγονός ότι η παραλλαγή MICA-129 met οδηγεί σε ταχύτερη και πιο ισχυρή σηματοδότηση NKG2D, ενώ η ταχεία μείωση της ρύθμισης του NKG2D σε αλοδραστικά CD8+ T κύτταρα εξηγεί τη μειωμένη σοβαρότητα της aGVHD. Αυτή η επίδραση ήταν ακόμα πιο εμφανής σε ασθενείς που έφεραν ομόζυγα αλληλόμορφα με MICA-129 met

που έλαβαν ATG. Επιπλέον, παρατηρήθηκε υψηλότερος ρυθμός υποτροπής σε ασθενείς με MICA-129 met, σε σύγκριση με ασθενείς με γονότυπο MICA-129 val/val | λόγω της μειωμένης επίδρασης του μοσχεύματος έναντι της λευχαιμίας των κυττάρων NK και CD8+ συνεπεία της μείωσης της ρύθμισης του NKG2D από τις παραλλαγές MICA-129 met. Ως επακόλουθο αυτού, είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά MICA που σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις διεργασίες μπορεί επίσης να επηρεάσουν τις επιπλοκές που συμβαίνουν κατά την απόρριψη των νεφρικών αλλομοσχευμάτων. Μολονότι ο ανοσολογικός MICA-129 διμορφισμός έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει την έκβαση του μοσχεύματος μετά από μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, σε αντίθεση με τη μεταμόσχευση HSC, δεν υπάρχει δημοσιευμένη βιβλιογραφία που να αναδεικνύει αντίστοιχο ρόλο. Αυτό ασφαλώς ανοίγει ερευνητικό πεδίο που αφορά το αποτέλεσμα αλλογενούς μεταμόσχευσης νεφρού.

Ανοσιακή απόκριση των MICA

Η πρώτη ένδειξη ότι τα MICA θα μπορούσαν να δράσουν ως ένα νέο πολυμορφικό αλλοαντιγόνο υπάρχει στον Zwirner και συν. [85], όπου αναφέρεται η παρουσία αντισωμάτων αντι MICA στους ορούς των μεταμοσχευθέντων με συμπαγή όργανα. Αργότερα, παρόμοια αντισώματα αναφέρθηκαν σε ποντικούς ανοσοποιημένους με ανασυνδυασμένο MICA [60]. Αυτοί οι ερευνητές κατέδειξαν επίσης το MICA ως στόχο για την κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα. Λίγα χρόνια αργότερα, μελέτη από τους Zhang και Stastny [86] έδειξε ότι η ανοσοποίηση των ποντικών με ανασυνδυασμένο MICA*001, που έχει και τις τρεις εξωκυτταρικές περιοχές, θα μπορούσε να προκαλέσει αποκρίσεις τόσο σε T όσο και σε B κύτταρα. Ενώ τα πρώτα έδειξαν την κυριαρχία των CD4+ T-κυττάρων, επίσης υπήρχαν αναπαραγώμενα CD8+ T-λεμφοκύτταρα και τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα που είχαν διεγερθεί από MICA ήταν ικανά να θανατώνουν κύτταρα στόχους μέσω κυτταροτοξικότητας. Περαιτέρω, διεγερμένα με MICA CD4+ T κύτταρα τείνουν να εξελίσσονται σε Th2, εκκρίνοντας υψηλά επίπεδα

IL-4 και αντίστοιχα χαμηλά επίπεδα INF- γ . Έτσι, αυτά τα κύτταρα φαίνεται να παρέχουν ισχυρό βοήθημα στην ανοσοαπόκριση B κυττάρων.

Αν και τα αντισώματα MHC τάξης II ή τάξης I είναι ικανά να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων αντιστοίχως, δεν συμβαίνει το ίδιο με την παρεμπόδιση του υποδοχέα NKG2D. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η απόκριση των T-κυττάρων που επάγεται από τα MICA περιορίζεται στα κλασικά μόρια MHC, που συμφωνεί με την έμμεση αναγνώριση των πεπτιδίων MICA, που παρουσιάζονται από αντιγόνα MHC ξενιστή. Για να εξηγήσει την αποτελεσματική ανοσοαπόκριση, που προκαλείται από τα αντιγόνα MICA παρά τον περιορισμένο πολυμορφισμό και την πολύ λιγότερη ποσότητα MICA στην κυτταρική επιφάνεια σε σύγκριση με τα HLA, ο Stastny και η ομάδα του [87] πρότειναν ότι εκτός από την επίκτητη ανοσιακή απόκριση των T και B κύτταρων έναντι ενός αλλοαντιγόνου, τα MICA είναι επίσης ικανά να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς της επίκτητης ανοσίας. Η συν-διέγερση με εμπλοκή NK κυττάρων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της απόκρισης T και B κυττάρων. Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι τα MICA είναι μάλλον ανοσογόνα και ικανά να προκαλέσουν απόκριση από ένα μεγάλο εύρος κυττάρων μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αυτό θα μπορούσε να προκύψει από τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άγνωστους μικροοργανισμούς, την αύξηση του εύρους των αποκρινόμενων ανοσοκυττάρων, άλλους γενετικούς παράγοντες ενδεχομένως καθοριστικούς για το μέγεθος της συγκεκριμένης ανοσοαπόκρισης, ή ακόμα και τα δομικά χαρακτηριστικά των μορίων MICA, που τα καθιστούν ανοσογόνα. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν το σκεπτικό ότι τα αντιγόνα MICA παίζουν ρόλο στην απόρριψη ανθρώπινου αλλομοσχεύματος ενεργοποιώντας τόσο χυμικούς όσο και κυτταρικούς μηχανισμούς. Περαιτέρω, η αυξημένη ρύθμιση του NKG2D από τις ιντερλευκίνες, η ενεργοποίηση των NK κυττάρων (σε περίπτωση φλεγμονωδών καταστάσεων), η ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων που προκαλείται από τα NK κύτταρα και η επακόλουθη ενεργοποίηση αλλοδραστικών T κυττάρων, καθώς και η μεσολάβηση NKG2D σε ρυθμιστικά T κύτταρα θα μπορούσαν να συμβάλουν στην απόρριψη μοσχεύματος και απώλεια μοσχεύματος στη μεταμόσχευση [59]. Μπορεί να αναφερθεί ότι η επαγόμενη από κυτταρικό στρες έκφραση των MICA, όπως επί των νεφρικών

σωληναρίων, θα μπορούσε είτε να αυξήσει τη μεσολαβούμενη από NKG2D συν-διέγερση κυτταροτοξικών T κυττάρων, είτε την άμεση ενεργοποίηση αλλοδραστικών CD8+ T κυττάρων μέσω του ανεξάρτητου μηχανισμού T - cell Receptor - TCR [59], [88]. Ταυτόχρονα, συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα έχουν επισημάνει πιθανή συσχέτιση μεταξύ αντισωμάτων αντι- MICA και απόρριψης μοσχεύματος [89]. Οι πιθανοί μηχανισμοί για απόρριψη αλλομοσχεύματος με τη μεσολάβηση MIC περιλαμβάνουν ανάπτυξη αντι-MICA αντισωμάτων, αναγνώριση MIC σε αλλομοσχεύματα και κυτταροτοξικότητα από NKG2D.

Αλληλόμορφα MICA και συσχέτιση με ασθένειες

Το Σχήμα Α6 δείχνει το γονίδιο MICA πολύ κοντά στο HLA-B και HLA-C και προϊόντα αυτών των γονιδίων σχετίζονται με διάφορες διαταραχές, κυρίως αυτοάνοσες. Από τα αλληλόμορφα HLA-B (και συνεπώς HLA-C) βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με το MICA αλληλόμορφο πιστεύεται ότι ο πολυμορφισμός MICA μπορεί να επηρεάσει την αναγνώριση μέσω του NKG2D εκφράζεται σε γδ Τ-κύτταρα, τα οποία εμπλέκονται στην αυτοανοσία [64]. Πολλές ασθένειες, που ήταν γνωστό ότι σχετίζονται με τα αλληλόμορφα HLA-B και HLA-C, διερευνήθηκαν για την συσχέτιση με πολυμορφισμούς MICA. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώθηκαν στη τριπλέτα επανάληψης GCT στο εξόνιο 5 του γονιδίου MICA και όχι το αλληλόμορφο που ορίζεται από την εξωκυττάρια περιοχή του μορίου.

Μία από τις πρώτες ασθένειες που μελετήθηκαν ήταν η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (AS), γνωστή για τη σύνδεσή της με το HLA-B27. Μεταξύ των πρώτων δημοσιευμένων μελετών ήταν του Goto και συν. [90] που μελέτησαν τον πολυμορφισμό MICA σε Καυκάσιους ασθενείς (Ευρωπαίοι) με AS και βρήκε πολύ σημαντική σχέση με τα αλληλόμορφα MICA-A4 (τέσσερις επαναλήψεις GCT στο εξόνιο 5). Δύο ξεχωριστές μελέτες [91][92] αργότερα το επιβεβαίωσαν σε παρόμοιο πληθυσμό. Τα MICA*007 και *010 βρέθηκαν υψηλά, συσχετίστηκαν σημαντικά με την AS σε Ιάπωνες ασθενείς [93], αλλά μόνο το HLA B27 συσχετίστηκε σε μια μελέτη Καυκάσιων, Αφρικανών και Ασιατών ασθενών [94]. Μια πιο πρόσφατη μελέτη [95] διαπίστωσε ότι συσχετίστηκε η νεανική AS με έναν πολυμορφισμό στο 129, όπου και οι δύο

απλότυποι εξέφρασαν μεθειονίνη σε αντίθεση με τη βαλίνη. Αυτός ο πολυμορφισμός θεωρείται ότι σχετίζεται με ισχυρή (βαλίνη) ή ασθενής δέσμευση (μεθειονίνη) με NKG2D [78]. Μια άλλη μελέτη όμως, του 2020, έθεσε νέα ερωτήματα σχετικά με την ανεξάρτητη συσχέτιση των αλληλόμορφων MICA με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (AS) [96]. Τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν ασυμβίβαστα με προηγούμενες έρευνες, έδειξε ανεξάρτητη σχέση μεταξύ του HLA B-27 και του MICA*007: 01 και AS σε Αμερικανούς και Κινέζους.

Η νόσος του Behçet (BD) έχει επίσης βρεθεί από πολλές μελέτες να σχετίζεται με τα αλληλόμορφα MICA με 6 επαναλήψεις GCT (A6) ή MICA*009, καθώς επίσης συσχετίζεται και το HLA-B51. Η πρώτη δημοσιευμένη μελέτη αφορούσε Ιάπωνες ασθενείς με BD [97], όπου βρέθηκε συσχέτιση με A6 και HLA-B51. Ωστόσο, σημαντικός αριθμός B51 αρνητικών ασθενών είχαν επίσης MICA-A6, υποδηλώνοντας έναν ανεξάρτητο και πρωταρχικό ρόλο του MICA σε σχέση με την BD. Ωστόσο, μια μεταγενέστερη μελέτη [98] που περιλαμβάνει μικροδορυφορική ανάλυση γονιδίων συγκεντρωμένων γύρω από το HLA-B σε Ιάπωνες, Έλληνες και Ισπανούς ασθενείς, βρέθηκε ότι μόνο το HLA-B51 συσχετίστηκε σημαντικά με το BD και οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η σχέση με άλλα γονίδια ήταν το αποτέλεσμα της ανισορροπίας της σύνδεσης. Σε μια μελέτη (2002) της συσχέτισης MICA με BD σε Κορεάτες ασθενείς διαπίστωσε σημαντική σχέση με το MICA-A6, το οποίο ισχυρίστηκαν ότι ήταν ανεξάρτητο από το HLA-B51 [99] (2002), αλλά οι Mizuki et al επιβεβαίωσαν τα ευρήματά τους ότι δεν συσχετίστηκε με μια μελέτη Τούρκων ασθενών, όπου η ανάλυση αποκάλυψε ότι μόνο το B51 συσχετίστηκε με BD [97]. Μελέτη του 2019 κατέδειξε ότι το MICA*049, όχι το MICA * 009, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τους ασθενείς της Κίνας με BD και αυτό είναι ανεξάρτητο από το HLA-B*51 [100] και άλλη εργασία του 2018 ότι τα αλληλόμορφα MICA*006 και MICA*009 σχετίζονται με ευαισθησία BD σε θετικό τουρκικό πληθυσμό HLA-B*51, ιδιαίτερα σε ασθενείς με HLA-B*51 με MICA*006, οι οποίοι θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως διαγνωστικός βιοδείκτης για τη νόσο BD στο μέλλον [101].

Άλλες ασθένειες που διερευνήθηκαν για συσχέτιση με τα αλληλόμορφα MICA είναι η ψωρίαση [102], ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης [103], η νόσος του Addison, η νόσος Kawasaki [104], η ελκώδης κολίτιδα, η νόσος

του Chrohn, η κοιλιόκακη, η νόσος του Grave και η λέπρα [105]. Το πρόβλημα είναι ότι ενώ συνήθως υπάρχει συσχέτιση HLA, ο αριθμός των ασθενών που μελετήθηκαν είναι συχνά χαμηλός και πολύ λίγες μελέτες επιβεβαιώνονται στον ίδιο πληθυσμό ή επιβεβαιώνουν την ίδια ειδικότητα MICA. Συνεπώς, εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη σαφών στοιχείων για την πρωτογενή συσχέτιση των MICA αλληλόμορφων με οποιαδήποτε από αυτές τις ασθένειες.

MICA γονιδιακή έκφραση και πρωτεϊνική λειτουργία

Αν και έχουν ανιχνευθεί μεταγραφές MICA σε όλα τα κύρια όργανα εκτός από τον εγκέφαλο, τα γονίδια MICA εμφανίζουν περιορισμένη κατανομή ιστού σε σύγκριση με την έκφραση των γονιδίων HLA [70], [106]. Τα γονίδια MICA εκφράζονται σε επιθηλιακά κύτταρα, ειδικά στη γαστρεντερική οδό και στα κερατινοκύτταρα, αλλά όχι στα λεμφοκύτταρα ηρεμίας ή σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (DCs) [67]–[69]. Έτσι, η διασταύρωση με λεμφοκύτταρα δεν ανιχνεύει αντισώματα MICA. Ωστόσο, τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα έχουν αναφερθεί ότι εκφράζουν MICA [69]. Στην πραγματικότητα, οι πρωτεΐνες MICA έχουν επίσης βρεθεί σε αλλομοσχεύματα νεφρού, παγκρέατος και καρδιάς με ανάπτυξη οξείας και χρόνιας απόρριψης [107], [108]. Αυτά τα ευρήματα παρέχουν στοιχεία ότι το αντιγόνο MICA μπορεί να είναι δυνητικά στόχος τόσο για χυμικές όσο και για κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις κατά την απόρριψη μοσχεύματος. Εν τω μεταξύ, η έκφραση του MICA προκαλείται από βλάβη στο DNA, ιογενή λοίμωξη, φλεγμονή, και τραυματισμό ισχαιμίας - επαναιμάτωσης [66], [73], [74], [109]. Έτσι, το MICA το αντιγόνο μπορεί να είναι ένας δείκτης κυτταρικής καταπόνησης. Επιπλέον, τα αντιγόνα MICA παρατηρούνται επίσης συχνά σε καρκινικά κύτταρα [76], και αυτό έχει αυξήσει την πιθανότητα του ρόλου τους ως αντιγόνων που σχετίζονται με τον όγκο. Το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες MICA βρέθηκαν να είναι συνδέτες για την ανοσοδιεγερτική λεκτίνη τύπου C, όπως τα NKG2D, η οποία εκφράζεται σε κύτταρα NK, γδΤ κύτταρα και αβ CD8 + T κύτταρα, οδήγησε σε αύξηση ενδιαφέροντος για έρευνα στη μεταμόσχευση [110]. Ο NKG2D είναι ένας ενεργοποιητικός υποδοχέας σε κύτταρα NK και η αλληλεπίδραση MICA

NKG2D ενεργοποιεί την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (CTL), αντιδράσεις NK και παραγωγή κυτοκίνης [59], [111]. Έτσι, η άνω ρυθμιζόμενη έκφραση MICA μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς τα αποτελέσματα αλλομοσχεύματος μέσω σύνδεσης MICA-NKG2D. Επιπλέον, τα πολυμορφικά αντιγόνα MICA είναι ικανά να προκαλούν αντισώματα, τα οποία σκοτώνουν τα κύτταρα στόχους παρουσία συμπληρώματος [60]. Πράγματι, αρκετές μελέτες είχαν παρατηρήσει MICA σε νεφρικά, παγκρεατικά και καρδιακά αλλομοσχεύματα. Έτσι, τα MICA μπορεί να διαδραματίσουν βασικό ρόλο στη σύνδεση της φυσικής και επίκτητης ανοσιακής απόκρισης στη μεταμόσχευση οργάνων.

Αντισώματα MICA: Σημασία στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων

Μετά την αρχική εκδήλωση της έκφρασης των αντιγόνων MICA στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η προσοχή κατευθύνθηκε στην διερεύνηση της πιθανότητας αυτών των μορίων να είναι ένας στόχος για την καταστροφή μοσχεύματος, σε μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων. Σύντομα, η ίδια ομάδα ερευνητών έδειξε ότι αντισώματα στον ορό του ασθενούς θα μπορούσαν να αντιδρούν ειδικά με διαφορετικά ανασυνδυασμένα μόρια MICA [85]. Άλλοι συγγραφείς επίσης έδειξαν την έκφραση των MICA σε βιοψίες αλλομοσχεύματος νεφρού και παγκρέατος και επιβεβαίωσαν ότι είναι ένας στόχος για κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το Συμπλήρωμα, χρησιμοποιώντας τόσο μονοκλωνικά αντισώματα MICA ποντικού, όσο και ανθρώπινα αλλοαντισώματα [107]. Παρομοίως, σε μια μελέτη σε 139 λήπτες νεφρικών αλλομοσχευμάτων, των Sumitran-Holgersson και συν. [112] έδειξε σημαντική συσχέτιση αντισωμάτων MICA με απώλεια μοσχεύματος.

Έτσι, το έτος 2002 ήταν ένα σημαντικό ορόσημο καθώς αποδείχθηκε ότι η έκφραση των MICA σε ιστούς μοσχεύματος θα μπορούσε να οδηγήσει σε λύση με τη μεσολάβηση αντισωμάτων και ότι τα αντισώματα MICA θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην απόρριψη λόγω αντισωμάτων (AMR, Antibody - Mediated Rejection). Ακολούθησε μια νεκρή

περίοδος 3 ετών, πριν ο Mizutani και οι συν. [113] δημοσιεύσουν μια αναδρομική μελέτη της «παρακολούθησης δέκα χρόνων της παραγωγής αντισωμάτων HLA και MICA πριν από την απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος» παρέχοντας στοιχεία ότι οι ασθενείς που είχαν και τα δύο αντισώματα, απορρίπτουν τα μοσχευμά τους συχνότερα από εκείνους που δεν είχαν κανένα από αυτά τα αντισώματα. Μια άλλη μελέτη από τους ίδιους συγγραφείς [114] έδειξε ότι αντισώματα MICA που ανιχνεύθηκαν κατά την περίοδο πριν από τη μεταμόσχευση θα μπορούσαν να έχουν ρόλο στην ανάπτυξη της AMR. Οι προαναφερθείσες μελέτες μαζί με την ανάπτυξη πιο αξιόπιστης και κατάλληλης μεθόδου ελέγχου, με βάση σφαιρίδια Luminex άνοιξε το δρόμο για άλλες μελέτες, που διερευνούν τη συνάφεια και την επίδραση των αντισωμάτων MICA στην έκβαση του αλλομοσχεύματος. Κατά συνέπεια, τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξητική τάση των μελετών, που διερευνήσαν την επίδραση των αντισωμάτων MICA στην έκβαση του μοσχεύματος σε μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων, ιδιαίτερα στις μεταμοσχεύσεις νεφρών και καρδιάς και δευτερευόντως σε άλλα όργανα.

B. Ειδικό μέρος

Πρωτόκολλο

Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC) περιλαμβάνει 3,6 Mb και περιέχει 224 γονιδιακούς τόπους διαφορετικής λειτουργίας [115], [116]. Το γονίδιο MICA είναι πολύ πολυμορφικό που βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (περιοχή 6p21.33), κοντά στον τόπο HLA-B [57], [58]. Το γονίδιο MICA εκφράζεται υπό κυτταρικό στρες και το προϊόν του είναι γλυκοπρωτεΐνη 43kDa [66]. Η δομή της πρωτεΐνης MICA αποτελείται από τρεις εξωκυτταρικούς τομείς (ο τομέας α1 που κωδικοποιείται από το εξόνιο 2, α2 από το εξόνιο 3 και α3 από το εξόνιο 4) μια διαμεμβρανική περιοχή (TM), που κωδικοποιείται από το εξόνιο 5 και μια καρβοξυ-τελική κυτταροπλασματική ουρά που κωδικοποιείται από το εξόνιο 6 [63]. Η πρωτεΐνη MICA δρα ως προσδέτης για την ενεργοποίηση του υποδοχέα NKG2D που εκφράζεται σε κύτταρα NK, γδ Τ κύτταρα και CD8+ αβ Τ κύτταρα [117], [118]. Ο τόπος MICA βρίσκεται 46kb κεντρομερές HLA-B και αυτή η μικρή απόσταση οδηγεί σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ αυτών των δύο τόπων. Τα διαφορετικά εξόνια του MICA παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό [119] και μέχρι στιγμής 224 αλληλόμορφα έχουν χαρακτηριστεί όπως φαίνεται στη βάση δεδομένων IMGT / HLA (προσπελάστηκε το Νοέμβριο του 2020, <http://HLA.alleles.org/alleles/classo.html>) με συνεχώς νέα αλληλόμορφα να προστίθενται [120]. Τα πολυμορφικά μόρια των αντιγόνων MICA εκφράζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, γαστρεντερικό επιθήλιο, μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα [66]–[68]. Η παρουσία ορισμένων αλληλόμορφων MICA έχει συσχετιστεί με φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες και τα αντισώματα MICA έχουν εμπλακεί σε απόρριψη αλλομοσχεύματος οργάνων ή νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD) [63], [79], [121]. Ο πιθανός ρόλος της επαγόμενης από MICA χυμικής απόκρισης στην απόρριψη μοσχεύματος στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων έχει προσελκύσει ενδιαφέρον πρόσφατα μέσω αρκετών μελετών που διερευνούν την παθογόνο επίδραση των αντισωμάτων MICA [79], [119], [122]–[126]. Τα μόρια MICA σχετίζονται με την απόρριψη μοσχεύματος μέσω κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από κύτταρα NK και μέσω της

παραγωγής ανοσοκατασταλτικών διαλυτών σωματιδίων MICA. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν επίσης, ότι το διαλυτό στον ορό MICA αποτελεί πιθανό προγνωστικό δείκτη για διάφορους καρκίνους του ανθρώπου [127], [128]. Η γνώση της πληθυσμιακής κατανομής των MICA αλληλόμορφων και της κατανομής των MICA και της ανισορροπίας σύνδεσης τους με τα HLA τάξης I, θα βοηθήσει την κατανόησή μας για την πιθανή λειτουργική σημασία των πολυμορφισμών των MICA. Τα δεδομένα σχετικά με την κατανομή των γονιδίων MICA στον ελληνικό πληθυσμό είναι περιορισμένα με δύο δημοσιευμένες μελέτες. Η πρώτη από τους Yabuki et al, 1999 [129], η οποία εξέτασε 38 Έλληνες ασθενείς με νόσο Behchet (BD) και 40 υγιή άτομα με αντίστοιχο προφίλ, και διαπίστωσε ότι η φαινοτυπική συχνότητα του αλληλόμορφου MICA-TM A6 ήταν σημαντικά αυξημένη στους Έλληνες ασθενείς με νόσο BD. Η άλλη εργασία των Ota et al, 1997 [130] μελέτησε τις συχνότητες πέντε πολυμορφισμών στο διαμεμβρανικό τμήμα του γονιδίου MICA σε 27 υγιείς Έλληνες.

Με την έρευνα αυτή έγινε προσπάθεια να μελετηθούν και να διερευνηθούν διεξοδικότερα τα αλληλόμορφα MICA, καθώς και η ανισορροπία σύνδεσης (LD) με τον τόπο HLA-B στον ελληνικό πληθυσμό, για τα οποία τα μέχρι στιγμής δεδομένα είναι εξαιρετικά περιορισμένα.

Υλικό

Δείγματα

Σε σχέση με το υλικό που μελετήθηκε, αυτό προέρχεται από δείγμα DNA που ελήφθη από 277 ($2n = 554$) υγιή άτομα, ελληνικής καταγωγής, μη συγγενείς μεταξύ τους, με τα δύο φύλα αντιπροσωπεύονται εξίσου. Τα δείγματα προέρχεται από το αρχείο της δεξαμενής Εθελοντών Δοτών Προγονικών Αιμοποιητικών κυττάρων (Stem Cells) του Εθνικού Κέντρου Ιστοσυμβατότητας, που επιλέχθηκαν τυχαία από όλη την χώρα. Συλλέχθηκε αίμα σε σωληνάρια κενού με αντιπηκτικό EDTA και η εκχύλιση DNA πραγματοποιήθηκε με κιτ εκχύλισης DNA (Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του εκχυλισμένου DNA ρυθμίστηκε με τη μέθοδο οπτικής πυκνότητας. Οι εθελοντές είχαν δώσει

συγκατάθεση μετά από ενημέρωση για τη μελέτη, σύμφωνα με τον Κώδικα Δεοντολογίας της Παγκόσμιας Ιατρικής Ένωσης (Declaration of Helsinki).

Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μέθοδος

Γονοτύπος

Ως προς τη διαδικασία της μεθόδου, στην πρώτη φάση, καθορίστηκαν με μοριακές τεχνικές οι συχνότητες των MICA αλληλομόρφων στο παραπάνω δείγμα. Αρχικά έγινε MICA τυποποίηση με τεχνική ανάστροφη PCR – SSOP (χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit LABType® RSSO της ONE LAMBDA). Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης πολυμεράσης (PCR) με ειδικές αλληλουχίες βασισμένες στην τεχνολογία Luminex. Τα εξόνια 2, 3 και 4 + 5 που κωδικοποιούν 3 εξωκυτταρικές περιοχές πολλαπλασιαστηκαν καθώς επίσης και το εξόνιο 5 που κωδικοποιεί την διαμεμβρανική περιοχή. Για τη γονοτύπηση των αλληλόμορφων MICA χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ανάλυσης HLA Fusion (oneL) με τη βάση δεδομένων IMGT / HLA (International Immunogenetics Information System / Human Leucocyte Antigen). Το kit που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη περιείχε 45 σφαιρίδια (συμπεριλαμβανομένων 3 θετικών μαρτύρων και 1 αρνητικού μάρτυρα) επιτρέποντας την αναγνώριση 55 αλληλίων.

Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στο Παράστημα I

Ανιχνεύθηκαν οι ακόλουθοι διφορούμενοι συνδυασμοί αλληλομόρφων, που προέκυψαν, είτε από πολυμορφισμούς στις καλυπτόμενες περιοχές που δεν ανιχνεύθηκαν από τους χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές, είτε από πολυμορφισμούς εκτός των χαρακτηρισμένων εξωνίων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν και έγινε προσπάθεια να διαχωριστούν τα παρακάτω διφορούμενα αποτελέσματα:

- το MICA*004/009 (η διαφορά τους έγκειται στη θέση 611 του εξονίου 3 στην οποία το MICA*004 έχει G ενώ το MICA*009 έχει C)
- το MICA*009/049 (η διαφορά τους βρίσκεται στη θέση 1067 του εξονίου 6 στην οποία το MICA*009 έχει C ενώ το MICA*049 έχει T)

- το MICA*016/019 (η διαφορά τους βρίσκεται στη θέση 730 του εξονίου 4 στην οποία το MICA*016 έχει C ενώ το MICA*019 έχει το G)
- το MICA*002/020 (η διαφορά τους έγκειται στον αριθμό των επαναλήψεων GCT στο εξόνιο 5 όπου το MICA*002 έχει πέντε επαναλήψεις ενώ το MICA*020 έχει δέκα επαναλήψεις).

Στο Σχήμα Β1 φαίνονται οι γονιδιακές περιοχές για τις οποίες έγινε Pyrosequencing.

```

<< <C> >> Exon5
cDNA/Intr.      940      950      960      970      980
MICA*00201 CATGTTTCTG CTGTTGCTGC T...GCTGCTGCTGCTGCTGCT...ATT TTTGTTATTA TTATTTCTA C
MICA*020 -----GCT-----

<< <C> >> Exon3 Exon3] [Exon4
cDNA/Intr.      610 613      620      630      640
MICA*004 CTGAGGAGAA GAG TGCCCC CATGGTGAAT GTCACCCGCA C
MICA*00901 ----- C-----

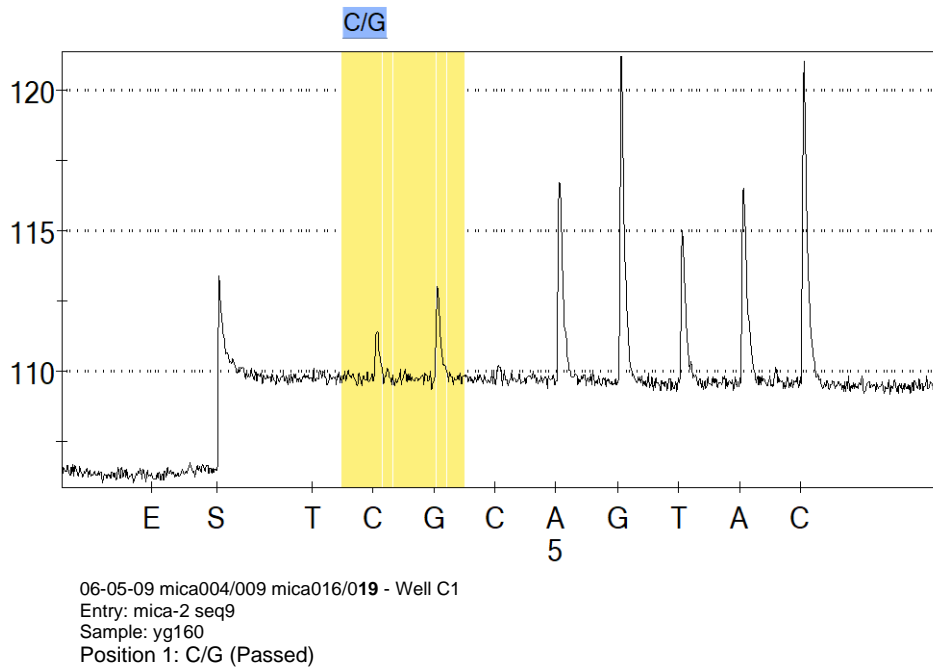
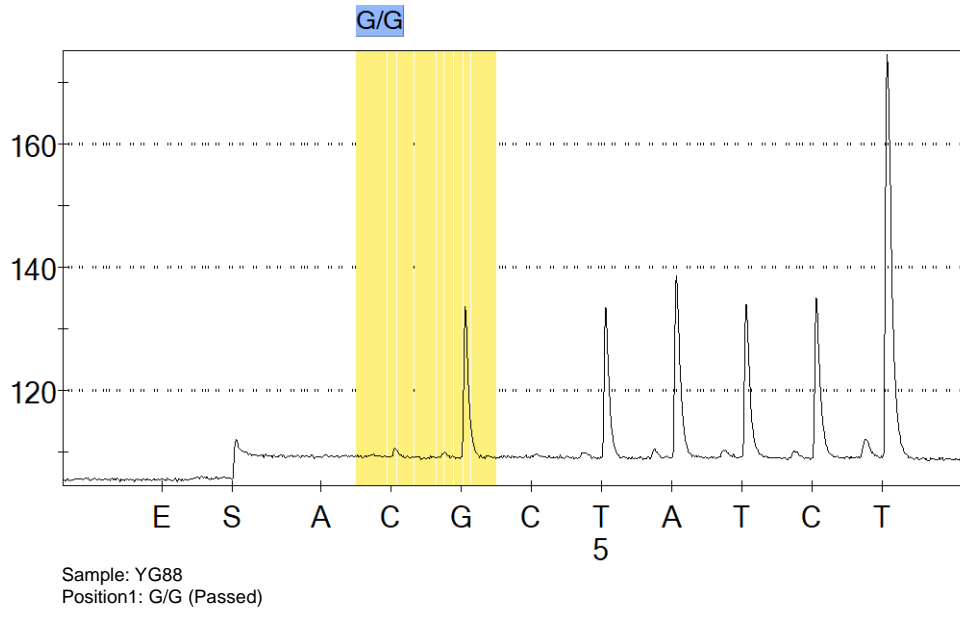
<< <C> >> Exon6
cDNA/Intr.      1040 1050 1060 1070 1080 1090
MICA*00901 TGAGCCTGCA GGTCTGGAT CAACACCCAG TTGGGACGAG TGACCACAGG GATGCCACAC
MICA*049 -----T-----

<< <C> >> Exon4
cDNA/Intr.      720      730      740      750      760
MICA*016 GACCTGGCGT CAGGATGGGC TATCTTTGAG CCACGACACC CAGCAGTGGG
MICA*019 -----G-----

```

Σχήμα Β1: Εμφανίζονται οι γονιδιακές περιοχές που έγινε pyrosequencing

Αυτοί οι διφορούμενοι αλληλικοί συνδυασμοί MICA επιλύθηκαν σε β' φάση, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο πυροαλληλούχησης – Pyrosequencing™ (Biotage) τεχνολογία που βασίζεται στην ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μετά από σύνθεση (Sequence-based typing - SBT). Το Pyrosequencing είναι μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας DNA σε πραγματικό χρόνο που χρησιμοποιεί ένα σύστημα ενζύμων - αλληλουχιών, για την ανάλυση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single - nucleotide polymorphisms SNPs). Το προϊόν PCR επωάζεται με 4 ένζυμα, DNA Πολυμεράση, Sulfyrase, Luciferase και Απυράση και συγκεκριμένα υποστρώματα, γίνεται αντίδραση πολυμερισμού DNA που εκπέμπει φως κάθε φορά που ένα νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται για να σχηματίσει ζεύγος βάσεων με τη συμπληρωματική βάση σε ένα κλώνο προτύπου DNA. Η Απυράση αποικοδομεί την ποσότητα νουκλεοτιδίων που δεν χρησιμοποιήθηκαν ώστε στη συνέχεια να προστεθεί επόμενο νουκλεοτίδιο. Το φωτεινό σήμα είναι ανάλογο των νουκλεοτιδίων, μετατρέπεται ποσοτικά και εκφράζεται σε γράφημα (Πυρόγραμμα) όπως φαίνεται στο Σχήμα Β2. Η διαδικασία χρησιμοποιεί πρωτόκολλο στερεάς φάσης. Είναι μια εύκολη μέθοδος ανάλυσης SNP, γρήγορη και ακριβής [131]. Η μέθοδος πυροαλληλούχησης - Pyrosequencing™ περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα II.



Σχήμα Β2. Πυρόγραμμα

Στατιστική Ανάλυση

Οι συχνότητες των αλληλόμορφων MICA και HLA-B εκτιμήθηκαν με άμεση μέτρηση, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα δείγματα με ένα μόνο αλληλόμορφο ήταν ομόζυγα και ότι το αλληλόμορφο μετρήθηκε δύο φορές στην ανάλυση. Η σύγκριση της διαφοράς μεταξύ των δεδομένων μας και των δεδομένων που ελήφθησαν από άλλους πληθυσμούς πραγματοποιήθηκε μέσω του Mann-Whitney U test. Η μηδενική υπόθεση όλων των συγκρίσεων ήταν ότι η κατανομή κάθε πολυμορφισμού που εξετάστηκε είναι ίδια σε όλες τις χώρες. Χρησιμοποιήθηκε two-tailed test και οι τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS Statistics v27.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Δοκιμάστηκε και επιβεβαιώθηκε η συνοχή με την ισορροπία των γονότυπων Hardy-Weinberg. Η ανισορροπία σύνδεσης (LD) υπολογίστηκε με τα στατιστικά εργαλεία του hla-net (<https://hla-net.eu/tools/basic-statistics>) καθώς και με το Arlequin ver.3.11 που χρησιμοποιείται για ανάλυση γενετικών πληθυσμών [132].

Αποτελέσματα

Αρχικά με την μέθοδο PCR-SSOP, καθορίστηκαν 13 MICA αλληλόμορφα και εντοπίστηκαν 21 συνδυασμοί αλληλομόρφων (πίνακες B1, B2). Το ποσοστό αντιστοιχεί στο 53% του συνόλου (291 από 554 αλληλόμορφα).

MICA Αλληλόμορφα	N	Ποσοστό (%)
<i>MICA</i> *001	2	0,36
<i>MICA</i> *004	34	6,14
<i>MICA</i> *006	13	2,35
<i>MICA</i> *008	115	20,76
<i>MICA</i> *010	5	0,90
<i>MICA</i> *011	11	1,99
<i>MICA</i> *012	12	2,17
<i>MICA</i> *015	1	0,18
<i>MICA</i> *017	10	1,81
<i>MICA</i> *018	76	13,72
<i>MICA</i> *027	7	1,26
<i>MICA</i> *029	1	0,18
<i>MICA</i> *047	5	0,90

Πίνακας Β1. Καθορισθέντα MICA αλληλόμορφα (α' φάση, με μέθοδο PCR-SSOP)

Συνδυασμός <i>MICA</i> * Αλληλομόρφων	N	
02/17/20/30/52/55	1	*
02/20	47	*
02/20/30/52/55	10	*
02/20/55	22	*
07/26/29/45	4	
07/26/45	5	
07/29	2	
09/49	104	*
10/54	3	
12/21	4	
16/19	14	*
16/19/33	22	*
02/17/20/30/52	2	*
02/20/30/52	2	*
02/20/41	1	*
04/09/41	9	*
07/26	6	
10/16/19/33	1	*
10/16/19/33/54	1	*
12/18	1	
12/18/21	3	

Πίνακας B2. Συνδυασμοί *MICA* αλληλομόρφων (α΄ φάση, με μέθοδο PCR-SSOP). Ο (*) δηλώνει τον διαχωρισμό των αλληλομόρφων με pyrosequencing.

Από τους συνδυασμούς αυτούς όπως φαίνονται στον παραπάνω πίνακα (B2), περίπου το 8%, είναι *MICA*002 - MICA*020* και συνδυασμοί τους.

Με τη μέθοδο αυτή διαχωρίστηκαν τα *MICA*004* με τα *MICA*009* (η διαφορά τους βρίσκεται στη θέση 611 του εξωνίου 3 το *MICA*004* έχει G ενώ το *MICA*009* έχει C), τα *MICA*009* με τα *MICA*049*, (η διαφορά τους βρίσκεται στη θέση 1067 του εξωνίου 6 το *MICA*009* έχει C ενώ το *MICA*049* έχει T), τα *MICA*016* με τα *MICA*019*, (η διαφορά τους βρίσκεται στη θέση 730 του εξωνίου 4 το *MICA*016* έχει C ενώ το *MICA*019* έχει G), τα *MICA*002* με τα *MICA*020* (η διαφορά τους βρίσκεται στον αριθμό των επαναλήψεων GCT στο εξωνίο 5 το *MICA*002* έχει 9 ενώ το *MICA*020* έχει 10), όπως εμφανίζονται στο σχήμα B1.

Με τη μέθοδο Pyrosequencing, έγινε δυνατός ο καθορισμός 18 αλληλόμορφων, όπως φαίνονται παρακάτω (πίνακας B3), με τα αντίστοιχα ποσοστά τους, ανεβάζοντας το συνολικό ποσοστό αλληλομόρφων που διαχωρίστηκαν στο 86%. Συνολικά 237 άτομα ($2n = 474$) από συνολικά 277 άτομα ($2n = 554$), καθώς για ορισμένα δείγματα δεν υπήρχε επαρκής ποσότητα DNA προς ανάλυση.

Ειδικότερα τα πιο συχνά αλληλόμορφα ήταν: *MICA*008*, *MICA*009*, *MICA*018*, με συχνότητες μεγαλύτερες από 15%. Αυτά τα αλληλόμορφα αφορούν το 53,8% του Ελληνικού πληθυσμού. Το *MICA*008* είχε την υψηλότερη συχνότητα αλληλόμορφων (24,26%) ακολουθούμενο από το *MICA*009* (22,36%) και το *MICA*018* (16,03%). Άλλα αλληλόμορφα με υψηλές συχνότητες (> 5%) ήταν *MICA*002* (8,02%), *MICA*004* (7,17%) και *MICA*016* (5,91%) όπως φαίνεται στον Πίνακα B3.

MICA Αλληλόμορφα	Συνολικός αριθμός αλληλομόρφων	Συχνότητα (Συνολικός αριθμός/2n)
<i>MICA</i> *001	2	0.004
<i>MICA</i> *002	(0) 38	0.080
<i>MICA</i> *004	34	0.072
<i>MICA</i> *006	13	0.027
<i>MICA</i> *008	115	0.243
<i>MICA</i> *009	(0) 106	0.224
<i>MICA</i> *010	5	0.011
<i>MICA</i> *011	11	0.023
<i>MICA</i> *012	12	0.025
<i>MICA</i> *015	1	0.002
<i>MICA</i> *016	(0) 28	0.059
<i>MICA</i> *017	10	0.021
<i>MICA</i> *018	76	0.160
<i>MICA</i> *019	(0) 3	0.006
<i>MICA</i> *027	7	0.015
<i>MICA</i> *029	1	0.002
<i>MICA</i> *047	5	0.011
<i>MICA</i> *049	(0) 7	0.015

Πίνακας Β3. MICA αλληλόμορφα στον Ελληνικό πληθυσμό, όπως καθορίστηκαν στην παρούσα μελέτη. Συνολικός αριθμός ήταν 2n = 474 που είναι το 86% του συνολικού αριθμού αλληλομόρφων που μελετήθηκαν, 2n=554). Σε παρένθεση ο αριθμός τους πριν το διαχωρισμό με πυροαλληλούχηση.

Συζήτηση

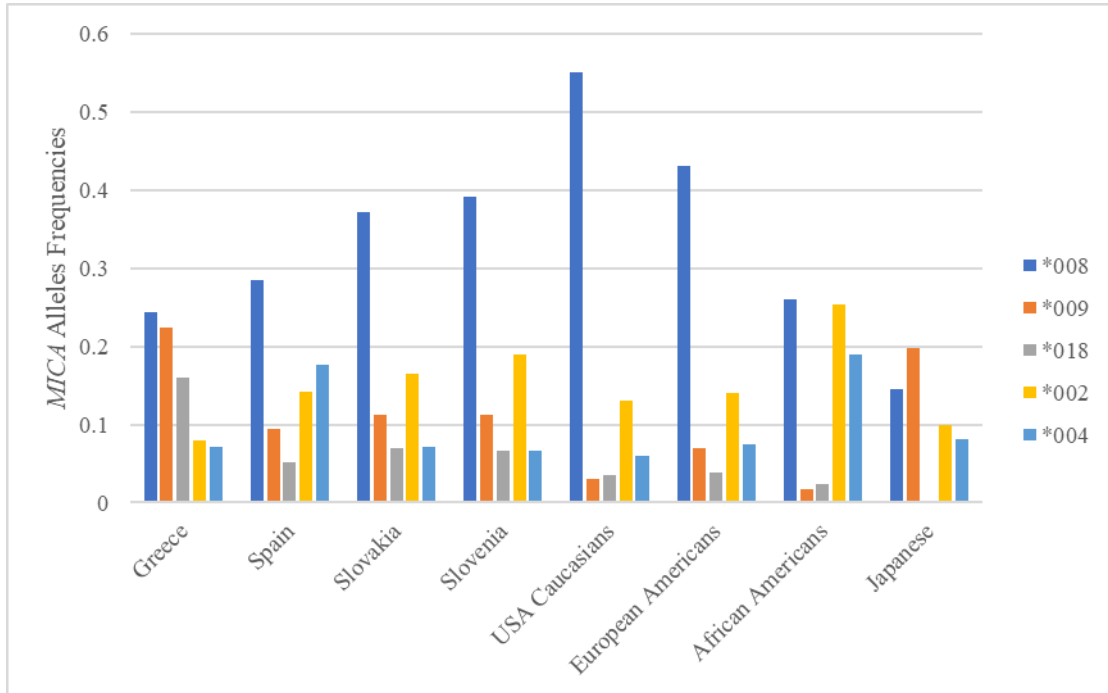
Τα πέντε πιο συχνά MICA αλληλόμορφα στον ελληνικό πληθυσμό (MICA*008, *009, *018, *002, *004) αντιπροσωπεύουν το 77,8% όλων των αλληλομόρφων (Πίνακας Β4). Έγινε σύγκριση με δεδομένα από άλλες μελέτες όπως αναλύονται παρακάτω. Το MICA*008 ήταν το πιο κοινό αλληλόμορφο στην παρούσα μελέτη και σε άλλους επτά πληθυσμούς τόσο Καυκάσιας και μη Καυκάσιας φυλής που είχαν δημοσιευτεί προηγουμένως, όπως φαίνεται στον Πίνακα Β4. Σε άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς, τα αλληλόμορφα *002 και *004 ήταν επίσης μεταξύ των πιο συχνών, ειδικά το *002 που παρατηρήθηκε σε συχνότητες υπερδιπλάσιες σε σύγκριση με τον ελληνικό πληθυσμό (Πίνακας Β4). Συνολικά, η αθροιστική συχνότητα των τριών αλληλόμορφων (MICA*008, *002, *004) ήταν 39,5% στον ελληνικό πληθυσμό, ενώ οι συχνότητες αλληλόμορφων των MICA*008, *002 και *004 στους Ευρωπαίους Αμερικανούς και τους Καυκάσιους των ΗΠΑ αντιπροσωπεύουν 64,7% και 74%, αντίστοιχα [133], [134]. Παρόμοιες συχνότητες για αυτά τα τρία αλληλόμορφα βρέθηκαν στην Ισπανία (56,3%), στη Σλοβακία (60,9%) και στη Σλοβενία (54,9%) [135]–[137]. Στον ελληνικό πληθυσμό, η πρώτη αξιοσημείωτη διαφορά (αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική) ήταν ότι οι αυξημένες συχνότητες (πάνω από 15%) των MICA*009 (22,36%) και MICA*018 (16,03%) που παρατηρήθηκαν ενώ η συχνότητα των αλληλόμορφων MICA*009 και MICA*018 είναι μικρότερη από 10% σε άλλους πληθυσμούς Καυκάσιων και Αφροαμερικανών [133]–[135]. Ωστόσο, το αλληλόμορφο MICA*009 βρέθηκε πάνω από 10% στη Σλοβενία και τη Σλοβακία [136], [137]. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συχνότητα του MICA*009 είναι επίσης υψηλή στον ιαπωνικό πληθυσμό (19,7% στη μελέτη των Obutsi *et al*, 2000 και 18,4% στη μελέτη των Komatsu-Wakui *et al*, 1999) [138], [139], δείχνοντας στενή ομοιότητα με τον ελληνικό πληθυσμό. Μια άλλη διαφορά (δεν είναι στατιστικά σημαντική) ήταν ότι αν και το MICA*002 θεωρείται ένα από τα πιο συχνά αλληλόμορφα MICA σε άτομα Καυκάσιας προέλευσης (συχνότητες άνω του 10%), παρατηρήθηκε λιγότερο συχνά (8,02%) στον

ελληνικό πληθυσμό (Πίνακας Β4) και γραφική αποτύπωση τους στα σχήματα Β3 και Β4.

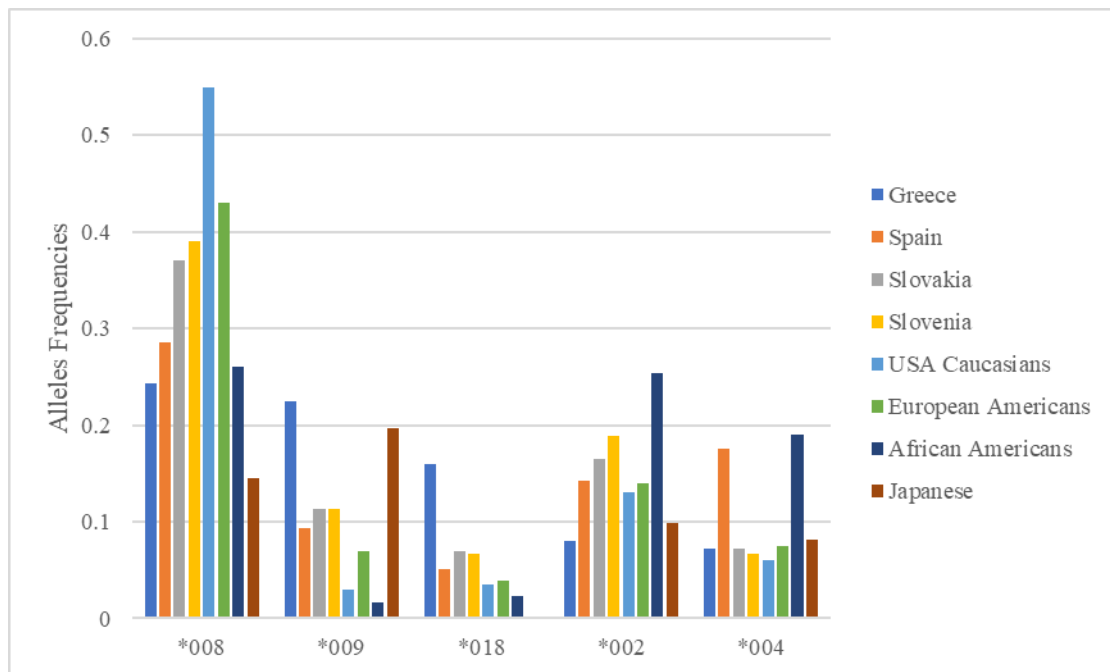
<i>MICA</i> allele	Greece (2 <i>n</i> =474)	Spain ¹ (2 <i>n</i> =330)	Slovakia ² (2 <i>n</i> =248)	Slovenia ³ (2 <i>n</i> =140)	USA Caucasians ⁴ (2 <i>n</i> =484)	European Americans ⁶ (2 <i>n</i> =2490)	African Americans ⁶ (2 <i>n</i> =1210)	Japanese ⁷ (2 <i>n</i> =304)
*008	0.243	0.285	0.371	0.391	0.550	0.431	0.266	0.145
*009	0.224	0.094	0.113	0.113	0.030	0.071	0.017	0.197
*018	0.160	0.051	0.069	0.067	0.035 ⁵	0.039	0.023	-
*002	0.080	0.142	0.165	0.189	0.130	0.141	0.254	0.099
*004	0.072	0.176	0.072	0.067	0.060	0.075	0.191	0.082

¹[135], ²[136], ³[137], ⁴[140], ⁵[134] (in *n*=103), ⁶[133], ⁷[138], *p* values >0.05 σε όλες τις περιπτώσεις (στατιστικά μη σημαντικό)

Πίνακας Β4. Τα πέντε πιο κοινά αλληλόμορφα *MICA* στον ελληνικό πληθυσμό και οι συχνότητές τους σε ομάδες της Ευρώπης, της Βόρειας Αμερικής και της Ιαπωνίας (σε περιπτώσεις όπου έχουν δημοσιευτεί περισσότεροι από ένας πληθυσμοί για μια χώρα, επιλέχθηκαν πληθυσμοί με τον υψηλότερο αριθμό αλληλίων που αναλύθηκαν η βάση δεδομένων allelefrequencies.net, Gonzalez-Galarza et al, 2015) [141]. Η συχνότητα αλληλόμορφων εμφανίζεται με τρία δεκαδικά ψηφία, όπως φαίνεται στη βάση δεδομένων.



Σχήμα Β3. Διάγραμμα στο οποίο εμφανίζεται για κάθε χώρα η συχνότητα αλληλόμορφων MICA



Σχήμα Β4. Διάγραμμα στο οποίο εμφανίζεται κάθε συχνότητα αλληλόμορφων MICA ανά χώρα

Καθώς είναι γνωστό, η στενή εγγύτητα του γονιδίου MICA και του τόπου HLA-B οδηγεί σε πολύ ισχυρή επίδραση ανισορροπίας σύνδεσης (LD) μεταξύ των δύο, όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς [93], [133], [142]–[144].

Τα δείγματα αυτά που τυποποιήθηκαν για τα MICA είχαν τυποποιηθεί και για HLA. Έχοντας αυτό ως βάση συσχέτισαμε MICA και HLA-B.

Ορισμένοι γνωστοί συσχετισμοί MICA και HLA-B επιβεβαιώθηκαν επίσης στον ελληνικό πληθυσμό, όπως καταγράφονται στον Πίνακα Β5. Συνολικά, εντοπίστηκαν 24 απλότυποι MICA ~ HLA-B με τους πιο συνηθισμένους να είναι MICA*018 ~ B*18 (12,5%) και MICA*009 ~ B*51 (11,5%). Τα αλληλόμορφα σε αυτούς τους δύο απλότυπους παρατηρήθηκαν με την υψηλότερη τιμή ανισορροπίας σύνδεσης D - όπως προέκυψε υπολογιστικά με τα στατιστικά εργαλεία του hla-net (<https://hla-net.eu/tools/basic-statistics>) και του Arlequin [132] - (MICA*018 ~ B*18, D=0.11, D'=0.80, r²=0.64 and MICA*009 ~ B*51, D=0.08, D'=0.50, r²=0.21). Η πλειονότητα (71%) συσχετίσεων του MICA με αλληλόμορφα HLA-B βρέθηκε στα πέντε κυρίαρχα αλληλόμορφα MICA. Πιο συγκεκριμένα, το MICA*008 συνδέθηκε με 6 αλληλόμορφα HLA-B (B*07, B*08, B*13, B*15, B*37, B*44), το MICA*009 με 3 (B*51, B*52, B*35), MICA*018 με 1 (B*18), MICA*002 με 4 (B*35, B*38, B*39, B*58) και MICA*004 με 3 (B*41, B*44, B*49) αλληλόμορφα HLA-B. Η αξιοσημείωτη συχνότητα αυτών των απλότυπων μάς επέτρεψε να αποδείξουμε ότι η κατανομή απλότυπου έδειξε υψηλό βαθμό διακύμανσης, που εξαρτιόταν σε μεγάλο βαθμό από την κατανομή των αλληλόμορφων HLA-B που αναφέρθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό.

<i>MICA</i> ~ <i>HLA-B</i> haplotypes	HF (haplotype frequency)	%
<i>MICA</i> *002 ~ <i>HLA-B</i> *35	0,0561	5,61
<i>MICA</i> *002 ~ <i>HLA-B</i> *38	0,0181	1,81
<i>MICA</i> *002 ~ <i>HLA-B</i> *39	0,0344	3,44
<i>MICA</i> *002 ~ <i>HLA-B</i> *58	0,0126	1,26
<i>MICA</i> *004 ~ <i>HLA-B</i> *49	0,0289	2,89
<i>MICA</i> *004 ~ <i>HLA-B</i> *44	0,0144	1,44
<i>MICA</i> *004 ~ <i>HLA-B</i> *41	0,0144	1,44
<i>MICA</i> *006 ~ <i>HLA-B</i> *51	0,0217	2,17
<i>MICA</i> *007 ~ <i>HLA-B</i> *27	0,0181	1,81
<i>MICA</i> *008 ~ <i>HLA-B</i> *44	0,0452	4,52
<i>MICA</i> *008 ~ <i>HLA-B</i> *08	0,0434	4,34
<i>MICA</i> *008 ~ <i>HLA-B</i> *07	0,0253	2,53
<i>MICA</i> *008 ~ <i>HLA-B</i> *15	0,0163	1,63
<i>MICA</i> *008 ~ <i>HLA-B</i> *37	0,0163	1,63
<i>MICA</i> *008 ~ <i>HLA-B</i> *13	0,0144	1,44
<i>MICA</i> *009 ~ <i>HLA-B</i> *51	0,1154	11,5
<i>MICA</i> *009 ~ <i>HLA-B</i> *35	0,0271	2,71
<i>MICA</i> *009 ~ <i>HLA-B</i> *52	0,0217	2,17
<i>MICA</i> *010 ~ <i>HLA-B</i> *15	0,0108	1,08
<i>MICA</i> *011 ~ <i>HLA-B</i> *14	0,0163	1,63
<i>MICA</i> *012 ~ <i>HLA-B</i> *55	0,0217	2,17
<i>MICA</i> *016 ~ <i>HLA-B</i> *35	0,0634	6,34
<i>MICA</i> *017 ~ <i>HLA-B</i> *57	0,0181	1,81
<i>MICA</i> *018 ~ <i>HLA-B</i> *18	0,1254	12,5

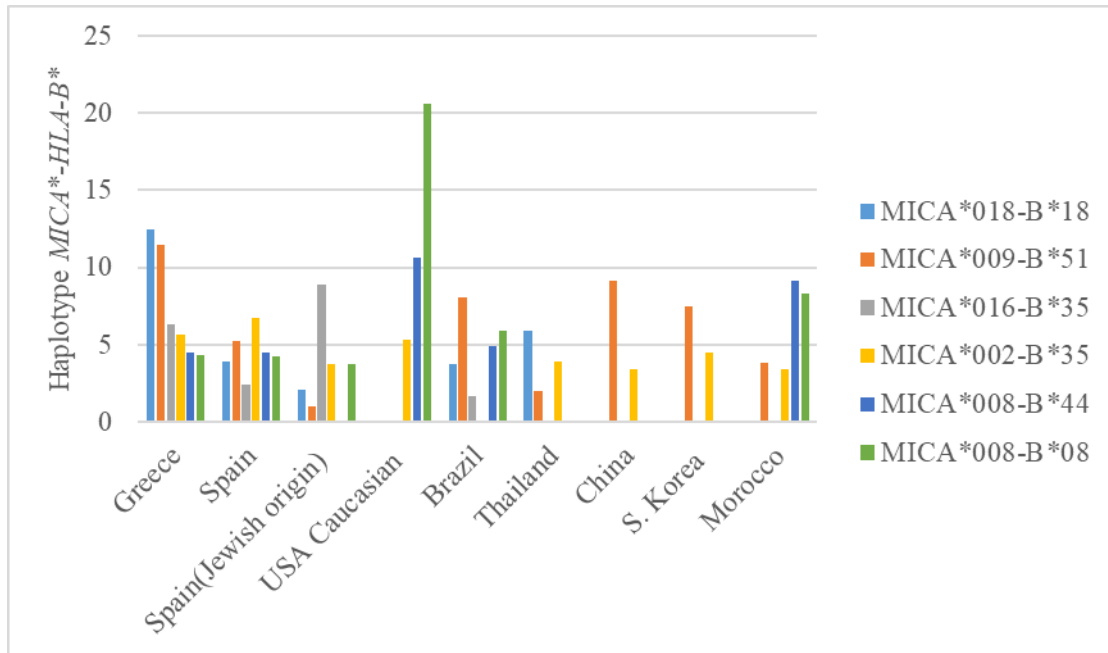
Πίνακας Β5. Κατανομή των πιο κοινών συχνοτήτων απλότυπων *MICA** ~ *HLA-B** στον ελληνικό πληθυσμό (2n = 474). Παρατίθενται μόνο απλότυποι με συχνότητα > 1%

Οι συχνότεροι απλότυποι MICA* ~ HLA-B* στον ελληνικό πληθυσμό συγκρίθηκαν με τις συχνότητες συσχέτισης που βρέθηκαν σε άλλους πληθυσμούς (Πίνακας Β6 και σχήματα Β5 και Β6). Ο ισπανικός πληθυσμός έχει τις περισσότερες ομοιότητες με εξαίρεση το MICA*018 ~ B*18, το οποίο παρατηρήθηκε με το υψηλότερο ποσοστό (12,5%) στον ελληνικό πληθυσμό, αλλά μόνο με 3,9% στον ισπανικό. Ο ίδιος απλότυπος ταυτοποιήθηκε επίσης με χαμηλότερες συχνότητες στους πληθυσμούς της Ταϊλάνδης και της Βραζιλίας. Το MICA*009 ~ B*51 υπάρχει στους περισσότερους πληθυσμούς με ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα στους πληθυσμούς της Κίνας και της Νότιας Κορέας. Το HLA-B*51 είναι γνωστό ότι σχετίζεται με τη νόσο του Behcet (BD) σε πολλές εθνοτικές ομάδες [129], [130] και έχει βρεθεί ότι τόσο το HLA-B*51 όσο και το MICA*009 συσχετίστηκαν έντονα με τη BD, σε συμπαγή πληθυσμό, Καυκασίων ασθενών με BD [145] και σε Τούρκους ασθενείς [146] και τα δύο αλληλόμορφα ήταν σε ανισορροπία σύνδεσης (LD).

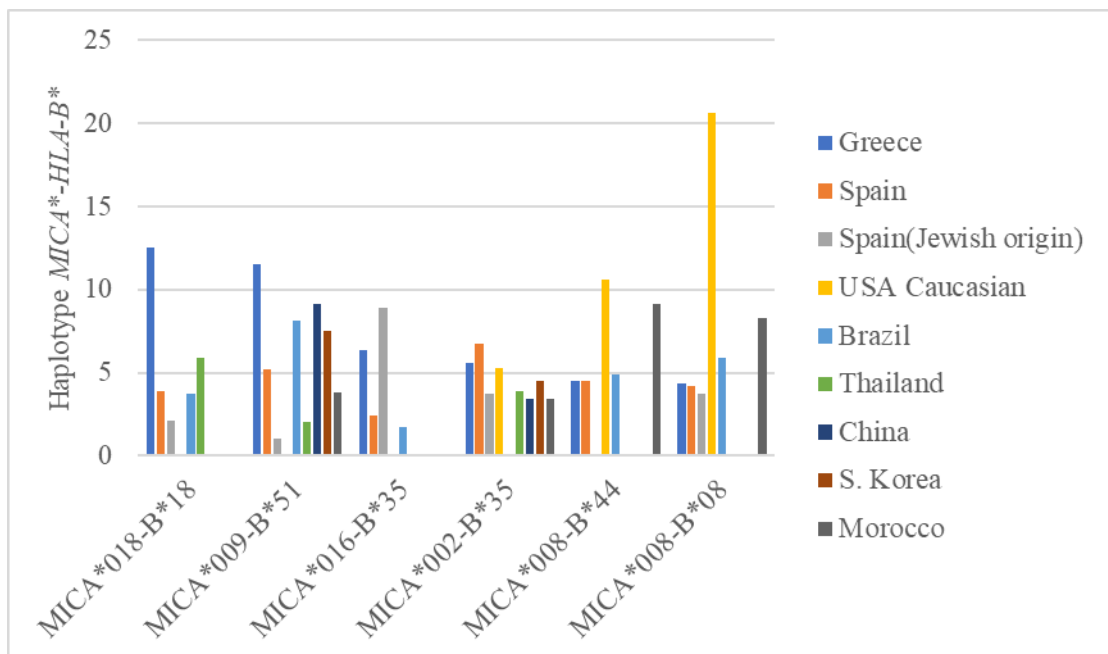
Haplotype <i>MICA* ~</i> <i>HLA-B*</i>	HF (haplotype frequency)%								
	Greece (n=276)	Spain ¹ (n=165)	Spain ¹ (Jewish origin) (n=95)	USA Caucasian ² (n=242)	Brazil ³ (n=204)	Thailand ⁴ (n=255)	China ⁵ (n=104)	S. Korea ⁶ (n=199)	Morocco ⁷ (n=82)
<i>MICA*018 ~ B*18</i>	12.5	3.9	2.1		3.7	5.9			
<i>MICA*009 ~ B*51</i>	11.5	5.2	1.0		8.1	2.0	9.1	7.5	3.8
<i>MICA*016 ~ B*35</i>	6.34	2.4	8.9		1.7				
<i>MICA*002 ~ B*35</i>	5.61	6.7	3.7	5.3		3.9	3.4	4.5	3.4
<i>MICA*008 ~ B*44</i>	4.52	4.5		10.6	4.9				9.1
<i>MICA*008 ~ B*08</i>	4.34	4.2	3.7	20.6	5.9				8.3

¹[143], ²[140], ³[147], ⁴[148], ⁵[149], ⁶[150], ⁷[151] p values >0.05 σε όλες τις περιπτώσεις (στατιστικά μη σημαντικό)

Πίνακας Β6. Οι συσχετιζόμενες συχνότητες των απλότυπων *MICA* ~ HLA-B** στον ελληνικό πληθυσμό σε σύγκριση με διάφορους πληθυσμούς (επιλέχθηκαν ελληνικοί απλότυποι με συχνότητες > 4)



Σχήμα Β5. Διάγραμμα στο οποίο εμφανίζεται για κάθε χώρα η συχνότητα απλοτύπων MICA* ~ HLA-B



Σχήμα Β6. Διάγραμμα στο οποίο εμφανίζεται κάθε συχνότητα απλοτύπων MICA* ~ HLA-B ανά χώρα

Συμπεράσματα

Η έρευνα μελέτησε το γονίδιο MICA, αναλύοντας δείγματα DNA 277 εθελοντών δοτών Προγονικών Αιμοποιητικών κυττάρων (Haemopoietic Stem Cells). Η γονοτυπική ανάλυση έγινε με αντίστροφη PCR-SSOP και πυροαλληλούχηση. Το γονίδιο MICA είναι ένα πολύ πολυμορφικό λειτουργικό γονίδιο που βρίσκεται κοντά στον τόπο HLA-B. Ορισμένα αλληλόμορφα MICA έχουν συσχετιστεί με φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες, ενώ τα αντισώματα MICA έχουν εμπλακεί σε απόρριψη αλλομοσχεύματος οργάνων ή νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD). Με την εργασία αυτή, εντοπίσαμε τις συχνότητες των αλληλόμορφων MICA στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς, από ότι είναι βιβλιογραφικά γνωστό υπάρχουν δύο εργασίες, πριν το 2000, που αναφέρουν περιορισμένα δεδομένα, οποία όμως δεν είναι συγκρίσιμα με τα τρέχοντα ευρήματα λόγω αφ' ενός της αλλαγής της ονοματολογίας και αφ' ετέρου του διαχωρισμού πολλών περισσότερων MICA αλληλομόρφων στη συνέχεια.

Καθορίστηκαν δεκαοκτώ αλληλόμορφα MICA στον ελληνικό πληθυσμό, φανερώνοντας ετερογενή αλληλική διαφορά. Τα πιο συνηθισμένα αλληλόμορφα που βρέθηκαν από αυτή την έρευνα στον ελληνικό πληθυσμό είναι τα MICA*008, MICA*009, MICA*018, MICA*002, MICA*004 που αντιστοιχούν στο 77,8% όλων των αλληλόμορφων. Η κατανομή συχνότητας των αλληλόμορφων MICA στον συνολικό πληθυσμό υγιών ατόμων ήταν αρκετά όμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε σε Ευρωπαϊκούς / Αμερικανικούς πληθυσμούς. Ωστόσο, η συνολική συχνότητα των τριών κοινών αλληλομόρφων MICA*008, MICA*002, MICA*004 ήταν χαμηλότερη στον ελληνικό πληθυσμό, σε σύγκριση με άλλους πληθυσμούς Καυκάσιων. Αυτό οφείλεται κυρίως στη χαμηλή συχνότητα του MICA*002 που ήταν 8,02% στην ελληνική ομάδα ενώ σε άλλους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν βρέθηκε >15%. Επιπλέον, το MICA*009 ήταν πιο συχνό στον ελληνικό πληθυσμό από άλλες ομάδες Καυκάσιας φυλής και παρουσίασε παρόμοια αυξημένα επίπεδα με την ομάδα των Ιαπώνων που μελετήθηκε κάτι που στο μέλλον θα μπορούσε πιθανόν να εξηγηθεί με τεκμηρίωση συσχετισμού με κάποια ασθένεια.

Συμπληρωματικά συσχετίσαμε τα MICA με τα HLA-B, καθώς είναι γνωστό, η στενή εγγύτητα του γονιδίου MICA και του τόπου HLA-B οδηγεί σε πολύ ισχυρή επίδραση ανισοροπίας σύνδεσης (LD) μεταξύ των δύο, όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Ταυτοποιήθηκαν 24 απλότυποι MICA ~ HLA-B στον Ελληνικό πληθυσμό. Ορισμένοι ήδη γνωστοί συσχετισμοί MICA και HLA-B επιβεβαιώθηκαν επίσης στον ελληνικό πληθυσμό. Τα αλληλόμορφα σε αυτούς τους δύο απλότυπους παρατηρήθηκαν με την υψηλότερη τιμή ανισοροπίας σύνδεσης D ήταν τα MICA*018 ~ B*18, $D=0.11$, $D'=0.80$, $r^2=0.64$ και MICA*009 ~ B*51, $D=0.08$, $D'=0.50$, $r^2=0.21$. Η πλειονότητα (71%) συσχετίσεων του MICA με αλληλόμορφα HLA βρέθηκε στα πέντε κυρίαρχα αλληλόμορφα MICA και συγκεκριμένα τα MICA*008, MICA*009, MICA*018, MICA*002 και MICA*004. Από αυτά τα δεδομένα και την ανάλυσή τους, φαίνεται ότι οι Έλληνες δεν έχουν μεγάλες διαφορές με άλλους καυκάσιους, επιβεβαιώνουν τον υψηλό πολυμορφισμό του γονιδίου MICA και τονίζουν την ανάγκη να διευκρινιστεί ο ρόλος των αλληλόμορφων MICA τόσο στη μεταμόσχευση όσο και στη σχέση τους με διάφορες ασθένειες.

Η εργασία αυτή, πρακτικά, αποτελεί την πρώτη μελέτη του ελληνικού πληθυσμού για τα αλληλόμορφα MICA σε τέτοια έκταση. Είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς τα εξαγόμενα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα για χρήση και σύγκριση με αντίστοιχα δεδομένα άλλων πληθυσμιακών ομάδων, ως σημείο αναφοράς. Για την Ελλάδα αποτελούν το πρώτο βήμα για την εντόπιση απορρίψεως μοσχευμάτων, μέσω της ανάπτυξης ειδικών MICA αντισωμάτων αλλά και συσχέτιση με διάφορα νοσήματα.

Τα αποτελέσματα της διατριβής ελπίζουμε να συμβάλλουν στην περαιτέρω μελέτη των MICA και τα στοιχεία αυτά να αποτελέσουν το υπόβαθρο για την περαιτέρω έρευνα και ανάλυση στο μέλλον ενός τόσο σημαντικού τομέα της Ανοσολογίας των Μεταμοσχεύσεων. Τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν θα καταχωρηθούν στη Βάση Δεδομένων (HLA database) ως ξεχωριστός ελληνικός πληθυσμός, χρησιμεύοντας σε αναδρομικές πληθυσμιακές μελέτες και βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις στο συγκεκριμένο θέμα – αντικείμενο ως σημείο αναφοράς.

Η προσπάθεια που άρχισε, θα ανοίξει το δρόμο για την περαιτέρω μελέτη των MICA αφ' ενός σε επίπεδο ανάπτυξης αντισωμάτων και στο ρόλο που μπορεί

να έχουν τόσο στις μεταμοσχεύσεις και αφ' εταίρου σε άλλες περιπτώσεις συσχέτισης με ασθένειες.

Ειδικότερα, έχοντας ως βάση τα ευρήματα αυτά, μελλοντικά, θα μπορούσε να συνεχισθεί η έρευνα πιο εντοπισμένα σε ασθενείς, υποψηφίους για μεταμόσχευση νεφρού, με το να σταδιοποιήσει τα επόμενα βήματα που θα τεκμηριώνουν τη σημασία των MICA αντισωμάτων στη μεταμόσχευση νεφρού. Ενδεικτικά: α) Να εκτιμηθεί η συχνότητα των υποψήφιων για μεταμόσχευση νεφρού ασθενών που έχουν αναπτύξει MICA αντισώματα. Να εκτιμηθεί το ανοσολογικό ρίσκο - η πιθανότητα μεταμόσχευσης με προσχηματισμένα ειδικά στο δότη MICA αντισώματα - στη μεταμόσχευση νεφρού και ιδιαίτερα σε ασθενείς που περιμένουν για δεύτερη μεταμόσχευση. Τα αντισώματα αυτά δεν ανιχνεύονται με τη δοκιμασία ιστικής διασταύρωσης (crossmatch) που γίνεται πριν τη μεταμόσχευση. β) Να καθοριστεί η ανάπτυξη de novo ειδικών στο δότη MICA αντισωμάτων μετά τη μεταμόσχευση υπό συγκεκριμένη ανοσοκαταστολή και σε σχέση με την ανάπτυξη αντισωμάτων σε άλλα αλλοαντιγόνα. γ) Να συσχετισθεί η παρουσία MICA αντισωμάτων με άλλους παράγοντες όπως ενδεικτικά η παρουσία άλλων HLA αντισωμάτων, η λαμβανόμενη ανοσοκαταστολή, τα επίπεδα της κρεατινίνης, η κλινική πορεία της μεταμόσχευσης, πιθανή βιοψία και τα αποτελέσματά της κ.ά.

Η εξέλιξη και η ανάπτυξη νεότερων μεθόδων τυποποίησης των αλληλομόρφων, που μπορεί να απλουστεύουν και να συντομεύουν τις διαδικασίες, όπως χαρακτηριστικά διάφορες πλατφόρμες NGS, καθώς και δημοσιευμένα ευρήματα των τελευταίων ετών μπορούν να συμβάλλουν επικουρικά προς αυτή την κατεύθυνση.

Βιβλιογραφία

- [1] J. Klein and A. Sato, "Birth of the major histocompatibility complex," *Scand. J. Immunol.*, 1998, doi: 10.1046/j.1365-3083.1998.00292.x.
- [2] E. T. Everett, K. J. Kao, and J. C. Scornik, "Class I HLA molecules on human erythrocytes: Quantitation and transfusion effects," *Transplantation*, vol. 44, no. 1, pp. 123–129, 1987, doi: 10.1097/00007890-198707000-00025.
- [3] *Kuby Immunology - Jenni Punt|Sharon Stranford|Patricia Jones|Judith A Owen - Macmillan International Higher Education. 2019.*
- [4] F. A. Bonilla and H. C. Oettgen, "Adaptive immunity," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, pp. S33–S40, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017.
- [5] D. A. Knight and S. T. Holgate, "The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease," *Respirology*, vol. 8, no. 4. *Respirology*, pp. 432–446, Dec-2003, doi: 10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x.
- [6] M. W. Russell and J. Mestecky, "Tolerance and protection against infection in the genital tract," *Immunological Investigations*, vol. 39, no. 4–5. pp. 500–525, 2010, doi: 10.3109/08820131003674834.
- [7] J. R. Turner, "Intestinal mucosal barrier function in health and disease," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 11. pp. 799–809, Nov-2009, doi: 10.1038/nri2653.
- [8] K. A. McClellan, "Mucosal defense of the outer eye," *Surv. Ophthalmol.*, vol. 42, no. 3, pp. 233–246, 1997, doi: 10.1016/S0039-6257(97)00090-8.
- [9] J. L. Werther, "The gastric mucosal barrier," *Mount Sinai Journal of Medicine*, vol. 67, no. 1. pp. 41–53, 01-Jan-2000, doi: 10.1097/00000658-197010000-00004.
- [10] Y. Nonnenmacher and K. Hiller, "Biochemistry of proinflammatory macrophage activation," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 75, no. 12. Birkhauser Verlag AG, pp. 2093–2109, 01-Jun-2018, doi:

- 10.1007/s00018-018-2784-1.
- [11] A. Hidalgo, E. R. Chilvers, C. Summers, and L. Koenderman, "The Neutrophil Life Cycle," *Trends in Immunology*, vol. 40, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 584–597, 01-Jul-2019, doi: 10.1016/j.it.2019.04.013.
- [12] R. M. Ransohoff, "Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology," *Immunity*, vol. 31, no. 5. NIH Public Access, pp. 711–721, 20-Nov-2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.09.010.
- [13] E. Vivier *et al.*, "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells," *Science*, vol. 331, no. 6013. NIH Public Access, pp. 44–49, 07-Jan-2011, doi: 10.1126/science.1198687.
- [14] J. V. Sarma and P. A. Ward, "The complement system," *Cell and Tissue Research*, vol. 343, no. 1. Cell Tissue Res, pp. 227–235, Jan-2011, doi: 10.1007/s00441-010-1034-0.
- [15] M. D. Cooper, "The early history of B cells," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 3, pp. 191–197, Mar. 2015, doi: 10.1038/nri3801.
- [16] U. Landegren, U. Ramstedt, I. Axberg, M. Ullberg, M. Jondal, and H. Wigzell, "Selective inhibition of human T cell cytotoxicity at levels of target recognition of initiation of lysis by monoclonal OKT3 and Leu-2A antibodies," *J. Exp. Med.*, vol. 155, no. 5, pp. 1579–1584, 1982, doi: 10.1084/jem.155.5.1579.
- [17] X. Tao and R. D. Stout, "T cell-mediated cognate signaling of nitric oxide production by macrophages. Requirements for macrophage activation by plasma membranes isolated from T cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, no. 11, pp. 2916–2921, 1993, doi: 10.1002/eji.1830231128.
- [18] E. Oosterwijk, C. Divgi, and N. H. Bander, "Active and passive immunotherapy: Vaccines and antibodies," *BJU International*, vol. 99, no. 5 B. BJU Int, pp. 1301–1304, May-2007, doi: 10.1111/j.1464-410X.2007.06835.x.
- [19] A. J. McMichael, "HLA restriction of human cytotoxic T cells," *Springer Semin. Immunopathol.*, 1980, doi: 10.1007/BF00199923.
- [20] "The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1980. The major histocompatibility complex in man. Past,

- present, and future concepts - PubMed." [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1502492/>. [Accessed: 19-Dec-2020].
- [21] A. M. Norment and D. R. Littman, "A second subunit of CD8 is expressed in human T cells.," *EMBO J.*, vol. 7, no. 11, pp. 3433–3439, 1988, doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03217.x.
- [22] M. Thomsen *et al.*, "RECOMBINATION FRACTIONS IN THE HLA SYSTEM BASED ON THE DATA SET 'PROVINCES FRANÇAISES': INDICATIONS OF HAPLOTYPE-SPECIFIC RECOMBINATION RATES," *Int. J. Immunogenet.*, vol. 21, no. 1, pp. 33–43, 1994, doi: 10.1111/j.1744-313X.1994.tb00174.x.
- [23] E. S. Trombetta and I. Mellman, "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo," *Annual Review of Immunology*, vol. 23. Annu Rev Immunol, pp. 975–1028, 2005, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538.
- [24] D. R. Madden, "The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes," *Annual Review of Immunology*, vol. 13. Annual Reviews Inc., pp. 587–622, 1995, doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.003103.
- [25] L. S. K. Walker and A. K. Abbas, "The enemy within: Keeping self-reactive T cells at bay in the periphery," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 1. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, pp. 11–19, 2002, doi: 10.1038/nri701.
- [26] A. Piazza, P. Menozzi, and L. L. Cavalli-Sforza, "The HLA-A,B gene frequencies in the world: Migration or selection?," *Hum. Immunol.*, vol. 1, no. 4, pp. 297–304, 1980, doi: 10.1016/0198-8859(80)90105-6.
- [27] P. Parham, D. A. Lawlor, C. E. Lomen, and P. D. Ennis, "Diversity and diversification of HLA-A,B,C alleles.," *J. Immunol.*, vol. 142, no. 11, pp. 3937–50, Jun. 1989.
- [28] A. Achour, "Major Histocompatibility Complex: Interaction with Peptides," in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- [29] J. Robinson, D. J. Barker, X. Georgiou, M. A. Cooper, P. Flicek, and S. G. E. Marsh, "IPD-IMGT/HLA Database," *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. D1, pp. D948–D955, Jan. 2020, doi: 10.1093/nar/gkz950.
- [30] S. G. E. Marsh *et al.*, "Nomenclature for factors of the HLA system, 2010," *Tissue Antigens*, vol. 75, no. 4, pp. 291–455, Apr. 2010, doi:

- 10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x.
- [31] A. Ziegler, L. L. Field, and A. Y. Sakaguchi, "Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6," *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 55, no. 1–4, pp. 118–121, 1990, doi: 10.1159/000133002.
- [32] J. K. Kulski, T. Shiina, T. Anzai, S. Kohara, and H. Inoko, "Comparative genomic analysis of the MHC: The evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man," *Immunological Reviews*, vol. 190, pp. 95–122, Dec-2002, doi: 10.1034/j.1600-065X.2002.19008.x.
- [33] A. L. Hughes and M. Nei, "Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection," *Nature*, vol. 335, no. 6186, pp. 167–170, 1988, doi: 10.1038/335167a0.
- [34] J. E. MURRAY and E. D. THOMAS, "The Nobel Lectures in Immunology.," *Scand. J. Immunol.*, vol. 39, no. 4, pp. 339–345, Apr. 1994, doi: 10.1111/j.1365-3083.1994.tb03382.x.
- [35] P. B. MEDAWAR, "Tests by tissue culture methods on the nature of immunity to," *Q. J. Microsc. Sci.*, vol. 89, no. Pt 3, pp. 239–252, 1948.
- [36] C. S. M. Kramer, D. L. Roelen, S. Heidt, and F. H. J. Claas, "Defining the immunogenicity and antigenicity of HLA epitopes is crucial for optimal epitope matching in clinical renal transplantation," *HLA*, vol. 90, no. 1, Blackwell Publishing Ltd, pp. 5–16, 01-Jul-2017, doi: 10.1111/tan.13038.
- [37] L. A. Michielsen *et al.*, "A paired kidney analysis on the impact of pre-Transplant anti-HLA antibodies on graft survival," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 34, no. 6, pp. 1056–1063, Jun. 2019, doi: 10.1093/ndt/gfy316.
- [38] S. Heidt *et al.*, "No Evidence for Cross-reactivity of Virus-specific Antibodies with HLA Alloantigens," *Transplantation*, vol. 102, no. 11, pp. 1844–1849, Nov. 2018, doi: 10.1097/TP.0000000000002369.
- [39] G. Bodis, V. Toth, and A. Schwarting, "Role of Human Leukocyte Antigens (HLA) in Autoimmune Diseases," *Rheumatol. Ther.*, vol. 5, no. 1, pp. 5–20, Jun. 2018, doi: 10.1007/s40744-018-0100-z.
- [40] E. Thorsby, "Invited anniversary review: HLA associated diseases," *Human Immunology*, vol. 53, no. 1, Elsevier, pp. 1–11, 01-Mar-1997,

- doi: 10.1016/S0198-8859(97)00024-4.
- [41] A. M. Little and P. L. Stern, "Does HLA type predispose some individuals to cancer?," *Molecular Medicine Today*, vol. 5, no. 8. Elsevier Ltd, pp. 337–342, 1999, doi: 10.1016/S1357-4310(99)01524-5.
- [42] A. C. Bateman and W. M. Howell, "Human leukocyte antigens and cancer: Is it in our genes?," *Journal of Pathology*, vol. 188, no. 3. J Pathol, pp. 231–236, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199907)188:3<231::AID-PATH325>3.0.CO;2-A.
- [43] S. D. J. Pena and R. Chakraborty, "Paternity testing in the DNA era," *Trends in Genetics*, vol. 10, no. 6. Trends Genet, pp. 204–209, 1994, doi: 10.1016/0168-9525(94)90257-7.
- [44] R. Wu *et al.*, "Revisiting the potential power of human leukocyte antigen (HLA) genes on relationship testing by massively parallel sequencing-based HLA typing in an extended family," *J. Hum. Genet.*, vol. 64, no. 1, pp. 29–38, Jan. 2019, doi: 10.1038/s10038-018-0521-0.
- [45] Y. Tomita, T. Ikeda, R. Sato, and T. Sakagami, "Association between HLA gene polymorphisms and mortality of COVID-19: An in silico analysis," *Immunity, Inflamm. Dis.*, vol. 8, no. 4, pp. 684–694, Dec. 2020, doi: 10.1002/iid3.358.
- [46] A. Sakuraba, H. Haider, and T. Sato, "Population Difference in Allele Frequency of HLA-C*05 and Its Correlation with COVID-19 Mortality," *Viruses*, vol. 12, no. 11, Nov. 2020, doi: 10.3390/v12111333.
- [47] W. Wang, W. Zhang, J. Zhang, J. He, and F. Zhu, "Distribution of HLA allele frequencies in 82 Chinese individuals with coronavirus disease-2019 (COVID-19)," *HLA*, vol. 96, no. 2, pp. 194–196, Aug. 2020, doi: 10.1111/tan.13941.
- [48] A. Anzurez *et al.*, "Association of Human Leukocyte Antigen DRB1*09:01 with severe COVID-19.," *HLA*, Mar. 2021, doi: 10.1111/tan.14256.
- [49] M. Shkurnikov *et al.*, "Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19," *Front. Immunol.*, vol. 12, Feb. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.641900.
- [50] A. Amoroso *et al.*, "HLA and AB0 Polymorphisms May Influence SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Severity," *Transplantation*, 2020, doi:

- 10.1097/tp.00000000000003507.
- [51] L. Lorente *et al.*, “HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19,” *Med. Intensiva*, 2020, doi: 10.1016/j.medin.2020.08.004.
- [52] M. de M. Leite, F. F. Gonzalez-Galarza, B. C. C. da Silva, D. Middleton, and E. J. M. dos Santos, “Predictive immunogenetic markers in COVID-19,” *Hum. Immunol.*, vol. 82, no. 4, pp. 247–254, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.humimm.2021.01.008.
- [53] I. Zidi, “Puzzling out the COVID-19: Therapy targeting HLA-G and HLA-E,” *Human Immunology*, vol. 81, no. 12. Elsevier Inc., 01-Dec-2020, doi: 10.1016/j.humimm.2020.10.001.
- [54] P. A. Brennan and K. M. Kendrick, “Mammalian social odours: Attraction and individual recognition,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 361, no. 1476. Royal Society, pp. 2061–2078, 29-Dec-2006, doi: 10.1098/rstb.2006.1931.
- [55] A. Jokiniemi, L. Kuusipalo, J. Ritari, S. Koskela, J. Partanen, and J. Kekäläinen, “Gamete-level immunogenetic incompatibility in humans—towards deeper understanding of fertilization and infertility?,” *Heredity (Edinb.)*, vol. 125, no. 5, pp. 281–289, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41437-020-0350-8.
- [56] A. Jokiniemi *et al.*, “Post-copulatory genetic matchmaking: HLA-dependent effects of cervical mucus on human sperm function,” *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 287, no. 1933, p. 20201682, Aug. 2020, doi: 10.1098/rspb.2020.1682.
- [57] S. Bahram, M. Bresnahan, D. E. Geraghty, and T. Spies, “A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 14, pp. 6259–6263, 1994, doi: 10.1073/pnas.91.14.6259.
- [58] C. Leelayuwat, M. A. Degli-Esposti, L. J. Abraham, R. L. Dawkins, and D. C. Townsend, “A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I,” *Immunogenetics*, vol. 40, no. 5, pp. 339–351, 1994, doi: 10.1007/BF01246675.
- [59] B. Suárez-Álvarez, A. López-Vázquez, J. M. Baltar, F. Ortega, and C. López-Larrea, “Potential Role of NKG2D and Its Ligands in Organ

- Transplantation: New Target for Immunointervention,” *Am. J. Transplant.*, vol. 9, no. 2, pp. 251–257, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02526.x.
- [60] Y. Zou, F. Mirbaha, A. Lazaro, Y. Zhang, B. Lavingia, and P. Stastny, “MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies,” *Hum. Immunol.*, vol. 63, no. 1, pp. 30–39, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0198-8859(01)00349-4.
- [61] N. Fodil *et al.*, “Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene,” *Immunogenetics*, vol. 44, no. 5, pp. 351–357, 1996, doi: 10.1007/BF02602779.
- [62] S. Bahram, N. Mizuki, H. Inoko, and T. Spies, “Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene,” *Immunogenetics*, vol. 44, no. 1, pp. 80–81, 1996, doi: 10.1007/BF02602661.
- [63] A. K. Baranwal and N. K. Mehra, “Major histocompatibility complex class I chain-related A (MICA) molecules: Relevance in solid organ transplantation,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. FEB, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00182.
- [64] S. Bahram, “MIC genes: From genetics to biology,” *Adv. Immunol.*, vol. 76, pp. 1–60, 2001, doi: 10.1016/s0065-2776(01)76018-x.
- [65] P. Li, S. T. Willie, S. Bauer, D. L. Morris, T. Spies, and R. K. Strong, “Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T cell ligand,” *Immunity*, vol. 10, no. 5, pp. 577–584, 1999, doi: 10.1016/S1074-7613(00)80057-6.
- [66] V. Groh, A. Steinle, S. Bauer, and T. Spies, “Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells,” *Science (80-.)*, vol. 279, no. 5357, pp. 1737–1740, 1998, doi: 10.1126/science.279.5357.1737.
- [67] N. W. Zwirner, K. Dole, and P. Stastny, “Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes,” *Hum. Immunol.*, vol. 60, no. 4, pp. 323–330, Apr. 1999, doi: 10.1016/S0198-8859(98)00128-1.
- [68] M. Jinushi *et al.*, “Critical Role of MHC Class I-Related Chain A and B Expression on IFN- α -Stimulated Dendritic Cells in NK Cell Activation: Impairment in Chronic Hepatitis C Virus Infection,” *J. Immunol.*, vol.

- 170, no. 3, pp. 1249–1256, 2003, doi: 10.4049/jimmunol.170.3.1249.
- [69] L. L. Molinero, C. I. Domaica, M. B. Fuertes, M. V. Girart, L. E. Rossi, and N. W. Zwirner, “Intracellular Expression of MICA in Activated CD4 T Lymphocytes and Protection from NK Cell-Mediated MICA-Dependent Cytotoxicity,” *Hum. Immunol.*, vol. 67, no. 3, pp. 170–182, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.010.
- [70] S. Schrambach, M. Ardizzone, V. Leymarie, J. Sibilia, and S. Bahram, “In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer,” *PLoS One*, vol. 2, no. 6, 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000518.
- [71] S. Caillat-Zucman, “How NKG2D Ligands Trigger Autoimmunity?,” *Hum. Immunol.*, vol. 67, no. 3, pp. 204–207, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.013.
- [72] B. Tang *et al.*, “Evaluation of human major histocompatibility complex class I chain-related A as a potential target for tumor imaging,” *Cancer Lett.*, vol. 263, no. 1, pp. 99–106, May 2008, doi: 10.1016/j.canlet.2007.12.027.
- [73] L. Luo *et al.*, “The role of HIF-1 in up-regulating MICA expression on human renal proximal tubular epithelial cells during hypoxia/reoxygenation,” *BMC Cell Biol.*, vol. 11, Nov. 2010, doi: 10.1186/1471-2121-11-91.
- [74] V. Groh, R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell, and T. Spies, “Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cell by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 3, pp. 255–260, Mar. 2001, doi: 10.1038/85321.
- [75] B. Schreiner *et al.*, “Expression of toll-like receptors by human muscle cells in vitro and in vivo: TLR3 is highly expressed in inflammatory and HIV myopathies, mediates IL-8 release, and up-regulation of NKG2D-ligands,” *FASEB J.*, vol. 20, no. 1, pp. 118–120, Jan. 2006, doi: 10.1096/fj.05-4342fje.
- [76] S. Bauer *et al.*, “Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress- inducible MICA,” *Science (80-.)*, vol. 285, no. 5428, pp. 727–729, Jul. 1999, doi: 10.1126/science.285.5428.727.

- [77] Y. Zou, M. Han, Z. Wang, and P. Stastny, "MICA Allele-Level Typing by Sequence-based Typing with Computerized Assignment of Polymorphic Sites and Short Tandem Repeats within the Transmembrane Region," *Hum. Immunol.*, vol. 67, no. 3, pp. 145–151, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.016.
- [78] A. Steinle *et al.*, "Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family," *Immunogenetics*, vol. 53, no. 4, pp. 279–287, 2001, doi: 10.1007/s002510100325.
- [79] A. Isernhagen *et al.*, "The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation," *EMBO Mol. Med.*, vol. 7, no. 11, pp. 1480–1502, 2015, doi: 10.15252/emmm.201505246.
- [80] A. Isernhagen *et al.*, "The MICA-129Met/Val dimorphism affects plasma membrane expression and shedding of the NKG2D ligand MICA," *Immunogenetics*, vol. 68, no. 2, pp. 109–123, Feb. 2016, doi: 10.1007/s00251-015-0884-8.
- [81] R. López-Hernández *et al.*, "Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population," *Hum. Immunol.*, vol. 71, no. 5, pp. 512–514, May 2010, doi: 10.1016/j.humimm.2010.02.003.
- [82] H. Douik *et al.*, "Association of MICA-129 polymorphism with nasopharyngeal cancer risk in a Tunisian population," *Hum. Immunol.*, vol. 70, no. 1, pp. 45–48, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.humimm.2008.10.008.
- [83] R. Raache *et al.*, "Association of major histocompatibility complex class 1 chain-related gene A dimorphism with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults in the Algerian population," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 19, no. 4, pp. 557–561, Apr. 2012, doi: 10.1128/CVI.05473-11.
- [84] W. Boukouaci *et al.*, "MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease," *Blood*, vol. 114, no. 25, pp. 5216–5224, Dec. 2009, doi: 10.1182/blood-2009-04-217430.

- [85] N. W. Zwirner, C. Y. Marcos, F. Mirbaha, Y. Zou, and P. Stastny, "Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients," *Hum. Immunol.*, vol. 61, no. 9, pp. 917–924, 2000, doi: 10.1016/S0198-8859(00)00162-2.
- [86] Y. Zhang and P. Stastny, "MICA Antigens Stimulate T Cell Proliferation and Cell-Mediated Cytotoxicity," *Hum. Immunol.*, vol. 67, no. 3, pp. 215–222, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.014.
- [87] Y. Zou *et al.*, "Detection of Anti-MICA Antibodies in Patients Awaiting Kidney Transplantation, during the Post-transplant Course, and in Eluates from Rejected Kidney Allografts by Luminex Flow Cytometry," *Hum. Immunol.*, vol. 67, no. 3, pp. 230–237, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.017.
- [88] M. R. Verneris, M. Karami, J. Baker, A. Jayaswal, and R. S. Negrin, "Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells," *Blood*, vol. 103, no. 8, pp. 3065–3072, Apr. 2004, doi: 10.1182/blood-2003-06-2125.
- [89] Y. Zou and P. Stastny, "The role of major histocompatibility complex class I chain-related gene A antibodies in organ transplantation," *Current Opinion in Organ Transplantation*, vol. 14, no. 4. *Curr Opin Organ Transplant*, pp. 414–418, Aug-2009, doi: 10.1097/MOT.0b013e32832d835e.
- [90] K. Goto *et al.*, "MICA gene and ankylosing spondylitis: Linkage analysis via a transmembrane-encoded triplet repeat polymorphism," *Tissue Antigens*, vol. 49, no. 5, pp. 503–507, 1997, doi: 10.1111/j.1399-0039.1997.tb02786.x.
- [91] "MICA gene triplet repeat polymorphism in patients with HLA-B27 positive and negative ankylosing spondylitis from Sardinia - PubMed." [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10990233/>. [Accessed: 22-Mar-2021].
- [92] K. Yabuki *et al.*, "Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative caucasian patients with ankylosing spondylitis," *Hum. Immunol.*, vol. 60, no. 1, pp. 83–86, 1999, doi: 10.1016/S0198-8859(98)00092-5.
- [93] N. Tsuchiya *et al.*, "MICA allele typing of HLA-B27 positive Japanese

- patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals: Differential linkage disequilibrium with HLA-B27 subtypes,” *Arthritis Rheum.*, vol. 41, no. 1, pp. 68–73, Jan. 1998, doi: 10.1002/1529-0131(199801)41:1<68::AID-ART9>3.0.CO;2-C.
- [94] J. Martinez-Borra *et al.*, “HLA-B27 alone rather than B27-related class I haplotypes contributes to ankylosing spondylitis susceptibility,” in *Human Immunology*, 2000, vol. 61, no. 2, pp. 131–139, doi: 10.1016/S0198-8859(99)00145-7.
- [95] H. Amroun *et al.*, “Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism,” *Hum. Immunol.*, vol. 66, no. 10, pp. 1057–1061, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.humimm.2005.09.004.
- [96] X. Zhou and J. D. Reveille, “Imputation-based analysis of MICA alleles in the susceptibility to ankylosing spondylitis,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 79, no. 1. BMJ Publishing Group, p. E1, 01-Jan-2020, doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214708.
- [97] N. Mizuki, A. Meguro, I. Tohnai, A. Gül, S. Ohno, and N. Mizuki, “Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A and HLA-B alleles with Behçet’s disease in Turkey,” *Jpn. J. Ophthalmol.*, vol. 51, no. 6, pp. 431–436, Nov. 2007, doi: 10.1007/s10384-007-0473-y.
- [98] N. Mizuki *et al.*, “Localization of the pathogenic gene of Behçet’s disease by microsatellite analysis of three different populations,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 12, pp. 3702–3708, 2000.
- [99] S. H. Park *et al.*, “Association of MICA polymorphism with HLA-B51 and disease severity in Korean patients with Behçet’s disease.,” *J. Korean Med. Sci.*, vol. 17, no. 3, pp. 366–370, 2002, doi: 10.3346/jkms.2002.17.3.366.
- [100] W. Zhu *et al.*, “MICA*049, not MICA*009, is associated with Behçet’s disease in a Chinese population,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47289-z.
- [101] N. Eyerci, E. Balkan, N. Akdeniz, and S. Keleş, “Association of MICA alleles and human leukocyte antigen B in Turkish patients diagnosed with behçet’s disease,” *Arch. Rheumatol.*, vol. 33, no. 3, pp. 352–357, Sep. 2018, doi: 10.5606/ArchRheumatol.2018.6704.

- [102] R. Queiro *et al.*, “The Region Centromeric to HLA-C Is a Key Region for Understanding the Phenotypic Variability of Psoriatic Arthritis,” *ISRN Dermatol.*, vol. 2014, pp. 1–5, Jan. 2014, doi: 10.1155/2014/570178.
- [103] B. Vidan-Jeras, “When type 1 diabetes meets celiac disease,” *HLA*, vol. 92, pp. 64–66, Dec. 2018, doi: 10.1111/tan.13441.
- [104] P. Parthasarathy, A. Agarwal, K. Chawla, T. Tofighi, and T. K. Mondal, “Upcoming biomarkers for the diagnosis of Kawasaki disease: A review,” *Clinical Biochemistry*, vol. 48, no. 16–17. Elsevier Inc., pp. 1188–1194, 01-Nov-2015, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.02.013.
- [105] L. R. Jarduli *et al.*, “Role of HLA, KIR, MICA, and cytokines genes in leprosy,” *BioMed Research International*, vol. 2013. Biomed Res Int, 2013, doi: 10.1155/2013/989837.
- [106] H. A. F. Stephens, “MICA and MICB genes: Can the enigma of their polymorphism be resolved?,” *Trends in Immunology*, vol. 22, no. 7. Trends Immunol, pp. 378–385, 2001, doi: 10.1016/S1471-4906(01)01960-3.
- [107] K. G. Hankey *et al.*, “MIC expression in renal and pancreatic allografts,” *Transplantation*, vol. 73, no. 2, pp. 304–306, Jan. 2002, doi: 10.1097/00007890-200201270-00029.
- [108] I. Quiroga *et al.*, “Expression of MHC class I-related chain B (MICB) molecules on renal transplant biopsies,” *Transplantation*, vol. 81, no. 8, pp. 1196–1203, Apr. 2006, doi: 10.1097/01.tp.0000205788.05322.42.
- [109] S. Gasser, S. Orsulic, E. J. Brown, and D. H. Raulet, “The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor,” *Nature*, vol. 436, no. 7054, pp. 1186–1190, Aug. 2005, doi: 10.1038/nature03884.
- [110] H. Das *et al.*, “MICA engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function,” *Immunity*, vol. 15, no. 1, pp. 83–93, 2001, doi: 10.1016/S1074-7613(01)00168-6.
- [111] E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini, “Functions of natural killer cells,” *Nature Immunology*, vol. 9, no. 5. Nat Immunol, pp. 503–510, May-2008, doi: 10.1038/ni1582.
- [112] S. Sumitran-Holgersson, H. E. Wilczek, J. Holgersson, and K. Soderstrom, “Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as

- targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts,” *Transplantation*, vol. 74, no. 2, pp. 268–277, Jul. 2002, doi: 10.1097/00007890-200207270-00019.
- [113] K. Mizutani *et al.*, “Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure,” *Am. J. Transplant.*, vol. 5, no. 9, pp. 2265–2272, Sep. 2005, doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01016.x.
- [114] K. Mizutani *et al.*, “Association of Kidney Transplant Failure and Antibodies Against MICA,” *Hum. Immunol.*, vol. 67, no. 9, pp. 683–691, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.humimm.2006.06.002.
- [115] S. Beck *et al.*, “Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex,” *Nature*, vol. 401, no. 6756, pp. 921–923, Oct. 1999, doi: 10.1038/44853.
- [116] R. Horton *et al.*, “Gene map of the extended human MHC,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 5, no. 12, pp. 889–899, 2004, doi: 10.1038/nrg1489.
- [117] C. J. T. Visser *et al.*, “Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: A study on linkage with classical HLA genes,” *Immunogenetics*, vol. 49, no. 6, pp. 561–566, Jun. 1999, doi: 10.1007/s002510050537.
- [118] S. Bauer *et al.*, “Pillars Article: Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science*. 1999. 285: 727-729.” *J. Immunol.*, vol. 200, no. 7, pp. 2231–2233, 2018.
- [119] M. K. Choy and M. E. Phipps, “MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease,” *Trends Mol. Med.*, vol. 16, no. 3, pp. 97–106, 2010, doi: 10.1016/j.molmed.2010.01.002.
- [120] J. Robinson, J. A. Halliwell, J. D. Hayhurst, P. Flicek, P. Parham, and S. G. E. Marsh, “The IPD and IMGT/HLA database: Allele variant databases,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. D1, pp. D423–D431, Jan. 2015, doi: 10.1093/nar/gku1161.
- [121] M. J. Apithy *et al.*, “Impact of MICA and NKG2D polymorphisms in HLA-fully matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation,” *Bone Marrow Transplantation*, vol. 53, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 918–922, 01-Jul-2018, doi: 10.1038/s41409-017-0083-3.
- [122] G. Solgi, D. Furst, J. Mytilineos, G. Pourmand, and A. A. Amirzargar, “Clinical relevance of pre and post-transplant immune markers in kidney

- allograft recipients: anti-HLA and MICA antibodies and serum levels of sCD30 and sMICA.," *Transpl. Immunol.*, vol. 26, no. 2–3, pp. 81–7, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.trim.2011.12.002.
- [123] A. C. Gautier *et al.*, "MICA Compatibility and Immunization in Third Kidney Transplantations," *Transplant. Proc.*, vol. 41, no. 2, pp. 663–665, 2009, doi: 10.1016/j.transproceed.2008.12.007.
- [124] R. J. Duquesnoy *et al.*, "HLAMatchmaker: A molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival," *Transplantation*, vol. 75, no. 6, pp. 884–889, 2003, doi: 10.1097/01.TP.0000055101.20821.AC.
- [125] L. Luo *et al.*, "The effect of MICA antigens on kidney transplantation outcomes," *Immunol. Lett.*, vol. 156, no. 1–2, pp. 54–58, 2013, doi: 10.1016/j.imlet.2013.08.009.
- [126] A. Piazza *et al.*, "Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: Posttransplant analysis using flow cytometric techniques1," *Transplantation*, vol. 71, no. 8, pp. 1106–1112, Apr. 2001, doi: 10.1097/00007890-200104270-00017.
- [127] A. Zingoni *et al.*, "MICA-129 dimorphism and soluble MICA are associated with the progression of multiple myeloma," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. MAY, p. 926, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00926.
- [128] Y. Zhao *et al.*, "Prognostic value of MICA/B in cancers: A systematic review and meta-analysis," *Oncotarget*, vol. 8, no. 56, pp. 96384–96395, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.21466.
- [129] K. Yabuki *et al.*, "Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behcet's disease in Greece," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999.
- [130] M. Ota *et al.*, "Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): Allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian," *Tissue Antigens*, vol. 49, no. 5, pp. 448–454, 1997, doi: 10.1111/j.1399-0039.1997.tb02778.x.
- [131] J. L. Royo and J. J. Galán, "Pyrosequencing for SNP genotyping.,"

- Methods Mol. Biol.*, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-411-1_7.
- [132] L. Excoffier, G. Laval, and S. Schneider, "Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis," *Evol. Bioinforma.*, 2005, doi: 10.1177/117693430500100003.
- [133] X. Gao, R. M. Single, P. Karacki, D. Marti, S. J. O'Brien, and M. Carrington, "Diversity of MICA and Linkage Disequilibrium with HLA-B in Two North American Populations," *Hum. Immunol.*, vol. 67, no. 3, pp. 152–158, 2006, doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.009.
- [134] Y. Zhang *et al.*, "MICA polymorphism in South American Indians," *Immunogenetics*, vol. 53, no. 10–11, pp. 900–906, Feb. 2002, doi: 10.1007/s00251-001-0426-4.
- [135] D. Lucas *et al.*, "Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain," *Hum. Immunol.*, vol. 69, no. 10, pp. 655–660, 2008, doi: 10.1016/j.humimm.2008.07.011.
- [136] V. Ďurmanová *et al.*, "Characterization of MICA gene polymorphism of HLA complex in the Slovak population," *Ann. Hum. Biol.*, vol. 38, no. 5, pp. 570–576, 2011, doi: 10.3109/03014460.2011.572563.
- [137] N. Bratanic, D. Smigoc Schweiger, A. Mendez, N. Bratina, T. Battelino, and B. Vidan-Jeras, "An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes," *Tissue Antigens*, vol. 76, no. 3, pp. 208–215, 2010, doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01501.x.
- [138] N. Obuchi *et al.*, "Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4," *Tissue Antigens*, 2001, doi: 10.1034/j.1399-0039.2001.057006520.x.
- [139] M. Komatsu-Wakui *et al.*, "MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype," *Immunogenetics*, vol. 49, no. 7–8, pp. 620–628, 1999, doi: 10.1007/s002510050658.
- [140] E. W. Petersdorf, K. B. Shuler, G. M. Longton, T. Spies, and J. A. Hansen, "Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene," *Immunogenetics*, 1999, doi: 10.1007/s002510050655.

- [141] F. F. González-Galarza *et al.*, “Allele frequency net 2015 update: New features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations,” *Nucleic Acids Res.*, 2015, doi: 10.1093/nar/gku1166.
- [142] P. Luangtrakool, S. Vejbaesya, K. Luangtrakool, and C. Sermduangprateep, “MICA polymorphism, linkage disequilibrium with HLA-B and MICA antibodies in thai kidney transplant recipients,” *J. Med. Assoc. Thai.*, vol. 101, no. 12, pp. 1616–1620, 2018.
- [143] A. Cambra *et al.*, “MICA-HLA-B haplotype diversity and linkage disequilibrium in a population of Jewish descent from Majorca (the Balearic Islands),” *Hum. Immunol.*, vol. 70, no. 7, pp. 513–517, 2009, doi: 10.1016/j.humimm.2009.04.005.
- [144] W. Tian, D. A. Boggs, W. Z. Ding, D. F. Chen, and P. A. Fraser, “MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 29 African-American families,” *Immunogenetics*, vol. 53, no. 9, pp. 724–728, Dec. 2001, doi: 10.1007/s00251-001-0392-x.
- [145] E. H. Hughes *et al.*, “Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet’s disease in Caucasian patients,” *Tissue Antigens*, vol. 66, no. 3, pp. 195–199, 2005, doi: 10.1111/j.1399-0039.2005.00465.x.
- [146] N. Mizuki, A. Meguro, I. Tohnai, A. Gül, S. Ohno, and N. Mizuki, “Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A and HLA-B alleles with Behçet’s disease in Turkey,” *Jpn. J. Ophthalmol.*, vol. 51, no. 6, pp. 431–436, 2007, doi: 10.1007/s10384-007-0473-y.
- [147] F. Ribas, L. A. Oliveira, M. L. Petzl-Erler, and M. G. Bicalho, “Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in Euro-Brazilians,” *Tissue Antigens*, vol. 72, no. 6, pp. 532–538, Dec. 2008, doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01142.x.
- [148] A. V. Romphruk *et al.*, “Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais,” *Tissue Antigens*, 2001, doi: 10.1034/j.1399-0039.2001.580203.x.
- [149] W. Tian, J. H. Cai, F. Wang, and L. X. Li, “MICA polymorphism in a

- northern Chinese Han population: The identification of a new MICA allele, MICA*059," *Hum. Immunol.*, 2010, doi: 10.1016/j.humimm.2010.01.025.
- [150] C. W. Pyo, S. S. Hur, Y. K. Kim, H. B. Choi, T. Y. Kim, and T. G. Kim, "Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population," *Hum. Immunol.*, 2003, doi: 10.1016/S0198-8859(02)00826-1.
- [151] D. Piancatelli, T. Del Beato, K. Oumhani, R. El Aouad, and D. Adorno, "MICA polymorphism in a population from North Morocco, Metalsa Berbers, using sequence-based typing," *Hum. Immunol.*, 2005, doi: 10.1016/j.humimm.2005.06.008.
- [152] V. Birtsas *et al.*, "Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA-B in Greek population," *Hum. Immunol.*, May 2021, doi: 10.1016/j.humimm.2021.04.006.
- [153] A. Iniotaki-Theodoraki *et al.*, "GRAFT SPECIFIC ALLOREACTIVITY AND CLINICAL STATUS OF RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS," *Transplantation*, 2004, doi: 10.1097/00007890-200407271-00435.
- [154] M. Spyropoulou-Vlachou, M. Dinou, V. Mpirtsas, E. Kondou, V. Vrani, and A. Iniotaki, "157-P: MICA gene allelic diversity and MICA/HLA-B haplotypic variation in Greek population," *Hum. Immunol.*, 2009, doi: 10.1016/j.humimm.2009.09.190.
- [155] E. N. K. Angeliki G Vittoraki, Maria D Apostolaki, S. I. I. Vasilios P Mpirtsas, Petroula G Stravoskoufi, and A. G. I. Maria S Spyropoulou-Vlachou, "Frequency of HLA-DP and MICA antibodies in hyperimmunized renal transplant candidates," *Tissue Antigens*, vol. 73, pp. 416–417, 2009.

Παραρτήματα

1 Μέθοδος LABType® SSO προσδιορισμού των Αντιγόνων MICA

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ MICA

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Τυποποίηση του DNA αλληλόμορφων Τάξης I HLA ή Τάξης II σε τύπους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Το LABType® SSO χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές ειδικούς για ακολουθίες (SSO) που προσδένονται σε φθορίζοντα μικροσφαιρών για την αναγνώριση αλληλόμορφων από το δείγμα DNA. Η εισαγωγή βήματος για την ενίσχυση του DNA-στόχου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), που συνδυάζει υβριδισμό και ανίχνευση σε μια μόνο αντίδραση, καθιστά τη μέθοδο αυτή κατάλληλη για εξετάσεις μικρής και μεγάλης κλίμακος. Σε αντίθεση με τη λεμφοκυτταροτοξική κλίμακα αντίδρασης (1 = αρνητικό έως 8 = θετικό), τα αποτελέσματα της εξέτασης LABType® είναι είτε θετικά ή αρνητικά. Αυτό καταργεί την ανάγκη για πολύπλοκη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, οι αλλαγές μονού νουκλεοτιδίου δίνουν στην PCR-SSO διακριτική ικανότητα, ενώ οι ομάδες που παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση (CREGs) επιφέρουν σημαντικές δυσκολίες στην ορολογική κατάταξη σε τύπους.

ΑΡΧΕΣ

Το LABType® εφαρμόζει τεχνολογία Lumindex® για να αναστρέψει τη μέθοδο τυποποίησης με SSO DNA. Πρώτα, το DNA-στόχος ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας εκκινήτη (primer) ειδικό για ομάδα. Το προϊόν της PCR είναι βιοτινυλιωμένο, το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση με χρήση στρεπταβιδίνης συζευγμένης με R-Φυκοερυθρίνη (SAPE).

Το προϊόν από την PCR αποδιατάσσεται και υβριδίζεται σε συμπληρωματικούς ανιχνευτές DNA συζευγμένους σε μικροσφαιρών κωδικοποιημένα με φθορισμό. Ο αναλυτής ροής LABScan™ 100 αναγνωρίζει την ένταση φθορισμού της PE (φυκοερυθρίνης) σε κάθε μικροσφαιρίδιο. Η

κατάταξη σε τύπους HLA βασίζεται στη σύγκριση του υποδείγματος της αντίδρασης με τα υποδείγματα που σχετίζονται με τις δημοσιευμένες γονιδιακές ακολουθίες HLA.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

A. Ταυτοποίηση

Το σύστημα ανάλυσης σε ομάδες LABType® SSO DNA παρέχει ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές ειδικούς για ακολουθίες ακινητοποιημένους σε μικροσφαίρες που αναγνωρίζουν αλληλόμορφα HLA σε ενισχυμένα δείγματα γονιδιωματικού DNA μέσα από ελεγχόμενη αντίδραση υβριδισμού DNA-DNA, που παρακολουθείται με ανάλυση ροής χρησιμοποιώντας τον αναλυτή ροής LABScan™ 100 . Τα εξαρτήματα του συστήματος περιλαμβάνουν:

- Βελτιστοποιημένο εκ των προτέρων και εξετασμένο μείγμα μικροσφαιρών με ομοιοπολικά ενωμένους ανιχνευτές
- Ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης υβριδισμού για τη διευκόλυνση δέσμευσης του DNA-στόχου στον ανιχνευτή
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης για έκπλυση του αδέσμευτου DNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα SAPE για αραίωση διαλύματος Στοκ SAPE
- Αντιδραστήρια ενίσχυσης DNA (βελτιστοποιημένο εκ των προτέρων μείγμα εκκινητή (primer) για συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο)
- Μείγμα D (ειδικά σχηματισμένη ενίσχυση).

Το μείγμα μικροσφαιρών αποτελείται από ομάδα μικροσφαιρών με επισήμανση φθορισμού που φέρουν μοναδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές ειδικούς για ακολουθίες σε αλληλόμορφα HLA. Κάθε μείγμα μικροσφαιρας περιλαμβάνει αρνητικό και θετικό ανιχνευτή-μάρτυρα που φέρει μικροσφαιρών για απομάκρυνση των μη ειδικών σημάτων υποστρώματος και κανονικοποίηση των μη επεξεργασμένων δεδομένων για διόρθωση ενδεχόμενης απόκλισης ανάμεσα στην ποσότητα του δείγματος και στην αποδοτικότητα της αντίδρασης. Τα μείγματα μικροσφαιρών έχουν βελτιστοποιηθεί εκ των προτέρων για συγκεκριμένα προϊόντα PCR που λαμβάνονται με ενίσχυση DNA χρησιμοποιώντας τα εξειδικευμένα για HLA μείγματα εκκινητών (primer) για συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο. Τα μείγματα εκκινητών (primer) HLA για συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο έχουν βελτιστοποιηθεί εκ των προτέρων για ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδίων HLA

από 40 ng καθαρού γονιδιωματικού DNA σε 20 μl όταν χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με το μείγμα D, η καθορισμένη ποσότητα ανασυνδυασμένης πολυμεράσης Taq και το προφίλ αντίδρασης PCR που περιγράφεται λεπτομερώς παρακάτω. Για κάθε παρτίδα, δείτε το φύλλο εργασίας που παρέχεται για τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα HLA που μπορούν να ταυτοποιηθούν από κάθε ανιχνευτή χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω. Για θέσεις που ανιχνεύονται συγκεκριμένα από κάθε παρτίδα, ανατρέξτε στο έγγραφο Bead Probe Information.

B. Προειδοποίηση ή Προσοχή

1. Για In Vitro Διαγνωστική Χρήση.

2. Προειδοποίηση: Το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο χρησιμοποιείται για χρώση πηκτώματος και το οποίο δεν περιλαμβάνεται στο προϊόν αυτό, είναι γνωστό καρκινογόνο. Χειριστείτε με την απαραίτητη προσοχή. Μπορεί να είναι βλαβερό αν απορροφηθεί από το δέρμα. Αποφύγετε το πιπίλισμα στα μάτια ή το δέρμα ή το ρουχισμό.

Διατηρήστε το σφραγισμένο με ασφάλεια. Πλυθείτε διεξοδικά μετά το χειρισμό. Εκπλύνετε την περιοχή που ήρθε σε επαφή με νερό.

3. Προειδοποίηση: Το ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης και το ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης είναι διαβρωτικά και μπορεί να προκαλέσουν εγκαύματα. Σε περίπτωση επαφής, ξεπλύνετε αμέσως τα μάτια ή το δέρμα με άφθονη ποσότητα νερού για τουλάχιστον 15 λεπτά και αφαιρέστε επίσης τον μολυσμένο ρουχισμό και υποδήματα (δείτε MSDS).

4. Προσοχή: Το Μείγμα Σφαιριδίων LABType® SSO είναι ευαίσθητο στο φως και πρέπει να προστατεύεται από αυτό.

5. Προσοχή: Χρησιμοποιείτε το Μείγμα Σφαιριδίων LABType® SSO εντός τριών μηνών μετά την απόψυξη.

D. Οδηγίες Αποθήκευσης

Όλα τα αντιδραστήρια και τα ρυθμιστικά διαλύματα του LABType® μπορούν να φυλαχτούν κατεψυγμένα με ασφάλεια στους -80° ως -20° C στη συσκευασία προϊόντος. Αποφύγετε άσκοπο χειρισμό. Συνιστάται να διατηρείτε ολόκληρη τη συσκευασία άθικτη και στην κατάψυξη από την ημερομηνία παραλαβής μέχρι να είναι έτοιμη προς χρήση. Ωστόσο, αφού τα μείγματα σφαιριδίων αποψυχθούν για χρήση, πρέπει να φυλάσσονται στους 2° ως 8° C και δεν πρέπει να ψύχονται εκ νέου.

Μια σύντομη περίληψη των απαιτούμενων συνθηκών φύλαξης και χειρισμού απαραίτητων για την εξασφάλιση της καταλληλότερης σταθερότητας για όλα τα αντιδραστήρια LABType®, ακολουθεί παρακάτω.

Ρυθμιστικά Διαλύματα LABType®:

Όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα LABType®, εκτός από το ρυθμιστικό διάλυμα SAPE, έχουν επιτρεπόμενο θερμοκρασιακό εύρος -80° έως 25° C και μπορούν να επανακαταψυχθούν. Το ρυθμιστικό διάλυμα SAPE δεν πρέπει να επανακαταψυχθεί. Το ρυθμιστικό διάλυμα SAPE πρέπει να αποθηκεύεται στους -80° έως 8° C. Μετά την απόψυξη, το ρυθμιστικό διάλυμα SAPE πρέπει να αποθηκεύεται σε ψύκτη στους 2° έως 8° C.

Μείγματα Σφαιριδίων LABType® SSO:

Τα μείγματα σφαιριδίων LABType® είναι πιο σταθερά όταν είναι σε καταψύκτη. Συνιστάται αρχική αποθήκευση των σφαιριδίων στους -80° έως -20° C μέχρι να είναι έτοιμα για χρήση. Μετά την απόψυξη των σφαιριδίων για χρήση, θα πρέπει να διατηρηθούν στους 2° έως 8° C για έως 3 μήνες. Σημαντικό: Για να παρατείνετε τη διάρκεια αποθήκευσης των σφαιριδίων, μην επανακαταψύξετε και αποψύξετε πάλι τα σφαιρίδια.

Σετ Εκκινητή LABType® και Μείγμα D:

Τα σετ εκκινητή και το μείγμα D LABType® είναι περισσότερο σταθερά κατεψυγμένα στους -80° ως -20° C. Και τα δύο αντιδραστήρια μπορούν να υποστούν επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης. Κατ' αυτόν τον τρόπο συνιστούμε φύλαξη πάντα στους -80° ως -20° C.

E. Ενδείξεις Αστάθειας

1. Τα σφαιρίδια που παρουσιάζουν αποχρωματισμό ή συσσωμάτωση που δεν μπορεί να αφαιρεθεί με ανάμιξη στροβιλισμού, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται.
2. Αν κατακρημνίστηκαν άλατα από οποιοδήποτε αντιδραστήριο προϊόντος κατά τη διάρκεια μεταφοράς ή φύλαξης, διαλύστε εκ νέου με έντονη ανάμιξη στροβιλισμού σε θερμοκρασία δωματίου ($20 - 25^{\circ}$ C).
3. Τα μικρότερα μέρη του Μείγματος D, κατά την απόψυξη τους σε θερμοκρασία δωματίου ($20 - 25^{\circ}$ C), πρέπει να έχουν χρώμα ροζ προς ανοικτό ιώδες. Οποιοδήποτε μικρότερο δείγμα του Μείγματος D χωρίς την εξειδικευμένη χρώση δεν πρέπει να χρησιμοποιείται.

ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΑ

- Αναλυτής ροής LABScan™ 100
- Πλατφόρμα Luminex® XY (προαιρετικό παρελκόμενο για αυτοματοποιημένη συσκευή ανάγνωσης 96 δειγμάτων στον αναλυτή ροής LABScan™ 100 από την Luminex Corporation)
- Φυγόκεντρος
 - Ρότορα για σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml (14,000 ως 18,000 g)
 - Ρότορας περιστρεφόμενου κάδου για μικροπλάκα με 96 πηγαδάκια (1000 - 1300 g)
- Αναμίκτης στροβιλισμού με προσαρμοζόμενη ταχύτητα
- Θερμοκυκλωτής Applied Biosystems GeneAmp 9600, ή ισοδύναμος, εξοπλισμένος με θερμαινόμενο καπάκι με προσαρμοζόμενη ταχύτητα ράμπας (ισοδύναμη με ταχύτητα ράμπας 9600)

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

A. Το DNA καθαρίζεται από τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα με οποιαδήποτε προτιμώμενη μέθοδο.

B. Το δείγμα DNA προς χρήση σε PCR πρέπει να εναιωρηθεί εκ νέου σε αποστειρωμένο νερό σε 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 – 9,0 σε βέλτιστη συγκέντρωση 20 ng/μl με A260/A280 σε αναλογία 1,65 - 1,80.

C. Τα δείγματα δεν πρέπει να εναιωρούνται εκ νέου σε διαλύματα που περιέχουν χηλικούς παράγοντες, όπως το EDTA, πάνω από 0,5 mM σε συγκέντρωση.

D. Τα δείγματα DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως μετά την απομόνωση ή να φυλαχτούν στους -20° C ή λιγότερο για μεγάλες χρονικές περιόδους (πάνω από ένα χρόνο) χωρίς αντενδείξεις στα αποτελέσματα.

E. Η μεταφορά των δειγμάτων DNA πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία 4° C ή χαμηλότερη για να διατηρήσουν την ακεραιότητά τους κατά τη διάρκεια της μεταφοράς.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Υλικά που παρέχονται

Σημείωση: Οι όγκοι που παρέχονται είναι ελαφρά περισσότεροι από την ποσότητα που απαιτείται για την εξέταση. Αυτό συμβαίνει για να αντισταθμιστεί η ακούσια απώλεια που ενδέχεται να προκύψει από την

αναρρόφηση με πιπέττα. Μην αναμείξετε συστατικά από άλλες παρτίδες προϊόντων.

100 Εξετάσεις ανά συσκευασία

Ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης 2,25 ml - 1 φιαλίδιο

Ρυθμιστικό διάλυμα SAPE 4,95 ml - 1 φιαλίδιο

Ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης 2,5 ml - 1 φιαλίδιο

1,38 ml Σετ Εκκινητή D-Mix - 2 φιαλίδια των 690 μl έκαστο

Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης 3,4 ml - 1 φιαλίδιο

400 μl Σετ εκκινητή για συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο - 1 φιαλίδιο

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 55 ml - 1 φιαλίδιο

400 μl Μείγμα σφαιριδίων LABType® SSO - 1 φιάλη

200 Εξετάσεις ανά συσκευασία

Taq Combo και με δικαίωμα αδείας Taq Combo και με δικαίωμα αδείας

Ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης 4,50 ml - 2 φιαλίδια των 2,25 ml έκαστο

Ρυθμιστικό διάλυμα SAPE 9,9 ml - 2 φιαλίδια των 4,95 ml έκαστο

Ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης 5,0 ml - 2 φιαλίδια των 2,5 ml έκαστο

2,76 ml Σετ Εκκινητή D-Mix -

-4 σωλήνες των 690 μl ο καθένας

200 μl Ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης - 2 φιαλίδια των 100 μl έκαστο

552 μl Σετ Εκκινητή D-Mix - 2 φιαλίδια των 276 μl έκαστο

Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης 6,8 ml - 2 φιαλίδια των 3,4 ml έκαστο

800 μl Σετ Εκκινητή για συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο - 2 φιαλίδια των 400 μl έκαστο

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 110 ml – 2 φιαλίδια των 55 ml έκαστο

800 μl Μείγμα σφαιριδίων LABType® SSO - 2 φιάλες των 400 μl έκαστο

50 μl Taq Πολυμεράσης 30 μl Taq Πολυμεράσης

B. Υλικά που απαιτούνται, αλλά δεν παρέχονται

- Απιονισμένο νερό
- 70% αιθανόλη
- 20% λευκαντικό χλωρίου (ή ισοδύναμο)
- Στρεπταβιδίνη συζευγμένη με R-Φυκοερυθρίνη--SAPE) (OLI Κατ. #LT-SAPE)
- Υγρό περιβλήματος (Αρ. Κατ. OLI LXSF20 ή LSXF20X5)

- Ανασυνδυασμένη πολυμεράση (Πολυμεράση Amplitaq, Μοριακά βιοχημικά Roche, Τμήμα # 20759562018)
- Αναλώσιμοι σωλήνες 15 - 50 ml
- Δίσκος PCR με λεπτό τοίχωμα με 96 πηγαδάκια, ή σωληνάκια, και συγκρατητήρας που μπορεί να κρατήσει 1000 – 1300 g σε φυγόκεντρο
Προσοχή: Η πλάκα PCR πρέπει να βρίσκεται σε στενή επαφή με το θερμαινόμενο μπλοκ.
- Αυτοκόλλητη κάλυψη δίσκων
- Παροχή ισχύος σε συσκευή ηλεκτροφόρησης ελάχιστη ικανότητα 150V (Micro SSP™ Gel System, OLI Κατ. #MGS108)
- Ενδιάμεσος φωτοδότης UV
- Φωτογραφικό σύστημα ή σύστημα τεκμηρίωσης εικόνων
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (89mM βορικού άλατος Tris; 2 mM δινατρίου EDTA, pH 8,0) με 0,5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο ή ρυθμιστικό διάλυμα 5XTBE με βρωμιούχο αιθίδιο
- Αγαρόζη βαθμού καθαρότητας ηλεκτροφόρησης (π.χ., FMC Seakem® LE)
- PCR Pad
- Θρυμματισμένος πάγος

C. Υλικά που συνιστώνται, αλλά δεν παρέχονται

- Σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml
- Ρύγχη πιπετών
- UNIPLATE, με 96 πηγαδάκια, 250 μl μικροπλάκα
- αλουμινόχαρτο

D. Διαδικασία βήμα-προς-βήμα.

Βλ. "Οδηγίες Χρήσης" παρακάτω.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΕΩΣ

Προσοχή: Κατά την επεξεργασία των μικροτέρων δειγμάτων πρέπει να λαμβάνεται μεγάλη προσοχή. Αποτυχία συμμόρφωσης με τα βήματα που περιγράφονται παρακάτω είναι πιθανόν να οδηγήσει σε απώλεια του αντιδραστηρίου.

A. Χειρισμός και αποθήκευση των σφαιριδίων

1. Η χρήση των προτεινόμενων πλαστικών προϊόντων (σωλήνων, δίσκων και ρυγχών) μπορεί να ελαχιστοποιήσει τις απώλειες σφαιριδίων από μη ειδική προσκόλληση. (Βλ. "Υλικά που απαιτούνται, αλλά δεν παρέχονται").

2. Τα σφαιρίδια LABType® SSO ενδέχεται να επικαθήσουν και να συσσωματωθούν αν παραμείνουν σε σωλήνα. Τα σφαιρίδια πρέπει να κατανέμονται ομοίως πριν τη χορήγηση. Πάντοτε αναμειγνύετε τα σφαιρίδια έντονα με αναρρόφηση πιπέττας αρκετές φορές ή με στροβιλισμό σε οριζόντια θέση για 10 ως 30 δευτερόλεπτα ή όσο χρειάζεται για να λάβετε ένα πλήρως ομοιογενές μείγμα.

3. Τα σφαιρίδια LABType® SSO είναι συσκευασμένα σε σακούλα αλουμινίου. Μην αφαιρείτε τα σφαιρίδια από το αλουμινοχαρτο μέχρι να είναι έτοιμα προς χρήση.

4. Τα σφαιρίδια LABType® SSO περιέχουν εσωτερική χρώση φθορισμού, καθώς και εξειδικευμένους ανιχνευτές για αλληλόμορφα HLA, προσαρτημένους στις επιφάνειές τους. Για να αποφύγετε φωτολεύκανση των σφαιριδίων, προστατέψτε τα από το φως κατά τη διάρκεια χρήσης και φύλαξης. Φυλάξτε τα σφαιρίδια στους -20° C στο στενά καλυμμένο σωλήνα που παρέχεται μέχρι να είναι έτοιμα προς χρήση. Καλύψτε τα σφαιρίδια με αλουμινοχαρτο ή παρεμφερές υλικό κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού.

Προσοχή:

- Αφού αποψυχθούν τα σφαιρίδια, φυλάξτε τα σε θερμοκρασία 2° έως 8° C και χρησιμοποιήστε τα εντός 3 μηνών.

Μην καταψύχετε εκ νέου τα σφαιρίδια.

- Ανοίξτε τις σακούλες που περιέχουν Μείγμα Εκκινητών Ενίσχυσης (Amplification Primer Mixture) και D-Mix μόνο στην περιοχή πριν από την ενίσχυση. Φυλάξτε τα τεμάχια αυτά στους -80° έως -20° C στην περιοχή πριν από την ενίσχυση.

B. Ενίσχυση (Ρύθμιση στην περιοχή πριν από την ενίσχυση).

1. Εισάγετε το κατάλληλο πρόγραμμα “LABType® PCR Program,” στον θερμοκυκλωτή

Επιβεβαιώστε όλες τις παραμέτρους.

2. Ενεργοποιήστε το θερμοκυκλωτή για να προθερμάνετε το θερμαινόμενο καπάκι.

3. Αποψύξτε το DNA, τους Εκκινητές Ενίσχυσης και το Μείγμα D. Διατηρήστε στον πάγο μέχρι τη χρήση.

4. Προσαρμόστε τη συγκέντρωση γονιδιωματικού DNA σε 20 ng/μl χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο νερό.

5. Αναμείξτε με στροβιλισμό το Μείγμα D και τον Εκκινητή Ενίσχυσης επί 15 δευτερόλεπτα. Φυγοκεντρήστε επί 3-5 δευτερόλεπτα.
6. Αναμείξτε τον ενδεικνυόμενο όγκο Μείγματος D και Εκκινητών.
Αναμείξτε με στροβιλισμό επί 15 δευτερόλεπτα και τοποθετήστε στον πάγο. Για ακριβή αναρρόφηση με πιπέττα της πολυμεράσης Taq, συνιστάται να παρασκευάσετε κύριο μείγμα που επαρκεί για τουλάχιστον 10 αντιδράσεις.
7. Προσθέστε πολυμεράση Taq αμέσως πριν τη χρήση.
8. Μεταφέρετε με πιπέττα 2 μl DNA (σε 20 ng/μl) στον πυθμένα ενός σωλήνα (για τελικό όγκο 20 μl ανά αντίδραση PCR). Φυλάξτε τους σωλήνες ή το δίσκο μερικώς καλυμμένα για να αποφύγετε εξάτμιση και μόλυνση.
9. Προσθέστε επαρκή ποσότητα πολυμεράσης Taq (π.χ. 0,2 μl ανά 20 μl αντίδρασης) στο Μείγμα Ενίσχυσης που παρασκευάστηκε στο Βήμα Β.6.
10. Αναμείξτε με στροβιλισμό για μερικά δευτερόλεπτα και φυγοκεντρήστε για 3-5 δευτερόλεπτα.
11. Μεταφέρετε 18 μl του Μείγματος Ενίσχυσης σε κάθε πηγαδάκι που περιέχει DNA.
Προσοχή: Για να αποφύγετε επιμόλυνση, βεβαιωθείτε ότι δεν έχετε αγγίξει το DNA που έχει προηγουμένως μεταφερθεί στον πυθμένα.
12. Καλύψτε ή σφραγίστε. Αν χρησιμοποιείτε αυτοκόλλητο κάλυμμα δίσκου, βεβαιωθείτε ότι έχει πιεστεί σφιχτά στο χείλος κάθε φρεατίου. Τοποθετήστε ένα μαξιλαράκι PCR, κατάλληλο για το θερμικό κυκλοποιητή, στο δίσκο πριν να κλείσετε το καπάκι. Κλείστε και σφίξτε το καπάκι του θερμοκυκλωτή.
13. Εκτελέστε το πρόγραμμα "LABType® SSO PCR Program".
14. Για το GeneAmp PCR System 9700, ρυθμίστε την "ταχύτητα ράμπας" (ramp speed) στο πρόγραμμα 9600. Για άλλα συστήματα, συμβουλευθείτε την τεκμηρίωση του κατασκευαστή για να ρυθμίσετε την ταχύτητα ράμπας ώστε να προσομοιάζει επαρκώς το πρόγραμμα GeneAmp 9600. Η χρήση μιας σημαντικά διαφορετικής ταχύτητας ράμπας επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης.
15. Το ενισχυμένο DNA είναι τώρα έτοιμο προς ανάλυση χρησιμοποιώντας τη Διαδικασία Εξέτασης που περιγράφεται στην ενότητα Δ. Ωστόσο, συνιστάται να χρησιμοποιήσετε πρώτα τα 2 - 5 μl ενισχυμένου DNA για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος. Η επιβεβαίωση ενός ενισχυμένου προϊόντος

(ζώνη) πριν τον προσδιορισμό υβριδισμού εξασφαλίζει τη δημιουργία άριστων σημάτων.

16. Φυλάξτε τον καλυμμένο δίσκο DNA στους -80° έως -20° C για ένα μήνα το πολύ.

C. Προετοιμασία ελέγχου

1. Ενεργοποιήστε το LABScan™ 100 και την πλατφόρμα XY και ακολουθήστε τη διαδικασία έναρξης που περιγράφεται στην ενότητα Δ των Οδηγιών Χρήσης. Το LABScan™ 100 απαιτεί τουλάχιστον 30 λεπτά προθέρμανσης.

2. Ενεργοποιήστε το θερμοκυκλωτή και εκτελέστε το πρόγραμμα στους 60° C HOLD, ή ισοδύναμα, για τουλάχιστον 1,5 ώρες (ή κρατήστε το για πάντα). Τοποθετήστε ένα μαξιλαράκι PCR, κατάλληλο για θερμικό κυκλοποιητή, έτοιμο προς χρήση. Βεβαιωθείτε ότι περιμένετε μέχρι το θερμαινόμενο καπάκι του θερμοκυκλωτή φτάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία πριν τη χρήση. Χρησιμοποιήστε τον κατάλληλο συγκρατητήρα PCR με 96 πηγαδάκια για να εξασφαλίσετε τη σωστή θερμοκρασία επώασης.

3. Μεταφέρετε όλα τα αντιδραστήρια (εκτός από τη φιάλη καφέ χρώματος 100X SAPE) από τις συνθήκες φύλαξης σε θερμοκρασία δωματίου. Διανείμετε τους απαραίτητους όγκους αντιδραστηρίων σε καθαρά δοχεία.

Βεβαιωθείτε ότι έχετε παρασκευάσει 1X SAPE κατά τη διάρκεια του τρίτου βήματος πλύσης. Μετακινήστε τη φιάλη 100X SAPE από τη φύλαξη μόνο όταν χρειάζεται και επιστρέψτε την αμέσως στους 2° έως 8° C. Επαναφέρατε τυχόν αχρησιμοποίητα τμήματα Μείγματος σφαιριδίων και ρυθμιστικού διαλύματος SAPE στους 2° έως 8° C. (Μην καταψύχετε εκ νέου το μείγμα σφαιριδίων μετά την απόψυξη).

Πίνακας 3: Προετοιμασία αντιδραστηρίου

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά εξέταση	Μέθοδος παρασκευής και υποδείξεις
Μείγμα Σφαιριδίων	4 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Μεταφέρετε τον κατάλληλο όγκο καθώς και τον πρόσθετο όγκο*, για τον ζητούμενο αριθμό εξετάσεων, σε καθαρό σωλήνα σε θερμοκρασία δωματίου. • Προστατεύστε το από το φως. Χρησιμοποιήστε ολόκληρο το περιεχόμενο του Μείγματος Σφαιριδίων για 96 δείγματα. • Αναμείξτε με στροβιλισμό αμέσως πριν τη χρήση.
Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδισμού:	34 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Μεταφέρετε για ακριβώς τον ίδιο αριθμό εξετάσεων όπως με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για το Μείγμα σφαιριδίων. • Προσθέστε στο μοιρασμένο εκ των προτέρων Μείγμα σφαιριδίων για να παρασκευάσετε το Μείγμα υβριδισμού. • Διατηρήστε σε θερμοκρασία δωματίου (20° ως 25° C) μέχρι τη χρήση.
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης	480 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Μεταφέρετε τον κατάλληλο όγκο συν έξτρα όγκο*, για το ζητούμενο αριθμό εξετάσεων και διατηρήστε σε θερμοκρασία δωματίου (20° ως 25° C). • Χρησιμοποιήστε ολόκληρο το περιεχόμενο σε υποδοχή για 96 δείγματα.
Ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης	2,5 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Μεταφέρετε τον κατάλληλο όγκο συν έξτρα όγκο*, για τον αριθμό εξετάσεων. • Χρησιμοποιήστε ολόκληρο το περιεχόμενο σε υποδοχή για 96 δείγματα. Διατηρήστε σε θερμοκρασία δωματίου (20° ως 25° C).
Ρυθμιστικό Διάλυμα Ουδετεροποίησης	5 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Μεταφέρετε τον κατάλληλο όγκο συν έξτρα όγκο*, για τον αριθμό εξετάσεων. • Χρησιμοποιήστε 2,5 ml για 96 δείγματα.

		Διατηρήστε σε θερμοκρασία δωματίου (20° ως 25° C).
Στοκ SAPE (100X)	0,5 μl	<ul style="list-style-type: none"> Κατά τη διάρκεια του τελευταίου βήματος φυγοκέντρησης, παρασκευάστε διάλυμα 1X SAPE δημιουργώντας αραιώση Στοκ SAPE 1:100 με ρυθμιστικό διάλυμα SAPE για τον ζητούμενο αριθμό εξετάσεων συν τον έξτρα όγκο.* Προστατεύστε το από το φως. Ετοιμάστε αρκετό διάλυμα 1XSAPE για 96 δείγματα (πρέπει να επαρκεί για περίπου 110 δείγματα, ανάλογα με το παρατηρούμενο σφάλμα κατά τη μεταφορά με πιπέτα). Διατηρήστε τη φιάλη Στοκ SAPE στους 2° ως 8° C.
ρυθμιστικό διάλυμα SAPE	49,5 μl	

*Σημείωση: Ο έξτρα όγκος που απαιτείται εξαρτάται από την τεχνική αναρρόφησης με πιπέτα και την κατάσταση βαθμονόμησης του εξοπλισμού. Χρησιμοποιήστε πλήρη όγκο του Μείγματος σφαιριδίων στο σωλήνα που παρέχεται (αρκετό για περίπου 110 εξετάσεις) για 96 εξετάσεις. Παρασκευάστε 1X SAPE για 115 εξετάσεις και χρησιμοποιήστε ολόκληρο τον όγκο των άλλων αντιδραστηρίων για να μην αντιμετωπίσετε έλλειψη. Συνιστούμε βαθμονόμηση όλων των συσκευών αναρρόφησης με πιπέτα και εξέταση των συσκευών αυτών με χρήση μικροτέρων ποσοτήτων νερού. Για αντιδραστήρια που παρέχονται σε περίσσεια όγκου, όπως το Ρυθμιστικό Διάλυμα Αποδιάταξης και Εξουδετέρωσης, μπορείτε να χρησιμοποιήσετε σκαφάκι για πολλά κανάλια αναρρόφησης με πιπέτα.

Πίνακας 4: Όγκοι αντιδραστηρίων

Αριθμός εξετάσεων	Ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης (μl)	Ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης (μl)	Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού (μl)	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (μl)	Μείγμα σφαιριδίων (μl)
1	2,5	5	34	480	4

10	25	50	340	4800	40
20	50	100	680	9600	80
50	125	250	1700	24000	200
96	240	480	3264	46080	384

Πίνακας 5: SAPE και όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος SAPE

Αριθμός εξετάσεων	Όγκος στοκ SAPE (μl)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος SAPE (μl)
1	0,5	49,5
10	5	495
20	10,0	990,0
50	25,0	2475,0
96	48,0	4752,0

Σημείωση: Ο όγκος αντιδραστηρίων στους Πίνακες 4 και 5 είναι για τον ακριβή αριθμό εξετάσεων. Ο πραγματικός αριθμός των υπο-δειγμάτων διαφέρει ανάλογα με την ακρίβεια της αναρρόφησης με πιπέττα. Για πλήρη προσδιορισμό 96 δειγμάτων, συνιστάται η χρήση ολόκληρου του μείγματος σφαιριδίων, ολόκληρου του όγκου ρυθμιστικού διαλύματος υβριδοποίησης, 57,5 μl μητρικού διαλύματος SAPE και 5693 μl ρυθμιστικού διαλύματος SAPE, δηλαδή ποσότητες που είναι ελαφρώς μεγαλύτερες από τις ακριβείς ποσότητες που απαιτούνται για τη δοκιμασία.

D. Διαδικασία εξέτασης

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Για να προσδιορίσετε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων (48 ή μικρότερο) μπορείτε να χρησιμοποιήσετε ένα δίσκο με 96 πηγαδάκια, ένα δίσκο που έχει προσαρμοστεί για τον κατάλληλο αριθμό φρεατίων ή μια σειρά σωλήνων λεπτού τοιχώματος PCR 0,2 ml. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε στατώ σωλήνων κατά τη διάρκεια χρήσης δίσκου αποκοπής ή σειράς σωλήνων.
2. Η ανάμειξη δειγμάτων σε δίσκο με 96 πηγαδάκια περιλαμβάνει κάλυψη του δίσκου και χαμηλή ταχύτητα στροβιλισμού για λίγα δευτερόλεπτα. Προσαρμόστε την ταχύτητα της συσκευής ανάμειξης στροβιλισμού έτσι ώστε

το υγρό στο εσωτερικό του δίσκου PCR με 96 πηγαδάκια να συσσωματωθεί επαρκώς χωρίς υπερβολικό πιπίλισμα. Σημειώστε τη ρύθμιση ταχύτητας και χρησιμοποιήστε την για τη μέθοδο δίσκου με 96 πηγαδάκια.

3. Η κάλυψη του δίσκου PCR με 96 πηγαδάκια πρέπει να γίνει προσεκτικά και ολοκληρωτικά προς αποφυγή μόλυνσης δειγμάτων από πηγαδάκι σε πηγαδάκι. Σφραγίστε το δίσκο πιέζοντας το πώμα έναντι κάθε χείλους των με 96 πηγαδάκια. Μην επαναχρησιμοποιείτε τα πώματα δίσκου. Χρησιμοποιήστε καινούργιο πώμα για κάθε βήμα που απαιτεί εφαρμογή πώματος δίσκου. Επαναληπτική πιπέττα μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπου είναι δυνατόν. Ωστόσο, η επαναληπτική πιπέττα είναι λιγότερο ακριβής στη χορήγηση όγκων.

4. Συνιστούμε τακτική βαθμονόμηση και χειροκίνητο έλεγχο όγκου για κάθε όγκο που χορηγείται. Μη χρησιμοποιείτε επαναληπτική πιπέττα για τη χορήγηση του Μείγματος Υβριδισμού.

1. Αποδιάταξη/Εξουδετέρωση

- a) Παρασκευάστε λουτρό με θρυμματισμένο πάγο.
- b) Τοποθετήστε μια καθαρή πλάκα με 96 πηγαδάκια στο συγκρατητήρα δίσκου.
- c) Μεταφέρετε 5 μl από κάθε δείγμα ενισχυμένου DNA σε πηγαδάκι καθαρής πλάκας με 96 πηγαδάκια. Βεβαιωθείτε ότι έχετε καταγράψει τις θέσεις και τον αναγνωριστικό αριθμό των δειγμάτων.
- d) Προσθέστε 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης. Αναμείξτε ολοκληρωτικά (κατά προτίμηση με πιπέττα που κινείται πάνω-κάτω), και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25° C) επί 10 λεπτά.
- e) Προσθέστε με πιπέττα 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος και αναμείξτε εντελώς (κατά προτίμηση με πιπέττα που κινείται πάνω-κάτω). Σημειώστε την αλλαγή χρώματος προς το ανοιχτό ή ωχρό κίτρινο.
- f) Τοποθετήστε την πλάκα PCR με το εξουδετερωμένο προϊόν PCR στο λουτρό πάγου.

Προσοχή: Αποφύγετε την μόλυνση του προϊόντος PCR με νερό.

2. Υβριδισμός

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι ο θερμοκυκλωτής έχει ενεργοποιηθεί και έχει ξεκινήσει το πρόγραμμα 60° C για θέρμανση της θερμοαντιβιοτικής πλάκας.

- a) Συνδυάστε τους κατάλληλους όγκους Μείγματος σφαιριδίων και ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού για να παρασκευάσετε το Μείγμα Υβριδισμού.
- b) Προσθέστε 38 μl Μείγματος Υβριδισμού σε κάθε πηγαδάκι.
- c) Καλύψτε το δίσκο με κάλυμμα δίσκου και αναμείξτε καλά με στροβιλισμό σε χαμηλή ταχύτητα.
- d) Αφαιρέστε από τον συγκρατητήρα δίσκου και τοποθετήστε σε δίσκο PCR στον προθερμασμένο θερμοκυκλωτή (60° C).
- e) Τοποθετήστε το επίθεμα PCR στο άνω μέρος του δίσκου ή τα καπάκια στα σωληνάρια PCR. Κλείστε και σφίξτε το καπάκι. Επώαστε για 15 λεπτά.
- f) Τοποθετήστε το δίσκο στο συγκρατητήρα δίσκου και αφαιρέστε το κάλυμμα δίσκου. Προσθέστε γρήγορα 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε κάθε πηγαδάκι. Καλύψτε το δίσκο με κάλυμμα δίσκου. Φυγοκεντρήστε το δίσκο για 5 λεπτά στα 1000 -1300 g. Τοποθετήστε το δίσκο στο συγκρατητήρα και αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης.
- g) Επαναλάβετε το βήμα 2.f παραπάνω, για ακόμη δύο φορές για ένα σύνολο τριών βημάτων πλύσης. Θυμηθείτε να παρασκευάσετε διάλυμα 1X SAPE κατά τη διάρκεια της τρίτης φυγοκέντρησης.

3. Σήμανση

- a) Τοποθετήστε το δίσκο στο συγκρατητήρα. Προσθέστε 50 μl διαλύματος 1X SAPE σε κάθε πηγαδάκι. Τοποθετήστε το κάλυμα δίσκου και αναμείξτε ολοκληρωτικά με στροβιλισμό σε χαμηλή ταχύτητα. Τοποθετήστε το δίσκο στον προθερμασμένο θερμοκυκλωτή (60° C). Τοποθετήστε το επίθεμα PCR στο άνω μέρος του δίσκου ή τα καπάκια στα σωληνάρια PCR. Κλείστε και σφίξτε το καπάκι. Επώαστε για 5 λεπτά.
- b) Αφαιρέστε το δίσκο. Τοποθετήστε το δίσκο στο συγκρατητήρα. Αφαιρέστε το πώμα και προσθέστε γρήγορα 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε κάθε πηγαδάκι.
- c) Καλύψτε το δίσκο με κάλυμμα δίσκου. Φυγοκεντρήστε το δίσκο για 5 λεπτά στα 1.000 -1.300 g. Τοποθετήστε το δίσκο στο συγκρατητήρα και αφαιρέστε το υπερκείμενο.
- d) Προσθέστε 70 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε κάθε πηγαδάκι. Αναμείξτε ομαλά με πιπέττα. Μεταφέρετε σε πλάκα ανάγνωσης

χρησιμοποιώντας πιπέττα 8 ή 12 καναλιών. Αποφύγετε τη μόλυνση δείγματος προς δείγμα χρησιμοποιώντας νέα ακροφύσια πιπεττών.

Σημείωση: Ο τελικός όγκος πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 μl.

e) Καλύψτε το δίσκο με πώμα και αλουμινόχαρτο. Διατηρήστε το δίσκο στο σκοτάδι και στους 4° C μέχρι να τοποθετηθεί στο LABScan™ 100 για ανάγνωση.

f) Για καλύτερα αποτελέσματα, διαβάστε τα δείγματα το συντομότερο δυνατόν . Παρατεταμένη φύλαξη των δειγμάτων (περισσότερο από 4 ώρες) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σήματος. Φυλάξτε τα δείγματα τη νύχτα στους 4° C στο σκοτάδι με κάλυμμα δίσκου, αν δεν μπορούν να διαβαστούν αμέσως.

Βεβαιωθείτε ότι αναμείξατε τα δείγματα ολοκληρωτικά πριν την ανάγνωση.

4. Λήψη δεδομένων:Ακολουθεί ένας γενικός οδηγός για τη λήψη δεδομένων. Για επιπλέον λεπτομέρειες σχετικά με τη χρήση του LABScan™ 100, συμβουλευτείτε το “Luminex® 100 User’s Manual” για την έκδοση λογισμικού που χρησιμοποιείτε.

a) Ενεργοποιήστε το σύστημα και ρυθμίστε το LABScan™ 100 για λήψη και βαθμονόμηση σύμφωνα με τη Luminex® στο “Luminex User’s Manual”¹ για τη χρησιμοποιούμενη έκδοση λογισμικού.

b) Επιλέξτε ένα πρότυπο με βάση τον αριθμό καταλόγου και τον αριθμό παρτίδας του προϊόντος.

1) Τα πρότυπα λήψης είναι διαθέσιμα από την One Lambda σε ένα CD ή μπορείτε να τα πάρετε από την ιστοσελίδα της One Lambda.

2) Για να δημιουργήσετε το δικό σας πρότυπο λήψης, ακολουθήστε τις οδηγίες του κεφαλαίου Λήψη του ” Luminex User’s Manual”.Εκκίνηση

c. Δημιουργήστε ένα όνομα αρχείου για τα δείγματα που θα μετρηθούν.

d. Βεβαιωθείτε ότι όλες οι ρυθμίσεις του προτύπου είναι σωστές.

e. Καταχωρίστε τις ταυτότητες των δειγμάτων.

Προσοχή: Αν το ίδιο δείγμα υποβάλλεται σε πολλές δοκιμασίες, θα πρέπει να εκχωρηθεί διαφορετικός αριθμός ταυτότητας.

f. Η πλάκα είναι τώρα έτοιμη για ανάλυση.

g. Τοποθετήστε την πλάκα στη βάση XY και γεμίστε το δοχείο με υγρό περιβλήματος.

h. Κάντε κλικ στο κουμπί START (Έναρξη) για να ξεκινήσετε τη διαδικασία. Αφού ολοκληρωθεί η ανάλυση των δειγμάτων, η έξοδος δεδομένων θα πρέπει να αποθηκευτεί σε ένα αρχείο .csv.

i. Πλύντε το μηχάνημα 2 φορές με υγρό περιβλήματος στο τέλος της διαδικασίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμός Δεδομένων

A. Η ένταση φθορισμού (FI) που παράγεται από το λογισμικό Data Collector του Lumipex®, ή άλλο αντίστοιχο, περιέχει την ένταση φθορισμού για κάθε σφαιρίδιο (ή ανιχνευτή δεσμευμένο στο σφαιρίδιο) ανά δείγμα. Το ποσοστό θετικής τιμής υπολογίζεται ως εξής:

FI (Ανιχνευτής n) - FI(Ανιχνευτής Αρνητικού μάρτυρα)

Ποσοστό Θετικής Τιμής = $100 \times$

FI(Ανιχνευτής θετικού μάρτυρα) - FI(Ανιχνευτής Αρνητικού μάρτυρα)

Η θετική αντίδραση προσδιορίζεται από το ποσοστό των θετικών τιμών για τον ανιχνευτή που είναι υψηλότερο από την προκαθορισμένη τιμή αποκοπής για τον ανιχνευτή. Η αρνητική αντίδραση προσδιορίζεται ως το ποσοστό των θετικών τιμών που είναι χαμηλότερο από την τιμή αποκοπής.

B. Συγκρίνετε τις υπολογισμένες θετικές τιμές με τις προκαθορισμένες τιμές αποκοπής για κάθε ανιχνευτή εξέτασης. Δώστε θετικό χαρακτήρα σε ανιχνευτές που έχουν θετικό ποσοστό πάνω από την τιμή αποκοπής και αρνητική απόδοση σε εκείνους που έχουν ποσοστό κάτω από την τιμή αποκοπής. Η FI των θετικών μαρτύρων πρέπει να βρίσκεται εντός του διαστήματος 1000 - 4000 FI. (Η τιμή FI μπορεί να βρεθεί εκτός του συγκεκριμένου εύρους τιμών (βλ. Αναμενόμενες τιμές, Ενότητα Γ) και ποικίλλει για κάθε ιχνηλάτη και παρτίδα θετικού μάρτυρα.). Η FI κάθε ανιχνευτή κανονικοποιείται έναντι της FI θετικού μάρτυρα και εκφράζεται ως ποσοστό της FI θετικού μάρτυρα. Η προκαθορισμένη τιμή αποκοπής για κάθε ανιχνευτή καθιερώθηκε χρησιμοποιώντας σειρά DNA με 100-200 δείγματα.

C. Προσδιορίστε το αλληλόμορφο HLA (ή ομάδες αλληλόμορφων) του δείγματος ταιριάζοντας το υπόδειγμα του αναγνωριστικού αριθμού θετικών και αρνητικών σφαιριδίων με τις πληροφορίες του φύλλου εργασίας του LABType® SSO.

Περίληψη πρωτοκόλλου για προσδιορισμό 96 δειγμάτων

A. Ρύθμιση εξέτασης

1. Ενεργοποιήστε τον αναλυτή LABScan™ 100 και ξεκινήστε τη διαδικασία ενεργοποίησης. Ενεργοποιήστε το θερμοκυκλωτή και ξεκινήστε το πρόγραμμα επώασης στους 60°C.
2. Προετοιμάστε λουτρό θρυμματισμένου πάγου (προσθέστε μικρή ποσότητα νερού για να επιτρέψετε στο δίσκο PCR να στέκεται στον πάγο).
3. Αποψύξτε και αναμείξτε με στροβιλισμό το D-Mix και το DNA.
4. Αφαιρέστε όλα τα αντιδραστήρια (εκτός από τη φιάλη 100x SAPE) από τη θερμοκρασία αποθήκευσης και χρησιμοποιήστε τα σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Αναμείξτε ολόκληρο τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού και όλο το μείγμα σφαιριδίων σε καθαρό σωλήνα. Προστατέψτε από το φως.

B. Ενίσχυση

1. Αποψύξτε όλα τα αντιδραστήρια ενίσχυσης και τοποθετήστε τα στον πάγο.
2. Μεταφέρετε 2 μl γονιδιωματικού DNA σε καθένα από τα 96 πηγαδάκια σε δίσκο PCR.
3. Αναμείξτε 432 μl Μείγματος Εκκινήτων, 1491 μl του Μείγματος D και 22 μl πολυμεράσης Taq. Αναμείξτε με στροβιλισμό καλά και προβείτε σε γρήγορη φυγοκέντρωση.
4. Μεταφέρετε 18 μl Μείγματος Ενίσχυσης από το Βήμα 3 και στα 96 πηγαδάκια που περιέχουν DNA.
5. Καλύψτε ή σφραγίστε το δίσκο PCR.
6. Βάλτε το δίσκο σε κλίβανο PCR χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα LABType® SSO PCR.
7. Αφαιρέστε το δίσκο PCR από το φούρνο PCR και ελέγξτε το ενισχυμένο DNA σε πηκτή αгарόζης 2,5% (χρησιμοποιήστε 5 μl ανά πηγαδάκι).

C. Αποδιάταξη/Εξουδετέρωση

1. Σε ένα καθαρό, δίσκο λεπτού τοιχώματος PCR με 96 πηγαδάκια, μεταφέρετε 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης ανά πηγαδάκι.
2. Προσθέστε 5 μl ανά πηγαδάκι ενισχυμένου DNA. Σημειώστε τις τοποθεσίες δείγματος στα 96 πηγαδάκια.
3. Αναμείξτε καλά μέχρι το μείγμα να αλλάξει σε ανοιχτό ροζ χρώμα.
4. Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (20° ως 25° C) για 10 λεπτά.

5. Προσθέστε 5 μl ανά πηγαδάκι ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης.
6. Αναμείξτε καλά μέχρι το μείγμα να γίνει διαφανές ή ωχρό κίτρινο.
7. Τοποθετήστε το δίσκο προσεκτικά στο λουτρό πάγου.

D. Υβριδισμός/Πλύση

1. Μεταφέρετε 38 μl Μείγματος Υβριδισμού (από την A.4. παραπάνω) ανά πηγαδάκι σε εξουδετερωμένο DNA.
2. Τοποθετήστε το πώμα στο δίσκο και αναμείξτε καλά με στροβιλισμό σε χαμηλή ταχύτητα.
3. Επωάστε το δίσκο σε μπλοκ με 96 πηγαδάκια σε θερμοκυκλωτή 60° C (χρησιμοποιήστε το επίθεμα PCR) για 15 λεπτά.
4. Τραβήξτε έξω το δίσκο. Προσθέστε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε κάθε πηγαδάκι. Τοποθετήστε καινούργιο πώμα στο δίσκο και στροβιλίστε στα 1000 g για 5 λεπτά.
5. Αφαιρέστε το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 10 μl ή λιγότερο.
6. Επαναλάβετε τα Βήματα D.4 και D.5 δύο φορές ακόμα για 3 συνολικά πλύσεις.
7. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου βήματος φυγοκέντρωσης, παρασκευάστε 1X SAPE (57,5 μl Στοκ και 5693 μl ρυθμιστικού διαλύματος SAPE) και αφήστε καλυμμένο σε θερμοκρασία δωματίου.

E. Σήμανση

1. Μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου από την τρίτη πλύση (D.6 παραπάνω), προσθέστε 50 μl 1X SAPE ανά πηγαδάκι.
2. Τοποθετήστε το πώμα στο δίσκο προσεκτικά και αναμείξτε καλά με στροβιλισμό σε χαμηλή ταχύτητα.
3. Επωάστε σε θερμοκυκλωτή με θερμοκρασία 60° C όπως παραπάνω για 5 λεπτά.
4. Τραβήξτε έξω το δίσκο και προσθέστε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε κάθε πηγαδάκι. Τοποθετήστε ένα νέο πώμα στο δίσκο και στροβιλίστε στα 1000 g για 5 λεπτά.
5. Αφαιρέστε το υπερκείμενο. Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης έως τελικό όγκο 80 μl.
6. Αναμείξτε με πιπέττα και μεταφέρετε όλα τα δείγματα στην μικροπλάκα με 96 πηγαδάκια για λήψη δεδομένων.

II Μέθοδος Πυροαλληλούχησης Pyrosequencing

Pyrosequencing

Πρωτόκολλο

Προετοιμασία

Συνδέουμε το όργανο με την αντλία κενού, το δοχείο απόρριψης και τους σωλήνες

Όλα τα αντιδραστήρια να είναι σε θερμοκρασία δωματίου. Το προϊόν της PCR ακινητοποιείται σε σφαιρίδια καλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Για κάθε δείγμα ο τελικός όγκος είναι 80 μl και περιλαμβάνει 20 μl βιοτυνιλιωμένο προϊόν PCR, 3 μl σφαιρίδια Στρεπταβιδίνης, 40 μl ρυθμιστικό διάλυμα και 17 μl νερό υψηλής καθαρότητας.

A) Γίνεται ελαφρά ανακίνηση των σφαιριδίων για ομογενοποίηση.

B) Ετοιμάζεται μείγμα σφαιρίδια Στρεπταβιδίνης, ρυθμιστικού διαλύματος και νερό υψηλής καθαρότητας ικανό για όλα τα δείγματα που θα αναλυθούν.

Γ) προστίθενται 60 μl του μείγματος σε 30 θέσεις της πλάκας PCR

Δ) προστίθενται το προϊόν PCR στα σε 30 θέσεις της πλάκας PCR (τελικός όγκος 80 μl)

E) Καλύπτεται η πλάκα PCR και

ΣΤ) ανακινείται για 5-10 λεπτά στον ανακινητήρα

Αποδιάταξη

Ελέγχονται τα σωληνάρια αναρρόφησης του οργάνου και το δοχείο απόρριψης (αδειάζεται αν είναι γεμάτο)

A) Γεμίζονται τα μπανάκια:

1° 110 ml 70% μεθανόλης

2° 90 ml διάλυμα αποδιάταξης

3° 110 ml ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος

4° 110 ml υψηλής καθαρότητας νερό

5° 180 ml υψηλής καθαρότητας νερό (parking position)

B) ενεργοποιείται η αντλία

Γ) ανοίγει ο διακόπτης του κενού

- Δ) πλένονται τα πρόμπς στο «parking position»
- Ε) Ξαναγεμίζεται το parking position με 180 ml υψηλής καθαρότητας νερό
- Στ) κλείνουμε την αντλία
- Ζ) φορτώνουμε την πλάκα σε κάθε πηγαδάκι
- Η) τοποθετείται η πλάκα στο όργανο
- Θ) Ανοίγει το κενό
- Ι) αναρροφώνται το σφαιρίδια στα σωληνάρια (πρόμπς)
- Ια) επιββαίωση ότι όλα τα σφαιρίδια έχουν αναρροφηθεί καθώς και το υγρό
- Ιβ) μεταφέρεται στο μπανάκι με την Αιθανόλη (1^ο)
- Ιγ) μεταφέρεται στο μπανάκι με το διάλυμα αποδιάταξης (2^ο)
- Ιδ) μεταφέρεται στο μπανάκι με το διάλυμα πλυσίματος (3^ο)
- Ιε) αναμένουμε να αναρροφήσει τα πολλά υγρά
- Ιστ) κλείνει το κενό
- Ιζ) απελευθρώνονται τα σφαιρίδια στη πλάκα που περιέχει 0,4 μM εκκινητές και 40 μl ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης σε κάθε πηγαδάκι ανακινώντας ελαφρά.
- Ιη) μεταφέρεται στο μπανάκι με το νερό (4^ο) και ανακινείται για 10 ''
- Ιθ) ξεπλένονται τα πρόμπς στο μπανάκι πάρκινγκ με νερό υψηλής καθαρότητας
- Κ) τοποθετούμε σε οριζόντια θέση για δευτερόλεπτα
- Κα) κλείνουμε το κενό
- Κβ) για επόμενες πλάκες επαναλαμβάνονται τα βήματα από το Ζ) και εξής
- Κγ) κλείνουμε το κενό
- Κδ) αδειάζονται τα απόβλητα, και ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή για το καθάρισμα
- Αποδιάταξη
- 1) θερμαίνεται η πλάκα με τα δείγματα στους 80oC για 2 λεπτά
- 2) απομακρύνεται η πλάκα
- 3) Ακολουθεί η αντίδραση του pyrosequence
- Pyrosequence
- 1) περνάμε τα δεδομένα στον υπολογιστή μας
- 2) οι παράμετροι είναι ανάλογοι των αναλύσεων και επιλέγονται τα αντίστοιχα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που θα χρειαστούν. Μας τα δίνει το πρόγραμμα αυτόματα, αφού περάσουμε τις παραμέτρους

3. Προστίθενται το ένζυμο, υπόστρωμα και νουκλεοτίδια στον ειδικό πολλαπλό υποδοχέα
 4. τοποθετείται ο ειδικός υποδοχέας με τα αντιδραστήρια καθώς και η πλάκα που θα αναλυθεί, στο μηχάνημα.
 5. ξεκινά η λειτουργία
- Έκδοση αποτελεσμάτων

Pyrosequencing

- Ακολουθείται η διαδικασία για τη PCR. Λαμβάνουμε (100-300pb) με ένα εκκινήτηρα βιοτινιλιωμένο
- Το προϊόν της PCR ακινητοποιείται σε σφαιρίδια καλυμμένα με στρεπταβιδίνη
- Γίνεται αποδιάταξη του DNA (μονή αλυσίδα) με χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH)
- Γίνεται έκπλυση της μονής έλικας DNA

III Πρωτογενή Αποτελέσματα

Πρωτογενή Αποτελέσματα - Raw data

ID	B	B	MICA
id_001	*51	_	MICA*009 MICA*009
id_002	*18	*49	MICA*004 MICA*018
id_003	*18	*35	MICA*018 MICA*016
id_004	*35	*51	MICA*002 MICA*009
id_005	*08	*51	MICA*008 MICA*009
id_006	*27	*51	blank,MICA*009
id_007	*18	*51	blank, MICA*009
id_008	*35	*38	blank, MICA*016
id_009	*35	*44	MICA*008 MICA*009
id_010	*18	*51	MICA*018 MICA*009
id_011	*51	*58	MICA*002 MICA*009
id_012	*49	*51	MICA*004 blank
id_013	*18	*35	MICA*018 MICA*002
id_014	*44	*51	MICA*018 MICA*009
id_015	*18	*35	MICA*018 MICA*002
id_016	*18	*57	MICA*017 MICA*018
id_017	*40	*57	MICA*017 MICA*027
id_018	*18	*18	MICA*018 MICA*018
id_019	*14	*44	MICA*008 MICA*011
id_020	*18	*53	MICA*018 blank
id_021	*14	*51	MICA*008 MICA*011
id_022	*18	*51	MICA*018 MICA*009
id_023	*35	*35	MICA*009 MICA*009
id_024	*50	*56	MICA*009 blank
id_025	*35	*50	MICA*009 MICA*016
id_026	*13	*55	MICA*008 MICA*012
id_027	*44	*55	MICA*008 MICA*012
id_028	*08	*27	MICA*008 blank,

id_029	*51	*57	MICA*010 MICA*018
id_030	*18	*35	MICA*018 MICA*009
id_031	*15	*35	MICA*008 MICA*016
id_032	*07	*44	MICA*004 MICA*008
id_033	*14	*18	MICA*011 MICA*018
id_034	*18	*51	MICA*018 MICA*009
id_035	*27	*35	MICA*008 blank,
id_036	*35	*38	MICA*002 MICA*016
id_037	*35	*51	MICA*002 MICA*009
id_038	*18	*18	MICA*018 MICA*018
id_039	*50	*51	MICA*009 MICA*009
id_040	*14	*38	MICA*011 blank,
id_041	*15	*37	MICA*008 MICA*008
id_042	*08	*15	MICA*008 MICA*008
id_043	*35	*57	MICA*017 MICA*009
id_044	*44	*51	MICA*004 MICA*010
id_045	*18	*37	MICA*008 MICA*018
id_046	*41	*57	MICA*004 MICA*017
id_047	*18	*44	MICA*001 MICA*008
id_048	*15	*51	MICA*008 MICA*009
id_049	*18	*44	MICA*008 MICA*018
id_050	*18	*35	MICA*018 MICA*002
id_051	*18	*51	MICA*018 MICA*009
id_052	*39	*53	MICA*047 blank,
id_053	*35	*52	MICA*002 MICA*009
id_054	*13	*51	MICA*008 MICA*009
id_055	*18	*35	MICA*0018 MICA*016
id_056	*51	*51	MICA*0008 MICA*009
id_057	*07	*44	MICA*0008 MICA*0018
id_058	*07	*07	MICA*0008 MICA*0008
id_059	*07	*51	MICA*0008 MICA*009
id_060	*07	*44	MICA*0004 MICA*0008

id_061	*52	*73	MICA*009 MICA*00YXH
id_062	*08	*08	MICA*0004 MICA*0008
id_063	*13	*53	MICA*0008 MICA*00DUU
id_064	*13	*53	
id_065	*35	*51	MICA*006 MICA*016
id_066	*39	*44	MICA*0008 MICA*0047
id_067	*18	*51	MICA*0006 MICA*0018
id_068	*14	*44	MICA*0008 MICA*0011
id_069	*18	*35	MICA*0018 MICA*00DUU
id_070	*35	*51	MICA*009 MICA*016
id_071	*27	*35	MICA*002 MICA*007/045
id_072	*41	*44	MICA*0004 MICA*0008
id_073	*08	*1517	MICA*0008 MICA*0008
id_074	*18	*44	MICA*0004 MICA*0018
id_075	*51	*51	MICA*009 MICA*009
id_076	*18	*51	MICA*018 MICA*009
id_077	*08	*51	MICA*0006 MICA*0008
id_078	*35	*51	MICA*0004 MICA*00DUU
id_079	*13	*44	MICA*0008 MICA*0008
id_080	*18	*55	
id_081			MICA*008 MICA*016
id_082	*18	*40	MICA*0008 MICA*0018
id_083	*35	*51	MICA*006 MICA*002
id_084	*44	*51	MICA*008 MICA*009
id_085	*18	*35	MICA*0018 MICA*00DUU
id_086	*38	*55	MICA*0012 MICA*00DUU
id_087	*18	*51	MICA*0008 MICA*0018
id_088	*08	*35	MICA*008 MICA*019/33
id_089	*14	*51	
id_090	*35	*47	MICA*0008 MICA*00DUU
id_091	*18	*35	MICA*018 MICA*016
id_092	*08	*51	MICA*0008 MICA*049

id_093	*14	*51	MICA*0006 MICA*0011
id_094	*35	*41	MICA*0004 MICA*009
id_095	*18	*44	MICA*0008 MICA*0018
id_096	*35	*44	MICA*008 MICA*019/33
id_097	*35	*44	MICA*0008 MICA*016
id_098	*35	_	MICA*002 MICA*016
id_099	*18	*52	MICA*0018 MICA*009
id_100	*27	*35	
id_101	*13	*35	MICA*0008 MICA*009
id_102	*40	*44	MICA*0008 MICA*00DUU
id_103	*1517	*27	MICA*0008 MICA*00JJX
id_104	*38	*39	
id_105	*08	*51	MICA*0006 MICA*0008
id_106	*37	*38	MICA*0008 MICA*00DUU
id_107	*27	*35	MICA*00XX1 MICA*009
id_108	*38	*38	MICA*0008 MICA*00DUU
id_109	*18	*27	
id_110	*44	*58	MICA*0008 MICA*00DUU
id_111	*08	*52	MICA*008 MICA*009
id_112	*51	*58	MICA*002 MICA*009
id_113	*51	*57	MICA*0017 MICA*009
id_114	*39	_	
id_115	*35	*51	MICA*049 MICA*016
id_116	*49	*51	MICA*004 MICA*009
id_117	*35	*51	MICA*002 MICA*009
id_118	*35	*51	MICA*0008 MICA*00DUU
id_119	*44	_	MICA*0008 MICA*0008
id_120	*18	*44	MICA*0008 MICA*0018
id_121	*18	*27	MICA*0018 MICA*00XX1
id_122	*18	*44	MICA*0008 MICA*0018
id_123	*18	*51	MICA*0018 MICA*00XX1
id_124	*35	*51	MICA*009 MICA*009

id_125	*07	*49	MICA*0004 MICA*0008
id_126	*18	*51	MICA*0018 MICA*00XX1
id_127	*07	*44	MICA*0008 MICA*0008
id_128	*08	*15	MICA*0008 MICA*0010
id_129	*18	*39	MICA*0018 MICA*0047
id_130	*18	*51	MICA*0018 MICA*009
id_131	*18	*55	
id_132	*07	*35	MICA*0008 MICA*00DUU
id_133	*37	*49	MICA*0004 MICA*0008
id_134	*08	*41	MICA*0004 MICA*0008
id_135	*07	*55	MICA*0008 MICA*0012
id_136	*51	_	MICA*009 MICA*009
id_137	*27	*40	MICA*0008 MICA*00JJX
id_138	*38	*44	MICA*0008 MICA*0008
id_139	*18	*35	MICA*0018 MICA*00DUU
id_140	*50	*51	MICA*009 MICA*009
id_141	*13	*41	MICA*0004 MICA*0008
id_142	*51	_	MICA*009 MICA*009
id_143	*35	*49	MICA*004 MICA*002
id_144	*18	*35	MICA*0018 MICA*00DUU
id_145	*39	*45	MICA*0015 MICA*0047
id_146	*35	*51	MICA*008 MICA*016
id_147	*35	*39	MICA*047 MICA*016
id_148	*18	*27	MICA*0018 MICA*00XX1
id_149	*07	*27	MICA*0008 MICA*0027
id_150	*13	*73	MICA*0008 MICA*0029
id_151	*27	*44	MICA*0008 MICA*00JJX
id_152	*08	*18	MICA*0008 MICA*0018
id_153	*18	*49	MICA*0004 MICA*0018
id_154	*18	*53	MICA*0018 MICA*00DUU
id_155	*2705	3101	MICA*0008 MICA*00JJX
id_156	*39	*51	MICA*006 MICA*002

id_157	*51	*57	MICA*0017 MICA*009
id_158	*15	*51	MICA*0010 MICA*009
id_159	*1402	*40	
id_160	*4403	*51	MICA*0004 MICA*049
id_161	*08	*51	MICA*0006 MICA*0008
id_162	1517	*37	MICA*0008 MICA*0008
id_163	*18	*53	MICA*018 MICA*002
id_164	*3502	*51	MICA*049 MICA*016
id_165	*39	*51	MICA*002 MICA*009
id_166	*49	*51	MICA*0004 MICA*009
id_167	*13	*52	MICA*0008 MICA*009
id_168	*18	*55	
id_169	*18	*38	MICA*018 MICA*002
id_170	*3502	*51	MICA*009 MICA*016
id_171	*35	*51	MICA*009 MICA*009
id_172	*37	*55	MICA*0008 MICA*0012
id_173	*39	*57	MICA*0017 MICA*00XX1
id_174	*38	*44	MICA*0008 MICA*00DUU
id_175	*08	*2702	MICA*0008 MICA*00JJX
id_176	*49	*50	MICA*0004 MICA*009
id_177	*38	*51	MICA*0008 MICA*00DUU
id_178	*35	*51	MICA*002 MICA*009
id_179	*37	*38	MICA*0008 MICA*00DUU
id_180	*3502	*53	MICA*002 MICA*016
id_181	*1503	*44	MICA*0008 MICA*0008
id_182	*35	*52	MICA*0011 MICA*0012
id_183	*1402	55	MICA*0011 MICA*0012
id_184	*4001+	58	MICA*0008 MICA*00DUU
id_185	1901	*51	MICA*0004 MICA*009
id_186	*07	*51	MICA*0008 MICA*009
id_187	*57	_	MICA*0017 MICA*00XX1
id_188	*27	*39	MICA*018 MICA*002

id_189	*1501+	—	MICA0010 MICA*019/33
id_190	*51	*52	MICA*009 MICA*009
id_191	*4102	*51	MICA*0004 MICA*009
id_192	*44	—	MICA*0008 MICA*0018
id_193	*38	*51	MICA*002 MICA*009
id_194	*47	*55	MICA*0008 MICA*0012
id_195	*08	*52	MICA*0008 MICA*009
id_196	*51	—	MICA*009 MICA*009
id_197	*27	*50	MICA*00XX1 MICA*009
id_198	*0801	*5101	MICA*008 MICA*009
id_199	*1502	*18	MICA*019/33 MICA*0018
id_200	*07	*44	MICA*0008 MICA*0008
id_201	*3502	*35	MICA*002 MICA*016
id_202	*35	*57	MICA*009 MICA*0017
id_203	*1517	*35	MICA*00XX1 MICA*0008
id_204	*51	*52	MICA*009 MICA*009
id_205	*18	*44	MICA*0001 MICA*0008
id_206	*51	*55	MICA*0006 MICA*0012
id_207	*18	*39	MICA*018 MICA*002
id_208	*50	*51	MICA*009 MICA*009
id_209	*47	*57	MICA*00XX1 MICA*0008
id_210	*3508	*49	MICA*004 MICA*016
id_211	*18	*39	MICA*018 MICA*002
id_212	*1517	*35	MICA*008 MICA*016
id_213	*35	—	MICA*009 MICA*009
id_214	*07	*35	MICA*002 MICA*010/054
id_215	*35	*44	MICA*004 MICA*002
id_216	*13	*18	MICA*0008 MICA*0018
id_217	*07	*18	MICA*0008 MICA*0018
id_218	*35	*39	
id_219	*07	*51	MICA*0008 MICA*009
id_220	*18	*35	MICA*018 MICA*002

id_221	*18	*51	MICA*0006 MICA*0018
id_222	*35	*51	MICA*006 MICA*016
id_223	*35	*58	
id_224	*35	*44	MICA*004 MICA*016
id_225	*35	*50	MICA*009 MICA*016
id_226	15	*44	MICA*004 MICA*019
id_227	*39	*57	MICA*00XX1 MICA*0017
id_228	*15	*35	MICA*00XX1 MICA*016
id_229	*18	*51	MICA*0018 MICA*009
id_230	*35	*38	
id_231	*18	_	MICA*0018 MICA*0018
id_232	*18	_	MICA*0018 MICA*0018
id_233	*18	*52	MICA*0018 MICA*009
id_234	*35	*39	
id_235	*18	*50	MICA*0018 MICA*009
id_236	*49	*51	MICA*0004 MICA*049
id_237	*51	*52	MICA*009 MICA*009
id_238	*39	*55	MICA*002 MICA*012
id_239	*40	*49	MICA*0004 MICA*0027
id_240	*08	*51	MICA*0008 MICA*009
id_241	*1402	*18	MICA*0011 MICA*0018
id_242	*08	*1517	MICA*0008 MICA*0008
id_243	*08	*41	MICA*0004 MICA*0008
id_244	*08	*35	MICA*0008 MICA*009
id_245	*18	*39	MICA*018 MICA*002
id_246	*27	*45	
id_247	*18	*39	MICA*018 MICA*002
id_248	*39	_	
id_249	*14	*50	MICA*009 MICA*0011
id_250	*18	*51	MICA*0018 MICA*009
id_251	*27	*35	
id_252	*35	*44	MICA*009 MICA*0027

id_253	*41	*51	MICA*0004 MICA*009
id_254	*1501	*1801	MICA*00XX1 MICA*0018
id_255	*27	*56	MICA*0012 MICA*0027
id_256	*35/*51	OR *53/*78	MICA*002 MICA*049
id_257	*18	*55	MICA*0012 MICA*00XX1
id_258	*18	*5004	MICA*002 MICA*027
id_259	*52	_	MICA*009 MICA*019
id_260	*3501	*3503	MICA*002 MICA*016
id_261	*37	*44	MICA*0004 MICA*0008
id_262	*35	*49	MICA*004 MICA*016
id_263	*27	*51	
id_264	*18	*51	MICA*0018 MICA*009
id_265	*49	*50	MICA*0004 MICA*009
id_266	*18	*37	MICA*0008 MICA*0018
id_267	*35	_	MICA*009 MICA*009
id_268	*3501	*4006	MICA*002 MICA*027
id_269	*1801	*5101	MICA*0018 MICA*009
id_270	*18	*51	MICA*0018 MICA*009
id_271	*47	*51	MICA*0006 MICA*0008
id_272	*07	*4901	MICA*004 MICA*002
id_273	*18	*5001	MICA*0018 MICA*009
id_274	*3502	*7301	MICA*00XX1 MICA*016
id_275	*51	_	MICA*0006 MICA*009
id_276	*39	*51	MICA*002 MICA*049
id_277	*3502	*58	MICA*002 MICA*016
id_278	*18	*35	MICA*00XX1 MICA*0018
id_279	*51	*52	MICA*009 MICA*009
id_280	*1401	*51	MICA*009 MICA*019
id_281	*3502	*58	MICA*002 MICA*00XX2
id_282	*3502	*58	MICA*002 MICA*00XX2
id_283	*08	_	MICA*0008 MICA*0008
id_284	*0801	*35	MICA*00XX1 MICA*0008

id_285	*1402	*51	MICA*009 MICA*0011
id_286	*18	*37	MICA*008 MICA*018
id_287	*44	*50	
id_288	*13	*51	

Δημοσιεύσεις - Παρουσιάσεις

I Paper Human Immunology

Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA-B in Greek population, V. Birtsas, A. Batrinou, A. Dinou, J. Routsias, V. Gennimata, A. Iniotaki, M. Spyropoulou, A. Tsakris, Human Immunology 2021, doi.org/10.1016/j.humimm.2021.04.006 [152]

ARTICLE IN PRESS

Human Immunology xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect



journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm



Short Communication

Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA-B in Greek population

Vassilios Birtsas^{a,b,*}, Anthimia Batrinou^c, Amalia Dinou^b, John Routsias^a, Vassiliki Gennimata^a, Aiki Iniotaki^b, Maria Spyropoulou^b, Athanasios Tsakris^a

^aDepartment of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

^bNational Tissue Typing Center, General Hospital of Athens "G. Gennimatas", Athens, Greece

^cDepartment of Biomedical Sciences and Department of Food Science and Technology, University of West Attica, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2020

Revised 15 April 2021

Accepted 23 April 2021

Available online xxx

Keywords:

MICA

HLA-B

Linkage disequilibrium

Polymorphism

Greek population

ABSTRACT

Introduction: The Major Histocompatibility Complex Class I-related chain A gene (*MICA*) is a highly polymorphic functional gene located close to the *HLA-B* locus. Certain *MICA* alleles have been related to inflammatory and autoimmune diseases while *MICA* antibodies have been implicated in organ allograft rejection or graft-versus-host disease (GVHD).

Aim: The aim of this study was to identify the frequencies of *MICA* alleles and *MICA* - *HLA-B* haplotypes in the Greek population since, as far as we know, these data are still limited.

Methods: DNA was obtained from 277 unrelated healthy Greek individuals of Caucasian origin, volunteer donors of blood stem cells. *HLA-B** and *MICA** genotyping was performed by reverse PCR-SSOP.

Results: A total of 18 *MICA* alleles were defined in the present study. The five most frequent alleles in the Greek population were *MICA**008 (24.6%), *MICA**009 (22.36%), *MICA**018 (16.03%), *MICA**002 (8.02%) and *MICA**004 (7.17%) which altogether account for 77.8% of all alleles. The most common *MICA* - *HLA-B* haplotypes were *MICA**018 - *B**18 (12.5%) and *MICA**009 - *B**51 (11.5%).

Conclusions: The five most frequent *MICA* alleles in the Greek population were *008, *009, *018, *002, *004. In other Caucasian populations, two of these alleles (*008, and *004) were observed in similar frequencies. *MICA**002 was observed less frequently (8.02%) in the Greek population compared to other Caucasian groups (frequencies > 15%). Also, *MICA**009 and *MICA**018 had elevated frequencies (above 15%) whereas in other Caucasian populations they were found around 10% or less. These data may be important for the elucidation of the role that *MICA* polymorphisms play in organ and stem cell transplantation and to identify the relation of certain *MICA* with susceptibility to specific diseases.

© 2021 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The human Major Histocompatibility Complex (MHC) region encompasses 3.6 Mb and contains 224 gene loci of diverse function [1,2]. The MHC Class I-related chain A gene (*MICA*) is a highly polymorphic gene located on the short arm of chromosome 6 (6p21.33 region), close to the *HLA-B* locus [3,4]. The *MICA* gene is expressed under cell stress and its product is a 43 kDa glycoprotein [5]. The structure of the *MICA* protein consists of three extracellular domains (the $\alpha 1$ domain encoded by exon 2, $\alpha 2$ by exon 3, and

$\alpha 3$ by exon 4) a transmembrane (TM) region which is encoded by exon 5 and a carboxy-terminal cytoplasmic tail which is encoded by exon 6 [6]. *MICA* protein acts as ligand for the activation of Natural Killer group 2, member D receptor (NKG2D) which is expressed on NK cells, $\gamma\delta$ T cells, and CD8 + $\alpha\beta$ T cells [7,8]. The *MICA* locus is located 46 kb centromeric of *HLA-B* and this short distance results in strong linkage disequilibrium between these two loci. The different exons of *MICA* exhibit high polymorphism [9] and so far 224 alleles have been characterized as shown in IMGT/HLA database (accessed November 2020, <http://HLA.alleles.org/alleles/class0.html>) with new alleles being continuously defined [10]. The polymorphic molecules of *MICA* antigens are expressed on endothelial cells, keratinocytes, fibroblast, gastrointestinal epithelium, monocytes and dendritic cells [5,11,12]. The presence of some *MICA* alleles has been associated with inflamma-

* Corresponding author at: National and Kapodistrian University of Athens, Medical School, Department of Microbiology, Mikras Asias 75, 11527 Athens, Greece.

E-mail address: vbi@uniwa.gr (V. Birtsas).

<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.04.006>

0198-8859/© 2021 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: V. Birtsas, A. Batrinou, A. Dinou et al., Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA-B in Greek population, Human Immunology, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.04.006>

tory and autoimmune diseases and MICA antibodies have been implicated in organ allograft rejection or graft-versus-host disease (GVHD) [6,13,14]. The possible role of MICA-induced humoral response in graft rejection in solid organ transplantation has attracted interest recently through several studies investigating the pathogenic effect of MICA antibodies [9,14–19]. MICA molecules are associated with graft rejection through NK cell mediated cytotoxicity and through the production of immunosuppressive soluble MICA particles. Recent studies indicate also that serum soluble MICA represents a potential prognostic marker in various human cancers [20,21]. Knowledge of the population distribution of MICA alleles and distribution of MICA alleles and their linkage disequilibrium with class I human leucocyte antigen (HLA) will enhance our understanding of the potential functional significance of the MICA polymorphism. Data on the distribution of MICA genes in the Greek population are limited in two published studies: a study by Yabuki et al, 1999 [22] which examined thirty-eight Greek patients with Behcet's disease (BD) and 40 ethnically matched control subjects and has found that the phenotype frequency of the MICA-TM A6 allele was significantly increased in the Greek patients with BD and a study by Ota et al, 1997 [23] that studied the frequencies of five alleles from a single tandem repeat (STR) polymorphism within the transmembrane segment of MICA in 27 healthy Greek individuals. The aim of the present study was to investigate more thoroughly the allelic diversity of MICA and the haplotypes associated with HLA-B in the Greek population, for which very limited MICA data were available.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

DNA was obtained from 277 (2n = 554) unrelated healthy Greek individuals of Caucasian origin, both genders equally represented. These were volunteer from the Stem Cell donor Registry at the National Tissue Typing Center randomly chosen from all over Greece. Blood was collected in EDTA vacuum tubes and DNA extraction was performed with a DNA extraction kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. The concentration of extracted DNA was adjusted by the optical-density method.

The patients had given an informed consent for the study, in accordance to Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

The protocol was approved by the Health Research and Ethical Board of the Medical School of National and Kapodistrian University of Athens.

2.2. Genotyping

HLA-B, MICA genotyping was performed by PCR-SSOP using a commercially available kit (LABType[®] RSSO, One Lambda, Ca). This method performed a reverse sequence specific oligonucleotide polymerase chain reaction (PCR) with specific sequence oligo primers based on Luminex technology. Exons 2, 3, and 4 + 5 coding for 3 extracellular domains were amplified as well as exon 5 coding for the transmembrane region. For genotyping the MICA alleles, the HLA Fusion Analysis software (oneX) with the IMGT/HLA database (International Immunogenetics Information System/Human Leucocyte Antigen) were used. The kit used in this study contained 45 beads (including 3 positive controls and 1 negative control) allowing identification of 55 alleles.

The following ambiguous allelic combinations were detected, resulting either from polymorphisms in the covered regions not detected by the probes used, or polymorphisms outside the characterized Exons. More specifically, the MICA*004/009 ambiguity

(their difference lies in position 611 of exon 3 in which MICA*004 has G whereas MICA*009 has C), MICA*009/049 (their difference lies in position 1067 of exon 6 in which MICA*009 has C whereas MICA*049 has T), MICA*016/019 (their difference lies in position 730 of exon 4 in which MICA*016 has C whereas MICA*019 has G), MICA*002/020 (their difference lies in the number of repeats GCT in exon 5 in which MICA*002 has five repeats whereas MICA*020 has ten repeats). These ambiguous allelic MICA combinations were resolved by Pyrosequencing[™] (Biotage) which performed sequence-based typing (SBT). Pyrosequencing is a real time DNA sequencing method which uses an enzyme-cascade system, to analyze single nucleotide polymorphisms (SNPs), consisting of four enzymes and specific substrates, that emits light whenever a nucleotide is incorporated to form a base pair with the complementary base in a DNA template strand. The light is measured and quantified in order to have the final result expressed in a pyrogram. The procedure uses a solid phase protocol. It is an easy method of SNPs analysis, fast and accurate [24]. Fig. 1 shows the gene regions that were pyrosequenced.

2.3. Statistical analysis:

The frequencies of MICA and HLA-B alleles were estimated by direct counting, considering that samples with a single allele were homozygous and that allele was counted twice in the analysis. The comparison of the difference between our data and data obtained from other populations was performed via the Mann-Whitney U test. The null hypothesis of all comparisons was that the distribution of each examined polymorphism is same across all the countries. Two-tailed tests were used and p values less than 0.05 were considered statistically significant. The statistical analysis was performed using the SPSS Statistics v27.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) software. Consistency with Hardy-Weinberg equilibrium of genotype frequencies at each locus was tested and confirmed. Linkage disequilibrium was calculated by the statistic tools of hla-net (<https://hla-net.eu/tools/basic-statistics>) and Arlequin ver.3.11 for population genetics data analysis was used [25].

3. Results and discussion

A total of 18 different MICA alleles were detected on the present study, in overall 237 individuals (2n = 474) from a total of 277 individuals (2n = 554) since some samples could not yield an adequate amount of DNA for analysis. The most common alleles were MICA*008, *009 and *018, with a frequency-15%. These alleles accounted for 53.8% of the Greek population. MICA*008 had the highest allele frequency (24.26%) followed by MICA*009 (22.36%), and MICA*018 (16.03%). Other alleles with high frequencies (>5%) were MICA*002 (8.02%), MICA*004 (7.17%) and MICA*016 (5.91%) as seen in Table 1.

The five most frequent alleles in the Greek population (*008, *009, *018, *002, *004) account for 77.8% of all alleles (Table 2). MICA*008 was the most common allele in the present study and in other seven Caucasian and non-Caucasian populations previously published as shown in Table 2. In other Caucasian populations, alleles *002 and *004 were also among the most frequent, especially *002 which was observed in frequencies more than double compared to the Greek population (Table 2). In total, the cumulative frequency of the three alleles (*008, *002, *004) was 39.5% in the Greek population, whereas the allele frequencies of MICA*008, *002 and *004 in European Americans and USA Caucasians account for 64.7% and 74%, respectively [26,27]. Similar frequencies for these three alleles were found in Spain (56.3%), Slovakia (60.9%) and Slovenia (54.9%) [28–30]. In the Greek population, the first noteworthy difference (although not statistically significant) was

```

<< <C> >> Exon5
cDNA/Intr.          940      950      960      970      980
MICA*00201 CATGTTTCTG CTGTTGCTGC T...GCTGCTGCTGCTGCTGCT...ATT TTGTTTATTA TTATTTCTA C
MICA*020 -----GCT-----

<< <C> >> Exon3 Exon3] [Exon4
cDNA/Intr.          610 613 620      630      640
MICA*004 CTGAGGAGAA GAG TGCCCCC CATGGTGAAT GTCACCCGCA C
MICA*00901 -----C-----

<< <C> >> Exon6
cDNA/Intr.          1040      1050      1060      1070      1080      1090
MICA*00901 TGAGCCTGCA GGTCCCTGGAT CAACACCCAG TTGGGACGAG TGACCACAGG GATGCCACAC J
MICA*049 -----T-----

<< <C> >> Exon4
cDNA/Intr.          720      730      740      750      760
MICA*015 GACCTGGCGT CAGGATGGGC TATCTTTGAG CCACGACACC CAGCAGTGGG
MICA*019 -----G-----

```

Fig. 1. Gene regions that were pyrosequenced.

Table 1

MICA alleles defined in the Greek population (the total number of alleles defined was 2n = 474 which is 96% of the total alleles analyzed, 2n = 554).

MICA allele	Total Number of copies of the allele	Allele Frequency (number of copies of the allele/2n)
1 *001	2	0.004
2 *002	38	0.080
3 *004	34	0.072
4 *006	13	0.027
5 *008	115	0.243
6 *009	106	0.224
7 *010	5	0.011
8 *011	11	0.023
9 *012	12	0.025
10 *015	1	0.002
11 *016	28	0.059
12 *017	10	0.021
13 *018	76	0.160
14 *019	3	0.006
15 *027	7	0.015
16 *029	1	0.002
17 *047	5	0.011
18 *049	7	0.015

that elevated frequencies (above 15%) of MICA*009 (22.36%) and MICA*018 (16.03%) were observed whereas the MICA*009 and MICA*018 allele frequency is less than 10% in other Caucasian and in African American populations [26–28]. However, the MICA*009 allele was found above 10% in Slovenia and Slovakia

[29,30]. Remarkably, the frequency of MICA*009 is also high in the Japanese population (19.7% in the study of Obutsu et al, 2000 and 18.4% in the study of Komatsu-Wakui et al, 1999) [31,32], showing a close similarity with the Greek population. Another difference (not statistically significant) was that although MICA*002 is considered to be one of the most common MICA alleles in individuals of Caucasian origin (frequencies above 10%), it was observed less frequently (8.02%) in the Greek population (Table 2).

The close proximity of the MICA gene and the HLA-B locus results in a very strong linkage disequilibrium effect between the two as several studies in different populations have demonstrated [26,33–36]. Some known MICA and HLA-B associations were also confirmed in the Greek population (Table 3). Overall, 24 MICA ~ HLA-B haplotypes were identified with the most common being MICA*018 ~ B*18 (12.5%) and MICA*009 ~ B*51 (11.5%). The alleles in these two haplotypes were observed with the highest value of linkage disequilibrium, D (MICA*018 ~ B*18, D = 0.11, D' = 0.80, r² = 0.64 and MICA*009 ~ B*51, D = 0.08, D' = 0.50, r² = 0.21). The majority (71%) of associations of MICA with HLA-B alleles was found in the 5 dominant MICA alleles. More specifically, MICA*008 was linked to 6 HLA-B alleles (B*07, B*08, B*13, B*15, B*37, B*44), MICA*009 to 3 (B*51, B*52, B*35), MICA*018 to 1 (B*18), MICA*002 to 4 (B*35, B*38, B*39, B*58) and MICA*004 to 3 (B*41, B*44, B*49) HLA-B alleles. The remarkable frequency of these haplotypes permitted us to evidence that haplotype distribution showed a high degree of variation that was largely dependent on the distribution of HLA-B alleles reported in Greek population.

Table 2

The five most common MICA alleles in the Greek population and their frequencies in European, North American and Japanese groups (in cases where more than one population for a country has been published, populations with the highest number of alleles analyzed were selected from the database allelefrequencies.net, Gonzalez-Galarza et al, 2015) [39]. The allele frequency is shown with three decimals, as displayed in the database.

MICA allele	Greece (2n = 474)	Spain ¹ (2n = 330)	Slovakia ² (2n = 248)	Slovenia ³ (2n = 140)	USA Caucasians ⁴ (2n = 484)	European Americans ⁵ (2n = 2490)	African Americans ⁶ (2n = 1210)	Japanese ⁷ (2n = 304)
*008	0.243	0.285	0.371	0.391	0.550	0.431	0.266	0.145
*009	0.224	0.094	0.113	0.113	0.030	0.071	0.017	0.197
*018	0.160	0.051	0.069	0.067	0.035 ⁸	0.039	0.023	-
*002	0.080	0.142	0.165	0.189	0.130	0.141	0.254	0.099
*004	0.072	0.176	0.072	0.067	0.060	0.075	0.191	0.082

¹ [28], ²[29], ³[30], ⁴[40], ⁵[27] (in n = 103), ⁶[26], ⁷[31], ⁸p values were > 0.05 in all cases (not statistically significant).

Table 3
Distribution of most common MICA – HLA-B haplotype frequencies in the Greek population (2n = 474). Only haplotypes with frequency > 1% are listed.

MICA – HLA-B haplotypes	HF (haplotype frequency)	%
MICA*002 – HLA-B*35	0.0561	5.61
MICA*002 – HLA-B*38	0.0181	1.81
MICA*002 – HLA-B*39	0.0344	3.44
MICA*002 – HLA-B*58	0.0126	1.26
MICA*004 – HLA-B*49	0.0289	2.89
MICA*004 – HLA-B*44	0.0144	1.44
MICA*004 – HLA-B*41	0.0144	1.44
MICA*006 – HLA-B*51	0.0217	2.17
MICA*007 – HLA-B*27	0.0181	1.81
MICA*008 – HLA-B*44	0.0452	4.52
MICA*008 – HLA-B*08	0.0434	4.34
MICA*008 – HLA-B*07	0.0253	2.53
MICA*008 – HLA-B*15	0.0163	1.63
MICA*008 – HLA-B*37	0.0163	1.63
MICA*008 – HLA-B*13	0.0144	1.44
MICA*009 – HLA-B*51	0.1154	11.5
MICA*009 – HLA-B*35	0.0271	2.71
MICA*009 – HLA-B*52	0.0217	2.17
MICA*010 – HLA-B*15	0.0108	1.08
MICA*011 – HLA-B*14	0.0163	1.63
MICA*012 – HLA-B*55	0.0217	2.17
MICA*016 – HLA-B*35	0.0634	6.34
MICA*017 – HLA-B*57	0.0181	1.81
MICA*018 – HLA-B*18	0.1254	12.5

The most frequent MICA – HLA-B haplotypes in the Greek population were compared with the association frequencies found in other populations (Table 4). The Spanish population shared the most similarities with the exception of MICA*018 – B*18 which was observed with the highest percentage (12.5%) in the Greek population but only with 3.9% in the Spanish. The same haplotype was also identified with lower frequencies in the Thailand and Brazilian populations. MICA*009 – B*51 is present in most populations with particularly high frequency in the Chinese and South Korean populations. HLA-B*51 is known to be associated with Behçet's disease (BD) in many ethnic groups [22] and it has been found that both HLA-B*51 and MICA*009 were strongly associated with BD in a pure Caucasian BD patient group [37] and in Turkish patients [38] and the two alleles were in linkage disequilibrium.

4. Conclusion

Eighteen MICA alleles and 24 MICA – HLA-B haplotypes were defined in the Greek population, indicating a heterogeneous allelic variation. The most common alleles in the Greek population were MICA *008, *009, *018, *002, *004 which accounted for 77.8% of all alleles. The frequency distribution of the MICA alleles in the total population of healthy individuals was quite similar to that observed in a European/American population. However, the total

frequency of the three common alleles *008, *002, *004 was lower in the Greek population, compared to other Caucasians populations. This is mainly attributed to the low frequency of MICA*002 which was 8.02% in the Greek group whereas in other populations tested it was found > 15%. Moreover, MICA*009 was more frequent in the Greek population than other Caucasian groups and exhibited similar elevated levels as a Japanese group. These data confirm the high polymorphism of MICA gene and highlight the need to elucidate the role of MICA alleles in transplantation and their relation to various diseases susceptibility.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] S. Beck et al., Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex, *Nature* 401 (6756) (Oct. 1999) 921–923, <https://doi.org/10.1038/44853>.
- [2] R. Horton et al., Gene map of the extended human MHC, *Nat. Rev. Genet.* 5 (12) (2004) 889–899, <https://doi.org/10.1038/nrg1489>.
- [3] C. Leelayuwat, M.A. Degli-Esposti, L.J. Abraham, R.L. Dawkins, D.C. Townsend, A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I, *Immunogenetics* 40 (5) (1994) 339–351, <https://doi.org/10.1007/BF01246675>.
- [4] S. Bahram, M. Bressanah, D.E. Geraghty, T. Spies, A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (14) (1994) 6259–6263, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6259>.
- [5] V. Croh, A. Steinle, S. Bauer, T. Spies, Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells, *Science* (80–) 279 (5357) (1998) 1737–1740, <https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1737>.
- [6] A.K. Baranwal, N.K. Mehra, Major histocompatibility complex class I chain-related A (MICA) molecules: relevance in solid organ transplantation, *Front. Immunol.* 8 (2017), doi: 10.3389/fimmu.2017.00182.
- [7] C.J.T. Visser et al., Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: A study on linkage with classical HLA genes, *Immunogenetics* 49 (6) (1999) 561–566, <https://doi.org/10.1007/s002510050557>.
- [8] S. Bauer et al., Pillars article: activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA, *Science*, 1999, 285: 727–729, *J. Immunol.* 200 (7) (2018) 2231–2233.
- [9] M.K. Choy, M.E. Phipps, MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease, *Trends Mol. Med.* 16 (3) (2010) 97–106, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.002>.
- [10] J. Robinson, J.A. Halliwell, J.D. Hayhurst, P. Plicek, P. Parham, S.G.E. Marsh, The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases, *Nucl. Acids Res.* 43 (D1) (2015) D423–D431, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1161>.
- [11] N.W. Zwimer, K. Dole, P. Stastny, Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes, *Hum. Immunol.* 60 (4) (1999) 323–330, [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(98\)00128-1](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(98)00128-1).
- [12] M. Jimushi et al., Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection, *J. Immunol.* 170 (3) (2003) 1249–1256, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1249>.
- [13] M.-J. Apitthy et al., Impact of MICA and NKG2D polymorphisms in HLA-fully matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation, *Bone*

Table 4
The association frequencies of MICA – HLA-B haplotypes in the Greek population in comparison with various populations (Greek haplotypes with frequencies > 4 were selected).

Haplotype MICA – HLA-B	HF (haplotype frequency) %								
	Greece (n = 276)	Spain ¹ (n = 165)	Spain ¹ (Jewish origin) (n = 95)	USA Caucasian ² (n = 242)	Brazil ³ (n = 204)	Thailand ⁴ (n = 255)	China ⁵ (n = 104)	S. Korea ⁶ (n = 199)	Morocco ⁷ (n = 82)
MICA*018 – B*18	12.5	3.9	2.1		3.7	5.9			
MICA*009 – B*51	11.5	5.2	1.0		8.1	2.0	9.1	7.5	3.8
MICA*016 – B*35	6.34	2.4	8.9		1.7				
MICA*002 – B*35	5.61	6.7	3.7			3.9	3.4	4.5	3.4
MICA*008 – B*44	4.52	4.5		10.6	4.9				9.1
MICA*008 – B*08	4.34	4.2	3.7	20.6	5.9				8.3

¹ [34], ² [40], ³ [41], ⁴ [42], ⁵ [43], ⁶ [44], ⁷ [45]; p values were > 0.05 in all cases (not statistically significant).

- Marrow Transplant. 53 (7) (2018) 918–922, <https://doi.org/10.1038/s41409-017-0083-3>.
- [14] A. Isernhagen et al., The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation, *EMBO Mol. Med.* 7 (11) (2015) 1480–1502, <https://doi.org/10.15252/emmm.201505246>.
- [15] G. Solgi, D. Furst, J. Mytilineos, G. Fourmand, A.A. Amirzargar, Clinical relevance of pre and post-transplant immune markers in kidney allograft recipients: anti-HLA and MICA antibodies and serum levels of sCD30 and sMICA, *Transpl. Immunol.* 26 (2–3) (2012) 81–87, <https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.12.002>.
- [16] A.C. Gautier et al., MICA compatibility and immunization in third kidney transplantations, *Transplant. Proc.* 41 (2) (2009) 663–665, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.12.007>.
- [17] R.J. Duquesnoy et al., HLA-Matchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A, B amino acid triplet level on kidney transplant survival, *Transplantation* 75 (6) (2003) 884–889, <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000055101.20821.AC>.
- [18] L. Luo et al., The effect of MICA antigens on kidney transplantation outcomes, *Immunol. Lett.* 156 (1–2) (2013) 54–58, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.08.009>.
- [19] A. Piazza et al., Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques¹, *Transplantation* 71 (8) (2001) 1106–1112, <https://doi.org/10.1097/00007890-200104270-00017>.
- [20] A. Zingoni et al., MICA-129 dimorphism and soluble MICA are associated with the progression of multiple myeloma, *Front. Immunol.* 9 (2018) 926, doi: 10.3389/fimmu.2018.00926.
- [21] Y. Zhao et al., Prognostic value of MICA/B in cancers: a systematic review and meta-analysis, *Oncotarget* 8 (56) (2017) 96384–96395, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21466>.
- [22] K. Yabuki et al., Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behçet's disease in Greece, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1999).
- [23] M. Ota et al., Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): Allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uyghur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian, *Tissue Antigens* 49 (5) (1997) 448–454, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1997.tb02778.x>.
- [24] J.L. Royo, J.J. Galán, Pyrosequencing for SNP genotyping, *Methods Mol. Biol.* (2009), https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_7.
- [25] L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider, Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinforma.* (2005), <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>.
- [26] X. Gao, R.M. Single, P. Karacki, D. Marti, S.J. O'Brien, M. Carrington, Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two North American populations, *Hum. Immunol.* 67 (3) (2006) 152–158, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.02.009>.
- [27] Y. Zhang et al., MICA polymorphism in South American Indians, *Immunogenetics* 53 (10–11) (Feb. 2002) 900–906, <https://doi.org/10.1007/s00251-001-0426-4>.
- [28] D. Lucas et al., Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain, *Hum. Immunol.* 69 (10) (2008) 655–660, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.07.011>.
- [29] V. Đurmanová et al., Characterization of MICA gene polymorphism of HLA complex in the Slovak population, *Ann. Hum. Biol.* 38 (5) (2011) 570–576, <https://doi.org/10.3109/03014468.2011.572563>.
- [30] N. Bratanić, D. Smigoc Schweiger, A. Mendez, N. Bratina, T. Battelino, B. Vidan-Jeras, An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes, *Tissue Antigens* 76(3) (2010) 208–215, doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01501.x.
- [31] N. Obuchi et al., Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4, *Tissue Antigens* (2001), <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2001.057006520.x>.
- [32] M. Komatsu-Wakai et al., MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype, *Immunogenetics* 49 (7–8) (1999) 620–628, <https://doi.org/10.1007/s002510050658>.
- [33] P. Luangtrakool, S. Vejbaesya, K. Luangtrakool, C. Sermdaangprateep, MICA polymorphism, linkage disequilibrium with HLA-B and MICA antibodies in Thai kidney transplant recipients, *J. Med. Assoc. Thai.* 101 (12) (2018) 1616–1620.
- [34] A. Cambra et al., MICA-HLA-B haplotype diversity and linkage disequilibrium in a population of Jewish descent from Majorca (the Balearic Islands), *Hum. Immunol.* 70 (7) (2009) 513–517, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.04.005>.
- [35] W. Tian, D.A. Boggs, W.Z. Ding, D.F. Chen, P.A. Fraser, MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 29 African-American families, *Immunogenetics* 53 (9) (2001) 724–728, <https://doi.org/10.1007/s00251-001-0392-x>.
- [36] N. Tsuchiya et al., MICA allele typing of HLA-B*27 positive Japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals: differential linkage disequilibrium with HLA-B*27 subtypes, *Arthritis Rheum.* 41 (1) (1998) 68–73, [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199801\)41:1<68::AID-ART39>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199801)41:1<68::AID-ART39>3.0.CO;2-C).
- [37] E.H. Hughes et al., Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behçet's disease in Caucasian patients, *Tissue Antigens* 66 (3) (2005) 195–199, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2005.00465.x>.
- [38] N. Mizuki, A. Meguro, I. Tohno, A. Gül, S. Ohno, N. Mizuki, Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A and HLA-B alleles with Behçet's disease in Turkey, *Jpn. J. Ophthalmol.* 51 (6) (2007) 431–436, <https://doi.org/10.1007/s10384-007-0473-y>.
- [39] F.F. González-Galarza et al., Allele frequency net 2015 update: New features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations, *Nucl. Acids Res.* (2015), <https://doi.org/10.1093/nar/gku1366>.
- [40] E.W. Petersdorf, K.B. Shuler, G.M. Longton, T. Spies, J.A. Hansen, Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene, *Immunogenetics* (1999), <https://doi.org/10.1007/s002510050655>.
- [41] F. Ribas, L.A. Oliveira, M.L. Petzl-Erler, M.G. Bicalho, Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in Euro-Brazilians, *Tissue Antigens* 72 (6) (2008) 532–538, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01142.x>.
- [42] A.V. Romphruk et al., Diversity of MICA (PERB1.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thai, *Tissue Antigens* (2001), <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2001.580203.x>.
- [43] W. Tian, J.H. Cai, F. Wang, L.X. Li, MICA polymorphism in a northern Chinese Han population: the identification of a new MICA allele, MICA*059, *Hum. Immunol.* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.01.025>.
- [44] C.W. Pyo, S.S. Hur, Y.K. Kim, H.B. Choi, T.Y. Kim, T.G. Kim, Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population, *Hum. Immunol.* (2003), <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2003.02.00826-1>.
- [45] D. Piantarelli, T. Del Beato, K. Oumhani, R. El Aouad, D. Adono, MICA polymorphism in a population from North Morocco, Metafisa Berbers, using sequence-based typing, *Hum. Immunol.* (2005), <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.06.008>.

II Oral Abstract Transplantation

Graft specific alloreactivity and clinical status of renal transplant recipients, A. Iniotaki – Theodoraki, P. Douramani, N. Giapraka, V. Birtsas, V. Filiopoulos, A. Kostakis, C. Stavropoulos – Giokas, J.N. Boletis, Transplantation, 2004, Vol 78, Number 2, p. 166 [153]

September 10, 2004

Oral Abstracts

O421

INJURY AND SUBSEQUENT LOSS OF PERITUBULAR CAPILLARIES IN THE DEVELOPMENT OF CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY

Y. Ishii¹, T. Sawada², K. Kubata², S. Fuchinoue¹, S. Teraoka¹, A. Shimizu³

¹Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan. ²Dokkyo University School of Medicine, Tochigi, Japan. ³Nippon Medical School, Tokyo, Japan

Aims: Chronic allograft nephropathy (CAN) remains the most important cause of late renal graft loss. While accumulating evidence has elucidated both immunologic and non-immunologic factors which contribute to CAN, the mechanism by which graft dysfunction occurs and the processes involved in the development of CAN are not well understood. This study examined the role of microvascular injury in the development of CAN.

Methods: We studied renal biopsies obtained from grafts with mild (n=30), moderate (n=27), and severe (n=22) CAN according to the Banff classification system. Microvascular injury was examined by light and electron microscopy, and immunohistochemistry for CD34. These findings were correlated with interstitial fibrosis (type I collagen), glomerular sclerosis (type IV collagen), and graft dysfunction (serum creatinine levels). Apoptotic dead cells were detected by the DNA nick end-labeling (TUNEL) method, and humoral and cellular immunity involved in CAN were studied by C4d, CD3 and GMP-17 staining.

Results: CAN was characterized by progressive interstitial fibrosis, and the severity of CAN (defined by the Banff classification system) was correlated with graft dysfunction (r=0.81, p<0.001). The CAN cases in the present study included chronic rejection (CR) (n=14, 17.8%) and C4d-positive chronic humoral rejection (CHR) (n=6, 7.6%). The development of CAN was characterized by injury to, and loss of identifiable peritubular capillaries (PTCs), accompanied with the development of renal scarring. These pathologic findings were found to be similar in all samples, irrespective of whether CR or CHR was observed. Morphologically, injured PTCs showed angioregressive changes which were characterized by decreased size, narrowing of the capillary lumen, the presence of TUNEL(+) dead cells, activated endothelial cells, detachment of endothelial cells from the basement membrane (BM), protrusion of endothelial cells into lumen, lamination of BM, and loss of PTCs. Importantly, a decrease in the number of PTCs significantly correlated with the development of interstitial fibrosis (r=-0.75, p<0.001) and impairment of graft function (r=-0.69, p<0.001). In the glomeruli, injured capillaries also showed angioregressive changes, similar to changes seen in injured PTCs. Additionally a decrease in the number of glomerular capillaries was significantly correlated with the development of glomerular sclerosis (r=-0.66, p<0.001), but not with graft dysfunction (r=0.36, p=0.16).

Conclusions: Irrespective of whether CR, CHR or other factors lead to the development of CAN, the processes involved in its development appear similar, and are characterized by progressive injury and loss of renal microvasculature, with the development of renal scarring. Particularly, irreversible injury and loss of PTCs play a crucial role in the development of not only CAN, but also in the chronic deterioration of graft function.

O422*

GRAFT SPECIFIC ALLOREACTIVITY AND CLINICAL STATUS OF RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

A. Iniotaki-Theodoraki¹, P. Douramani¹, N. Giapraka², V. Birtsas¹, V. Filiopoulos², A. Kostakis², C. Stavropoulos-Giokas¹, J.N. Boletis²

¹National Tissue Typing Center, General Hospital of Athens, Athens, Greece, ²Transplant Center, Laikon Hospital, Athens, Greece

Aim: The purpose of the present study was to investigate the cellular and humoral alloresponses to foreign HLA class II graft antigens in 40 RTx recipients. The state of alloreactivity was correlated with the clinical status of the patients.

Methods: In all cases there was one HLA -DR mismatch between donor and recipient. Sequential blood samples were collected post Tx for at least 36 months and analyzed for (a) the frequency of activated CD4+ T cells that recognize synthetic donor allopeptides and (b) the presence of HLA graft specific antibodies. The immunosuppressive treatment consisted of Mycophenolate Mofetil (MMF) / Cyclosporine A (CsA) and methylprednisolone in 26 cases, Tacrolimus instead of CsA in 10 cases and Rapamycin instead of MMF in 4 cases. The diagnosis of acute (AR) and chronic rejection (CR) was based on graft biopsy. As progressive chronic allograft dysfunction (CAD) was characterized any case with serum creatinine >30% above the basic levels. Fisher's exact p test was used for statistical analysis.

Results: Alloreactivity to foreign HLA class II molecules exhibited 21/40 (52.5%) recipients with 76.2% (16/21) of the cases to be positive within the first year post Tx. AR, CR or CAD diagnosed in 18 cases with 14 patients (77.8%) exhibiting graft specific reactivity and 4 patients (22.2%) without any evidence of alloresponse (p=.003). The clinical problems were diagnosed in (a) 9/10 (90%) patients with graft specific antibodies with (in 4/9 cases) or without (in the rest 5/9 cases) the presence of peptide specific T cells and (b) in 5/11 (45.5%) cases with peptide specific T cells without antibodies (p=.04). AR was correlated with peptide specific T cells and antibodies (p=.003) while CR was correlated only with the presence of antibodies (p=.02).

Conclusion: Within the first three years post Tx and despite the immunosuppression, more than half of the patients exhibited humoral and/or cellular graft specific alloresponses. The alloreactivity was correlated with clinical problems especially in the presence of alloantibodies. These results may be helpful for better understanding of the immune biologic processes post RTx and the development of specific treatment strategies.

O423

EXPANDING THE DONOR POOL: SUCCESSFUL KIDNEY TRANSPLANT IN CROSS-MATCH POSITIVE PATIENTS AFTER PLASMAPHERESIS TREATMENT

J. Thielke¹, H.N. Sankary², P.J. DeChristopher³, K. Kraft¹, D. Bogetti², J. Oberholzer², G. Testa², E. Benedetti²

¹Department of Pharmacy Practice, ²Division of Transplant Surgery, ³Department of Pathology, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL.

Aim: A positive cross-match between donor and recipient has been traditionally considered an absolute contraindication to kidney transplantation. In an effort to further expand our ability to utilize living donors for kidney transplantation, we have implemented a strategy to prevent immune mediated graft loss when the recipient has a positive cross-match against a potential living donor.

Methods: Between 7/01 and 6/03, 15 highly sensitized candidates to kidney transplantation, with cross-match positive potential living donors, were enrolled in this study. The average age was 34 years; 10 were African-American, 1 Caucasian and 4 Hispanic. One patient had a prior transplant. All patients received plasmapheresis QOD and IVIG 100mg/kg starting 1 week before the scheduled transplant. In 5 patients a single dose of Rituximab was given at the beginning of the treatment. If the cross-match by flow-cytometry converted to negative after the initial 3 treatments, the transplant was performed as scheduled; otherwise the protocol was aborted. Post-operatively, the recipients continued to receive QOD plasmapheresis with IVIG for the initial week. Immunosuppression therapy consisted of induction with Thymoglobulin x 5 days along with combination of tacrolimus, mycophenolate and steroids. Average follow-up was 1 year.

Results: Four patients failed to convert with pre transplant immunomodulation, and were not transplanted. The other 11 underwent uncomplicated kidney transplant. One-year patient and graft survival was 100%. All the recipients continue to do well to date. There were 3 early episodes of antibody mediated rejection successfully treated with plasmapheresis, and 2 episodes of cellular rejection treated with bolus steroids. The average serum creatinine at 6 months was 1.4 mg/dl. There were two episodes of systemic cytomeg-

* Indicates one of the top 200 scoring abstracts. The Congress Organizing Committee encourages you to attend these presentations.

III Abstract, 35th ASHI Meeting - Human Immunology

“157-P: MICA gene allelic diversity and MICA/HLA-B haplotypic variation in Greek population,” M. Spyropoulou-Vlachou, M. Dinou, V. Birtsas, E. Kondou, V. Vrani, and A. Iniotaki, Hum. Immunol., 2009, [154]

157-P

MICA GENE ALLELIC DIVERSITY AND MICA/HLA-B HAPLOTYPIC VARIATION IN GREEK POPULATION. Maria Spyropoulou-Vlachou, Melina Dinou, Vasilios Mpirtsas, Elissavet Kondou, Vasiliki Vrani, Alike Iniotaki. Immunology Dp.- National Tissue Typing Center, General Hospital of Athens “G. Gennimatas”, Athens, Greece.

Aim: MICA is a MHC class I-related gene located 46 kb centromeric of the HLA-B. MICA molecules are highly polymorphic and interact with $\gamma\delta$ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells bearing the NKG2D receptor. MICA allelic variation is thought to be associated with disease susceptibility and immune response to transplants. The aim of this study was to establish the allelic diversity of MICA gene and linkage disequilibrium with HLA-B in Greek population.

Methods: DNA was obtained from 246 unrelated healthy Greek individuals and MICA genotyping was performed using PCR-SSOP for exons 2, 3 and 4 of the MICA gene by using luminex technology (OneLambda, CA). Ambiguous allelic combinations were resolved by pyrosequencing.

Results: A wide allelic distribution including 19 different MICA alleles was detected. The most common MICA alleles were MICA*008 (21.1%), *009 (16.9%), *002 (15.9%), *018 (12.4%), *004 (6.4%) and *016 (5%). Greek population shares the three most frequent MICA alleles with other Caucasian populations (*008, *002, *004) but with interesting differences. Noteworthy were the elevated frequencies of MICA*009 and *018. Also, MICA*004, one of the most common MICA alleles in Caucasians, was observed less frequently in Greeks. In the haplotype analysis some known MICA and HLA-B associations were confirmed. However the most common MICA/HLA-B haplotypes were MICA*018-B*18 and MICA*009-B*51 ($h_f = 0.125$ and 0.115 rv). These haplotypes are apparently population specific, as they involve HLA-B alleles with distinctive frequency in the Greek population.

Conclusions: This study is the first report on MICA allelic distribution in Greek population and may have implications for disease associations and transplantation.

158-P

THE HLA PROFILE OF US INDIVIDUALS WITH SOUTHERN EUROPEAN ANCESTRY. Bin Tu,¹ Steven J. Mack,² Ruyan Yang,¹ Leera Dsouza,¹ Carly Masaberg,¹ Jennifer Ng,¹ Carolyn K. Hurley.¹ ¹CW Bill Young Program, Georgetown University, Washington, DC, USA; ²Children’s Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA, USA.

Aim: Sequence-based typing was used to identify the HLA-A,-B,-C,-DRB1 alleles found in 552 individuals from the United States indicating Southern European (Italian, Spanish) heritage.

Methods: All alternative genotypes were excluded except for alleles which shared the nucleotide sequence of their antigen-recognition site-encoding domains.

Results: Alleles identified included 46 HLA-A, 89 HLA-B, 32 HLA-C, and 50 DRB1. All alleles were found in a list of common and well-documented alleles except A*0244, B*3577, B*4430, Cw*120201g, Cw*120303, Cw*1212; Cw*1406, and DRB1*040504. Four of these alleles had originally been described in Hispanic individuals, one in a Caucasoind (Cw*1212), one in an individual from Asia (Cw*120201g), and two in individuals of unknown ancestry (B*3577, Cw*120303). The sequences of one HLA-A (A*250101), four HLA-B (B*3577, 390202, 4005, 4430) and seven HLA-C (Cw*120201, 120303, 1205, 1212, 1406, 150501g, 1509) alleles observed in this study have been reported in the ImmunoGeneTics (IMGT)/HLA database but only observed in a single reported individual (i.e., not confirmed).

Conclusions: No novel alleles were identified in this study. Further analysis of the population is underway.

IV Abstract for Poster Presentation, Tissue Antigens

“Frequency of HLA-DP and MICA antibodies in hyperimmunized renal transplant candidates,” E. N. K. Angeliki G Vittoraki, Maria D Apostolaki, S. I. I. Vasilios P Birtsas, Petroula G Stravoskoufi, and A. G. I. Maria S Spyropoulou-Vlachou, *Tissue Antigens*, vol. 73 [155]

Abstracts for Poster Presentation

P3

Clinical relevance of donor specific antibodies and their normalized median fluorescence intensity values in patients with antibody mediated rejection

Joseph H Kelly¹, Derek O Neill², Mary Keogan²

¹The National Histocompatibility and Immunogenetics Service for Solid Organ Transplantation, Dublin, Ireland, ²Beaumont Hospital, Dublin, Ireland

The introduction of Luminex Single Antigen has allowed higher resolution of low levels of circulating anti-HLA antibodies. There is no consensus about the level of antibodies that are clinically significant. We evaluated a cohort of 24 patients who developed acute antibody mediated rejection (AMR) following renal transplantation, where 8-10 years follow-up was available, using Luminex Single Antigen (SA; One Lambda) according to the manufacturer's instructions. Of the 24 patients, 2 had primary non-function, a further 3 required nephrectomy at the time of diagnosis, and 3 failed to regain function. Of the 16 patients who responded to salvage treatment with plasma exchange, 6 grafts failed with a median graft survival of 15.5 months (range 5-79). Surprisingly, 12 of the 24 patients who developed AMR were negative for donor specific antibodies (DSA), using the manufacturer's cut-off of MFI > 500. Of note 3 patients had DSA only directed to HLA-DP. Of the 8 patients who lost their graft within 2 months, 6 (75%) were DSA positive, among the 6 with late graft loss 3 (50%) were DSA positive, while only 2 (20%) with a functioning graft had DSA. While the presence of DSA on the day of transplant was more common in those with a poor outcome, the level of antibodies by MFI did not correlate with outcome. Of interest, DSA values as low as 977 were associated with AMR requiring nephrectomy. A retrospective assessment of DSA prior to transplantation is ongoing in those patients who were negative on the day of transplant. These retrospective data show a poor correlation between day of transplant DSA as determined by Luminex SA and the occurrence of AMR, and clinical outcome following AMR. This data together with our ongoing study of pre-transplant DSA in patients with no detectable DSA on the day of transplant will provide useful data for interpreting the results of antibody screening performed with this method.

P4

Evaluation of global cell mediated immunity in RTx recipients by an adenosine triphosphate release assay

Angeliki G Vittoraki¹, Maria N Darema², Maria L Kafetzi¹, Irma-Sofia A Doikou¹, Alkiviadis J Kostakis², John N Boletis², Alikei G Iniotaki¹

¹General Hospital G. Gennimatas, Athens, Greece, ²Lakon Hospital, Athens, Greece

Evaluation of the status of CD4+ T cell immune function in renal transplant (RTx) recipients may be a useful parameter in order to optimize the immunosuppression. In this study,

intracellular adenosine triphosphatase (iATP) levels were evaluated in 392 RTx recipients and 104 volunteer blood donors (control population-NC). Blood samples (n=451) were collected at various post-Tx intervals and iATP levels (ng/ml) were measured in CD4+T cells following stimulation with PHA in whole blood culture using Cylex Immuknow Assay. The results were compared with various parameters of renal transplantation. The patients had significantly lower levels of ATP with cut-off value 323 ng/ml (ROC curve) compared to NC (p=.005, student's t test). The iATP levels were negatively correlated with the number of HLA mms (p=.028) and were significantly lower in hyperimmunized patients who received more intense IS compared to non-hyperimmunized patients (p=.03, Mann-Whitney test). RTx recipients from LRD exhibited higher immune response levels compared to the recipients of LUD (p=.03) and those of CAD (p=.007, Kruskal-Wallis test). Patients more than 3 years post-Tx had higher T cell immune response and higher Cr levels compared to those tested less than 3 years post-Tx (p=.03 and p=.02 respectively). Corticosteroid withdraw 7.7±4.2y post-Tx in clinically stable RTx recipients was followed by significantly lower level of ATP (p<.001) and no effect on graft function. The above results indicate that iATP levels in RTx recipients reflect the level of immunosuppression and contribute to evaluation of the immunological status post renal transplantation.

P5

Frequency of HLA-DP and MICA antibodies in hyperimmunized renal transplant candidates

Angeliki G Vittoraki, Maria D Apostolaki, Elisavet N Kontou, Vasilios P Mpirtsas, Petroula G Stravoskoufi, Sofia I Ioannou, Maria S Spyropoulou-Vlachou, Alikei G Iniotaki

General Hospital G. Gennimatas, Athens, Greece

HLA and MICA antibody incompatible transplantation is associated with an increased risk of acute antibody mediated rejection. The aim of this study was to investigate the frequency of HLA-DP and MICA antibodies in hyperimmunized renal transplant candidates with HLA class I and/or II % PRA >70%. Two hundred and fifty-nine sera from 59 renal transplant candidates were screened for HLA-A, B, CW, DR, DQ, DP and MICA antibodies using Luminex methodology and LABScreen HLA class I and II for % PRA and Single Antigen HLA class I and II and MICA antibody detection test (One Lambda, Canoga Park, CA). The antibody specificity was determined with Baseline Normalized ratio more than 1000. All patients were HLA phenotyped in allele level for HLA and MICA. The antibody screening revealed the following: 23/59 (38.9%) patients were positive for HLA-DP and 10/59 (16.9%) patients were positive for MICA antibodies. Sensitization events including previous transplantation(s), transfusions and pregnancies, were not different between HLA-DP and MICA antibody positive and negative patients. In all HLA-DP positive cases, HLA-DR and/or DQ antibodies were also present. Antibodies recognised public-shared epitopes were present in 21/23 (91.3%) and 9/10

(90%) patients with HLA-DP and MICA antibodies respectively. 14/23 (60.86%) HLA-DP antibody positive cases were also positive for HLA-DR1 and/or DR11. As strong positive linkage disequilibrium between MICA and HLA-B*08:01 is observed, most of the patients who had detectable MICA antibodies were also sensitized against specific HLA-B alleles. From these data it appears that reactivity against HLA-DP and MICA is present in some hyperimmunized patients and should be taken under consideration whenever a decision for transplantation is needed for these patients.

P6

Post transplant HLA and MICA antibodies and chronic rejection in heart /lung transplantation: one center data

Anne Cesbron Gautier¹, Sabine Pattier², Anne Devys¹, Nadine Paint¹, Sylvie Cury¹, Alain Haloun², Michelle Treilhaud², Jean Denis Bignon¹

¹EFS Pays De La Loire, Nantes, France, ²CHU, Nantes, France

During the 15th IHIWS, we participated in the component studying the effects of post-transplant HLA and MICA antibodies (Ab) on long term Heart/Lung graft survival. This component was chaired by Prof. Paul Terasaki and Dr Mikki Ozawa. We report here on data of our own center. We have included 101 patients (45 Heart, 21 Heart+Lung, 35 Lung) grafted between 1987 and 2007 with a follow up of at least 6 months with a good organ function. Clinical information was obtained and blood collection for HLA and MICA immunization study was collected during summer 2007. One year later, clinical outcome was requested. HLA and MICA Ab screening was performed with Luminex technology (LABScreen Mixed One Lambda) and the specificity analysis (DSA versus NDSA) was performed with LABScreen Single Antigen Assay when HLA Ab screening was positive. HLA Ab screening was positive in 17 patients (16.8% of the cohort, 15 Heart, 1 Heart + Lung, 1 Lung). HLA DSA were observed in 6/9 class II Ab and 2/2 class I + II Ab whereas NDSA were observed in 4/6 class I Ab. Seven out of these 17 patients (41%) displayed complications (6 Heart + 1 Lung): 4 humoral rejections (3 DSA class II and 1 DSA class I and class II), 1 chronic rejection (DSA class II) and 2 other reasons (DSA class II). When DSA class II and MICA Ab were both present, clinical complications were observed (3/3). HLA Ab screening was negative in 84 patients (83.2% of the cohort) whereas MICA Ab screening was positive in 5 cases. Eight out of these 84 patients (9.5%) displayed complications (5 Lung, 1 Heart, 2 Heart + Lung): 1 chronic rejection (Heart) and 7 other reasons. In this group of patients, MICA Ab were not associated with complications. In conclusion, in our local population of patients, immunological complications occurred preferentially in Heart transplantation compared to Lung and Heart + Lung and are associated with HLA DSA class II. Moreover, HLA NDSA were preferentially anti class I and not associated with complications. The incidence of MICA immunization is low (9%) but when MICA Ab are associated with HLA DSA class II, clinical complications were observed.

P7

Italian inter-regional protocol for high sensitized kidney patients (HSKP): 4 years experience

Raffaele Conca¹, Loredana Praticò-Barbato¹, Paola Zanelli², Andrea Buscaroli³, Biagio Favoino⁴, Vittorio Fossombroni⁵, Stefano Roggero¹, Antonio Amoroso⁶

¹San Giovanni Hospital, Torino, Italy, ²University Clinic, Parma, Italy, ³S.Orsola University Hospital, Bologna, Italy, ⁴Policlinico, Bari, Italy, ⁵Careggi Hospital, Firenze, Italy, ⁶San Giovanni Hospital, University of Torino, Torino, Italy

Four Italian regions drew up a common list of HSKP (PRA >80%). The software allows to shortlist and gives HSKP more opportunities to be grafted. In fact, they are relegated for many years in the transplant (TX) list with lower chances of being transplanted. In 2004, HSKP awaited TX for 6 ± 4.4 years, while not immunized for 2.3 ± 2.3 years. Criteria by which HSKP are shortlisted:

- at least two sera with CDC PRA >80%;
- historical sera examined by CDC, Elisa or Luminex to detect IgG anti-HLA antibodies (Ab);
- sera analyzed with DTT and tested with auto-cross match (XM) to exclude the presence of auto-Ab.

Criteria by which the patients belonging the list undergo kidney TX:

- iso-AB0 group;
- 2/4 HLA A, B and 2/2 DR donor/recipient match (full match when the previous donor HLA typing is unknown);
- absence of a previous TX mismatch and donor specific HLA Ab;
- T & B lymphocyte negative XM done with one current and two historical sera;
- expected cold ischemia time not exceeding 24h, i.e., the kidney not needing biopsy.

Donor and recipient HLA Class I typing is performed by serological and/or low-resolution genomic method, according to the Centre procedures. Donor and recipient HLA Class II typing are performed by low-resolution genomic method. XM, according to the Centre procedures, by CDC or flow techniques. From Oct 2004 to Dec 2008 the eligible donors for this program were 475/1328 (36%). HSKP included in the list were 147/3349 (4%); 10 (1.5%) have been transplanted. The grafts at today are all well functioning. One patient experienced acute vascular rejection soon after TX, treated with steroids and 4 plasma-pheresis. The list shared by the regions was decisive and found suitable donors for some HSKPs that otherwise had little chance of transplantation. In fact 8/10 (80%) HSKP received a kidney coming from an extra-regional donor. Considering the very good results, in order to increase the TX chances for HSKP we plan to:

- increase the number of suitable donors, i.e. including donors who need biopsy
- increase the number of patients, i.e. including patients with Luminex or Elisa PRA >80%.

