



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

---

**Primo Progetto di ricerca "Sangue" (1998)  
Progress report**

A cura del Responsabile scientifico  
M. Orlando

---

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**99/9**

## TIPIZZAZIONE PER SEQUENZA DEGLI ANTIGENI HLA CLASSE I E II IN CAMPIONI PROVENIENTI DALLA BANCA NAZIONALE DI CELLULE STAMINALI DI CORDONE OMBELICALE COSTITUENDA IN ITALIA

Domenico Adorno <sup>1</sup>, Giovanni Battista Ferrara <sup>2</sup>, Angelica Canossi <sup>1</sup>, Marilena Di Rocco <sup>1</sup>, Cinzia Pera <sup>2</sup>, Sarah Pozzi <sup>2</sup>, Laura Delfino <sup>2</sup>, Antonina Piazza <sup>1</sup>, Daniela Maccarone <sup>1</sup>, Isabella Monaco <sup>1</sup>, Giuseppina Ozzella <sup>1</sup>, Gabriella Liberatore <sup>1</sup>, Anna Morabito <sup>2</sup>, Tiziana Del Beato <sup>1</sup>, Franco Papola <sup>1</sup>, Carla Cervelli <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Centro nazionale delle ricerche (CNR) tipizzazione tissutale e problemi della dialisi, L'Aquila; <sup>2</sup> Centro Biotecnologie avanzate/IST Laboratorio di Immunogenetica, Genova

### Introduzione

Il trapianto di midollo da non consanguineo è ormai usato con successo nel trattamento di numerose malattie ematologiche; tale strategia terapeutica ha portato perciò alla formazione di un registro internazionale di donatori volontari di midollo osseo che ha permesso un notevole incremento dei trapianti effettuati.

In questi ultimi anni si è sviluppato anche in Italia un programma di trapianto di cellule staminali da sangue di cordone ombelicale (CSCO). Il sangue placentare-cordonale offre, infatti, alcuni vantaggi rispetto al midollo osseo, soprattutto nel trapianto eterologo, i più importanti dei quali sono rappresentati dalla quantità pressoché illimitata di donatori, dalla pronta disponibilità per il trapianto e dall'assenza di contaminazioni virali endemiche nelle popolazioni adulte, come il citomegalovirus (CMV) o il virus di Epstein-Barr (EBV). L'esperienza accumulata nei trapianti finora effettuati ha indicato una capacità di attecchimento comparabile a quella del midollo e contemporaneamente una ridotta reazione immunitaria contro le cellule del ricevente e questo permette di utilizzare anche donatori con mismatches per il sistema HLA.

Le cellule del sangue cordonale hanno una riduzione marcata dell'espressione degli antigeni HLA di classe I e II e le tecniche di tipizzazione sierologica non sono sufficienti per la loro definizione, infatti non sono in grado di caratterizzare esattamente il polimorfismo allelico HLA-DQ, DRB1, B3, B4, B5 e di evidenziare gli antigeni DP come pure molti degli antigeni HLA di classe I. Inoltre, l'esecuzione di test funzionali per accertare la compatibilità donatore-ricevente (coltura linfocitaria mista e precursori dei linfociti T citotossici) sulle CSCO non sono di facile esecuzione e quindi si rende indispensabile l'uso di metodiche alternative, quali la tipizzazione per sequenza, atte a determinare la completa tipizzazione di tutti gli antigeni HLA noti.

Vista l'importanza primaria delle differenze sottotipiche HLA di classe I e II nell'insorgenza di GVHD e di rigetto nel trapianto di midollo da non correlato, è auspicabile una accurata determinazione degli alleli HLA di classe I e II nella

valutazione della compatibilità donatore-ricevente, nell'ambito di un piano di tipizzazione per sequenza di tutti i campioni DNA di CSCO.

L'obiettivo finale del nostro lavoro è stato quello di valutare la compatibilità HLA di classe I e II in coppie donatore CSCO e ricevente di trapianto di midollo sulla base di uno screening di tipizzazione HLA effettuato mediante metodiche di sequenziamento automatico per accertare a posteriori le combinazioni alleliche sottotipiche permissive nei confronti del rigetto o della GvHD.

### Materiali e metodi

I cordoni ombelicali da noi esaminati provengono da due Centri trapianto, uno già inserito nel gruppo GRACE è quello diretto dal prof. Amadori dell'Ematologia dell'Università di Tor Vergata di Roma, l'altro è diretto dal dott. Iacone del Centro trasfusionale dell'Ospedale di Pescara.

Presso l'Istituto CNR è in corso la tipizzazione del DNA proveniente da CSCO, raccolte presso i suddetti Centri e che ad oggi sono circa 500 (273 cordoni da Roma e 171 da Pescara) già definite sierologicamente per gli antigeni HLA di classe I.

Per quanto riguarda il locus DRB1, è stato effettuato uno screening preliminare con PCR-SSP dei principali gruppi allelici DRB1 e successivamente una analisi di sequenza (SBT), secondo il metodo di Sanger, del II esone del gene DRB1 con l'impiego di dye primers ed AmpliTaq FS. Tale metodica mediante utilizzo di specifici pacchetti software di analisi (Match Maker) ha consentito l'esatta definizione dei sottotipi degli alleli DRB1 e, rispetto ad altre metodiche di biologia molecolare, quali l'amplificazione con primers sequenza-specifici (PCR-SSP) e l'amplificazione ed ibridazione con oligonucleotidi sequenza-specifici (PCR-SSO), può identificare alleli poco frequenti nella popolazione Italiana e possibili nuovi alleli.

Per quanto riguarda gli antigeni di classe I, presso il Centro di biotecnologie avanzate di Genova-IST è stata messa a punto la tecnica di sequenziamento per il locus HLA-A, utilizzando due primers locus-specifici che permettono di amplificare un frammento di DNA che si estende dall'esone 1 all'esone 5 (2 Kb) e una reazione di sequenza forward e reverse impiegando 6 primers fluorescinati scelti nelle regioni fiancheggianti gli esoni 2, 3, 4 (1).

Presso questo Centro è stata allestita una metodica di sequenziamento automatico anche per il locus HLA-B con primers disegnati in modo da discriminare il polimorfismo all'interno degli esoni 2 e 3 e marcati con i nuovi fluorocromi Bigdye (diclororodamina e 6-carbossifluorescina). Questa nuova strategia di tipizzazione ha il vantaggio di potenziare il segnale che viene rilevato dal laser come picchi omogenei in altezza ed intensità e di diminuire la sovrapposizione degli spettri di assorbimento con conseguente minore rumore di fondo (2).

## Risultati

L'analisi degli allelismi HLA di classe I definiti sierologicamente effettuata su cellule provenienti da sangue cordonale ha evidenziato una più elevata incidenza di blanks, cioè antigeni non definiti sierologicamente (locus HLA-A f.a.=12,7% vs 2,6%; locus B f.a.=6,4% vs 3,8%) se paragonata a quella presente in campioni di sangue periferico di una popolazione italiana di controllo.

Il polimorfismo del locus DRB1, difficilmente valutabile con le normali tecniche sierologiche a causa della ridotta espressione degli antigeni sulla superficie cellulare, è stato studiato mediante tecniche più sofisticate di sequenziamento diretto e l'ausilio di programmi dedicati all'assegnazione allelica.

Questa strategia di tipizzazione offre notevoli vantaggi per quanto riguarda la pratica clinica. Innanzitutto, è da considerare il minor tempo di esecuzione richiesto per una completa tipizzazione; ad esempio, per il locus DRB1, per definire 18 campioni occorrono 24 ore con l'SBT rispetto alle 27 ore necessarie impiegando le tecniche più rapide di biologia molecolare quali l'SSP (tabella 1).

**Tabella 1.** - Tempi di esecuzione tipizzazione DRB1 con tecniche PCR-SSP e di sequenziamento automatico (DNA già estratto).

SSP	SBT
<p>"LOW RESOLUTION" typing 3.00 h / 4 campioni</p> <p>"HIGH RESOLUTION" typing 3.00 h / 4 campioni</p> <p><u>Totale</u> <b>6.00 h / 4 campioni</b> <b>27.00 h / 18 campioni</b></p>	<p>24 h / 18 campioni (sequenza forward e reverse)</p>

Inoltre, considerando che la quantità totale di DNA disponibile per la tipizzazione e da mantenere come riserva per ulteriori controlli di compatibilità in caso di effettivo utilizzo per trapianto è di circa 60 microgrammi (28 µg per la tipizzazione genomica e 28 µg di riserva), tale metodologia permette di effettuare una analisi completa HLA di classe I e II con soli 3.7 µg di DNA, mentre utilizzando le tecniche SSP o SSOP è richiesto tutto il DNA di cui si dispone (tabella 2).

Tabella 2. - *Quantità di DNA genomico per tipizzazione completa HLA di classe I e II.*

SSP		SEQUENZA	
A, B, C	12.000 ng	A, B, C	1.500 ng
DRB1	6.000 ng	DRB1	700 ng
DQA1	1.925 ng	DQA1	500 ng
DQB1	2.700 ng	DQB1	500 ng
DPB1	5.200 ng	DPB1	500 ng
Totale	27.825 ng	Totale	3.700 ng

L'analisi dei costi ha dimostrato che una tipizzazione completa per sequenza viene eseguita con una spesa che è meno della metà del costo di una tipizzazione con SSP, a parte la spesa iniziale dell'apparecchio che può essere ammortizzata utilizzandolo a pieno ritmo su un gran numero di campioni (tabella 3).

Tabella 3. - *Costi per una tipizzazione DRB1 con tecniche PCR-SSP o di sequenziamento automatico.*

SSP		SBT
"low resolution" L. 49.000 / campione		<u>dye-primers</u> L. 70.000 / campione
1-2 alleli in 1 sottogruppo L. 32.000	2 alleli in 2 sottogruppi L. 64.000	<u>dye terminators</u> L. 50.000 / campione
<i>Tipizzazione completa</i>		
<u>1 sottogruppo</u> L. 81.000	<u>2 sottogruppi</u> L. 113.000	

### Bibliografia

- PERA C., DELFINO L., MORABITO A., LONGO A., JOHNSTON-DOW L., WHITE C.B., COLONNA M., FERRARA G.B.: HLA-A typing: comparison among serology, ARMS-PCR and sequencing. *Tissue Antigens* 1997, 50: 1-8.
- POZZI S., FERRARA G.B.: High resolution HLA-B automated direct sequencing typing. 12<sup>th</sup> *European Histocompatibility Conference*, 25-27 March 1998 Strasbourg. *European Journal of Immunogenetics* 1998, 25 (1):46.
- FERRARA G.B., BINI D., DELFINO L., MORABITO A., PERA C., POZZI S., BOTTERO F., LAMPARELLI T., BAGICALUPO A.: Effect of HLA class I mismatches in adult bone marrow transplantation. 22<sup>nd</sup> *Annual Meeting American Society for histocompatibility and Immunogenetics* 11-16/10/96, San Diego, CA, USA.
- CANOSSI A., OZZELLA G., PAPOLA F., MACCARONE D., CONTASTA I., LIBERATORE G., DI ROCCO M., DI BARTOLOMEO P., DEL BEATO T., ADORNO D., CASCIANI C.U.: Incompatibilità HLA-DPB1 e CLM in coppie di trapianto di midollo tra correlati e non correlati.

- XXIII Congresso Nazionale Società Italiana trapianti D'Organo*, Bari 21-23 Settembre 1995. *Stato Attuale Dei Trapianti di Organo e di Tessuto in Italia*. Schena e Selvaggi Wichting Editore (1995): 847-856.
5. ADORNO D., CANOSSA A., PIAZZA A., MACCARONE D., PAPOLA F., OZZELLA G., CASCIANI C.U.: Sequence based typing for DRB1 gene and humoral response in kidney transplant donor-recipient pairs. *23<sup>rd</sup> Annual Meeting American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, Atlanta, Georgia October 14-19, 1997.
  6. CANOSSA A., PIAZZA A., DI ROCCO M., LIBERATORE G., PAPOLA F., POGGI E., FRABONI D., CASCIANI C.U., ADORNO D.: DRB1 sequence-based matching in cadaveric renal transplant. *12<sup>th</sup> European Histocompatibility Conference*, 25-27 March 1998 Strasbourg. *European Journal of Immunogenetics* 1998, 25 (1):5.
  7. DELFINO L., MORABITO A., LONGO A., FERRARA G.B.: HLA-C High resolution typing by automated direct sequencing (ASBT). *12<sup>th</sup> European Histocompatibility Conference*, 25-27 March 1998 Strasbourg. *European Journal of Immunogenetics* 1998, 25 (1):48.