

TYPNING AV HLA-B*27:

EN JÄMFÖRELSESTUDIE MELLAN TVÅ
ANALYSMETODER FÖR ATT PÅVISA HLA-B*27
MOLEKYLEN I ANKYLOSERANDE SPONDYLIT

CAROLINA BERMUDEZ

TYPNING AV HLA-B*27:

EN JÄMFÖRELSESTUDIE MELLAN TVÅ ANALYSMETODER FÖR ATT PÅVISA HLA-B*27 MOLEKYLEN I ANKYLOSERANDE SPONDYLIT

CAROLINA BERMUDEZ

Bermudez, C. Typning av HLA-B*27. En jämförelsestudie mellan två analysmetoder för att påvisa HLA-B*27 molekylen i Ankyloserande spondylit. *Examensarbete i Biomedicinsk vetenskap, 15 högskolepoäng*. Malmö universitet: Fakulteten för hälsa och samhälle, institutionen för Biomedicinsk vetenskap, 2018.

Human leukocyt antigen (HLA) är vävnadsantigener, belägna på våra vita blodkroppar. HLA-B*27 allelen är starkt kopplat till Ankyloserande spondylit (AS). Det är en kronisk inflammatorisk ledsjukdom, som främst attackerar ryggraden, bäckenet och bröstkorgen. Det finns idag ingen enskild laborativ metod som med full säkerhet kan fastställa diagnos av denna sjukdom, innan de kliniska symtomen uppträder. Typning av HLA-B*27 ger endast information om närvaro eller frånvaro av antigenet, vid utredning av AS. Vidare är HLA-B*27 en polymorf och de olika alleltyperna varierar kraftigt, bland skilda etniska grupper samt mellan geografiska områden. Genetiska- och miljöfaktorer påverkar också. Sjukdomsutveckling i samband med närvaro av HLA-B*27 allelen, varierar därför från individ till individ. Därmed fungerar metoden endast som ett komplement-verktyg, för att ytterligare bekräfta diagnos. Syftet med denna studie var att med realtids-polymerase chain reaction (PCR), utföra typning av HLA-B*27 med Linkseq kit samt jämföra analysresultaten med uthämtade resultat från intern sjukhusdatabas, där typning av HLA-B*27 hade utförts med PCR-SSP (sekvens-specifika primers). Samtliga resultat stämde överens till 100%, vilket indikerar att metoden fungerar bra. Det finns studier som visat att HLA-B*27 molekylen har en starkare benägenhet än andra HLA-molekyler att binda in till killer immunoglobine-like receptorer (KIRs). Inbindning till KIRs med efterföljande ökad stimulering av interleukiner (IL) främst IL-17 och IL-23 bidrar till sjukdomsutvecklingen av AS. Dock finns ingen HLA-B*27₂ specifik antikropp som kan bevisa detta och det behövs därför ytterligare undersökning för att hitta en sådan. Därefter skulle en ny laborativ metod kunna utvecklas för att fastställa diagnos av AS i ett tidigt skede, innan de kliniska symtomen uppvisas.

Nyckelord: Allelvarianter, Ankyloserande spondylit, HLA-B*27, KIR, PCR-SSP, Realtids-PCR.

TYPING OF HLA-B*27:

A COMPARISON STUDY BETWEEN TWO ANALYSING METHODS FOR THE DETECTION OF THE HLA-B*27 MOLECULE IN ANKYLOSING SPONDYLITIS

CAROLINA BERMUDEZ

Bermudez, C. Typing of HLA-B*27. A comparison study between two analysing methods for the detection of the HLA-B*27 molecule in Ankylosing spondylitis. *Degree project in Biomedical Laboratory Science, 15 credit points*. Malmö University: Faculty of Health and Society, Department of Biomedical science, 2018.

Human leukocyte antigen (HLA) are tissue antigens located on our white blood cells. The HLA-B*27 allele is strongly related to Ankylosing spondylitis (AS). It is a chronic inflammatory rheumatic disease that primarily affects the spine, the pelvis and the chest. At present, there is no single laboratory method that with all certainty may determine diagnosis of this disease, before the clinical symptoms appear. Typing of HLA-B*27 only gives information about the presence or absence of the antigen, upon the investigation of AS. Furthermore, HLA-B*27 is a polymorph and the different types of alleles, strongly vary among different ethnic groups and also between geographic regions. Genetic- and environmental factors also affect. Development of disease in conjunction with the presence of the HLA-B*27 allele, therefore varies from one individual to another. So, the method only functions as a complementary tool, to further confirm diagnosis. The aim of this study was to perform HLA-B*27 typing with realtime-polymerase chain reaction (PCR) using Linkseq kit and compare the analysed results with those results that were retrieved from the internal database of the hospital, where typing of HLA-B*27 had been performed with PCR-SSP (sequence specific primers). All results agreed with 100%, which indicates that the method functions well. There are studies that show that the heavy chains (HLA-B*27₂) of the HLA-B*27 molecule have a stronger affinity than other HLA-molecules of binding in to killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). Increased stimulation of interleukins (IL) primarily IL17 and IL23, following binding to KIRs, contributes to the pathogenesis of ankylosing spondylitis. However, there is no HLA-B*27₂ specific antibody that may prove this and therefore more investigation is needed, in order to find one. A new laboratory method could then be developed to determine diagnosis of AS at an early stage, before the clinical symptoms emerge.

Keyword: Allelvariants, Ankylosing spondylitis, HLA-B*27, KIR, PCR-SSP, Realtime-PCR.

FÖRORD

Jag skulle vilja tacka personalen på Klinisk Immunologi och Transfusionsmedicin i Lund. Tack till mina handledare Rebecca Rappner och Emma Larzenius samt enhetschef Eva-Mari Karlsson, för att jag fick möjligheten att utföra mitt examensarbete på er avdelning.

Ett speciellt tack till Anette Gjørloff Wingren och Lars Ohlsson på Malmö universitet, för allt stöd och återkoppling som jag fick under projektets gång.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

BAKGRUND	6
HLA-B*27	6
HLA-B*27 molekylen och dess roll i patogenesen av ankyloserande spondylit	7
PCR-SSP	8
Realtids-PCR	9
Syfte	10
Hypotes	10
MATERIAL OCH METOD	10
Material	10
Metod	10
Statistisk bearbetning	11
Etikprövning	11
RESULTAT	12
Realtids-PCR (LinkSeq)	13
DISKUSSION	14
Metoddiskussion	14
Resultatdiskussion	15
KONKLUSION	15
REFERENSER	17

BAKGRUND

Ankyloserande spondylit (AS) är en kronisk inflammatorisk reumatisk sjukdom och tillhör undergruppen spondyloartropati. Det är en sjukdom som främst angriper ryggen, bäckenet och bröstkorgen, men även andra angränsande delar till axialskelettet kan angripas. Typiska kännetecken är att ryggradens kotor blir inflammerade, vilket leder till kronisk smärta och obehag. I svårare fall, kan inflammationen medföra nybildning av ben på ryggraden, vilket leder till stelhet med begränsad rörlighet vid framåtböjning och sidoböjning. Om sjukdomen förblir obehandlad, kommer inflammationen i ryggradsleder leda till att brosk och fibrös vävnad såväl som ligament i omgivande strukturer gradvist bryts ned och ersätts med ben. AS kan även angripa andra leder såsom höft-, axel-, knä-, fot- och armbågsleder. Vidare kan sjukdomen påverka lungor, ögon, bålen och hjärta. Diagnostiseringen grundar sig på kliniska symtom samt röntgenfynd. Dock upptäcks röntgenfynden oftast sent i sjukdomsförloppet. Tyvärr finns det heller inga laborativa metoder som med säkerhet kan fastställa diagnos av AS. Målet är att hitta en metod som kan fastställa diagnos innan ryggraden skadats [1-3].

Datortomografi och magnetkameraundersökning (MRI) kan påvisa tidig inflammation i lederna mellan ryggraden och bäckenet, men utförs sällan. Sjukdomens orsak är okänd, men kan utlösas av virus. Genetiska faktorer är också av betydelse. En specifik histokompatibilitetsantigen som finns på cellytan, HLA-B*27 (human leukocyte antigen), förknippas med sjukdomen. HLA-B*27 är en polymorf av HLA-B, vilket innebär att den är mångformig och förekommer i många olika varianter. 90-95% av patienterna med AS har vävnadstypen, men även 10% av de som är friska har den. [1-3]. Vidare visar studier att endast 1-2% av populationen som bär på genen, utvecklar sjukdomen, vilket indikerar att även genetiska- och miljöfaktorer påverkar [4-5]. En ny modell för kriterier har nyligen upprättats av ASAS (Assessment of Spondyloarthritis International Society) för att underlätta diagnostisering i ett tidigare skede innan röntgenfynd upptäcks. Kriterierna som ska uppfyllas är inflammatoriska fynd i leder analyserade med röntgen eller MRI, tillsammans med minst ett symtom av AS eller närvaro av HLA-B*27 tillsammans med två av symtomen för AS [1-3].

HLA-B*27

HLA-antigener kodas av major histokompatibilitetkomplexet (MHC), som är en grupp gener belägna på kromosom 6. HLA-antigener är proteiner som finns på de vita blodcellerna och hjälper immunförsvaret att skilja mellan egna friska vävnadsceller och andra främmande kroppar som kan ge upphov till infektion. HLA-antigener delas in i klass I och klass II, varav HLA-B tillhör klass I. Trots att HLA-antigener är till för att skydda kroppen mot skada, kan det specifika vävnadsantigenet HLA-B*27 leda till dysfunktionellt immunsystem. HLA-B*27 är kopplat till flera andra autoimmuna- och immunmedierade sjukdomar som bland annat reaktiv artrit, uveit och juvenil reumatoid artrit. Ett HLA-B*27 test kan tillsammans med andra blodtest, urinprov och röntgen användas för att följa upp dessa och andra autoimmuna sjukdomar. Det kan även utföras inför njur- och benmargstransplantationer för att hitta en lämplig matchande donator. Ett negativt HLA-B*27 test indikerar avsaknad av vävnadsantigenet. Dock innebär detta inte att en autoimmun sjukdom ej föreligger. Vidare kan ett positivt resultat indikera att sjukdomen finns, men innebär inte alltid utveckling av autoimmun sjukdom. En helhetsbedömning av uppvisade symtom tillsammans med resultat från de

olika blodtesterna och diagnostiska undersökningar bör därför göras för att fastställa diagnos av autoimmun sjukdom [4,6].

HLA-B*27 molekylen och dess roll i patogenesen av ankyloserande spondylit

Trots att studier visat att HLA-B*27 är starkt förknippat med AS och andra inflammatoriska ryggsjukdomar, är genens roll i den patologiska processen ännu oklar. HLA klass I-molekyler uttrycks som en heterotrimer bestående av en tung kedja, β_2 -mikroglobulin (β_2m) och peptid från egna proteiner, virus eller bakterier. HLA-B*27 molekylen kan dessutom bilda fria tunga homodimerkedjor som benämns HLA-B27₂. Dessa tunga kedjor är disulfidbundna genom en fri cysteinresidual (Cys-67) och kan framträda på cellytan efter att heterotrimerstrukturen bildats i endoplasmatiska retiklet (ER). Molekylens förmåga att bilda disulfidbindningar via cysteinmolekylen är både sällsynt och nödvändig för att HLA-B*27 molekylen ska kunna uttrycka homodimerer på sin cellyta. Dock kan andra HLA-klass I molekyler också bilda homodimerer via olika cysteinstrukturer [7-8].

Hopsättning av stabila MHC-molekyler i ER är ett viktigt steg före transport till cellytan. Fria tunga kedjor stabiliseras initialt av chaperoner vid syntes och glykosylering, tills en lämplig struktur bildats för att binda in β_2 -mikroglobulin och en peptid med rätt längd. Kännetecknen vid bildandet av MHC-klass I-molekyler är inbindning till antigenpeptider och transport av dessa till cellytan där de presenteras för T-cellsreceptorer på T-lymfocyter. Vid frånvaro av β_2m -molekylen kommer tunga kedjor att veckas fel och kan leda till nedbrytning i ER. Dock verkar det som att just HLA-B*27-molekylen har en tendens att veckas fel och har därmed en benägenhet att bilda dimerer och multimerer [9].

Det finns flera olika teorier som förklarar HLA-B*27 molekylen roll i AS. Dessa inkluderar aktivering av korsreaktiva autoimmuna T-celler via "artrogena" peptider och stimulering av proinflammatorisk cytokinproduktion som inducerats av påfrestningar i ER till följd av avvikande HLA-B*27 molekyelstruktur [7-8, 10]. Det har tidigare påvisats att detta resulterar i efterföljande uppreglering av olika cytokiner, speciellt interleukin (IL) -23 och IL-17 i samband med ökat HLA-B*27:05 och ackumulering av dess tunga kedjor samt felveckad HLA-B*27 proteinstruktur, vilket bidrar till sjukdom. Studier har även visat att HLA-B*27:05 bildar fler tunga kedjor än den icke-relaterade HLA-B*27:09 allelen [11-12]. Starkt stöd för att HLA-B*27₂ cellytemolekylen ensam bidrar till utveckling av AS saknas, på grund av att det tidigare inte fanns någon känd HLA-B*27₂ specifik antikropp [13-14].

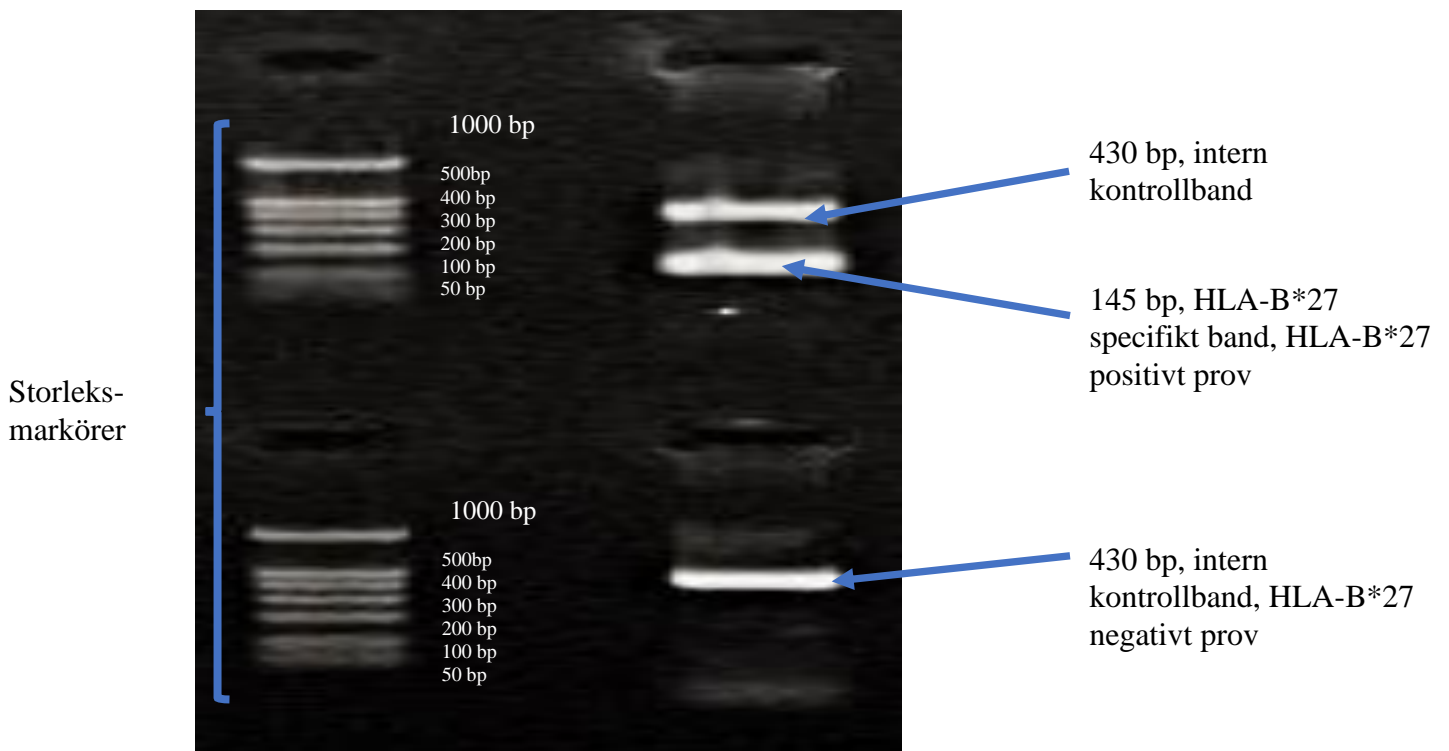
En monoklonal antikropp, HC10, binder till HLA-B*27₂ men känner även igen andra tunga HLA-B*27 kedjestrukturer (inklusive fria tunga kedjor och multimerer) och binder även till HLA-B, C och vissa HLA-A strukturer. Tidigare studier har visat att monocytter från AS-patienter uttrycker mer HC10-reaktiva HLA-B*27 jämfört med monocytter från en kontrollgrupp. Även om monocytter hos AS-patienter uppvisar ett högre HC10 uttryck, är dess exakta igenkännande av molekyler ännu inte känt. Därför är HC10 inte specifik för HLA-B*27₂ eller HLA-B*27 molekylen tunga kedjor [8,14]. Dock har en annan monoklonal antikropp (HD6) nyligen upptäckts, som binder specifikt till HLA-B*27-molekylen fria tunga kedjor. Med hjälp av HD6, har nivån av HLA-B*27₂ kunnat kvantifieras hos AS-patienter respektive kontrollgrupp. HD6 känner igen

avvikande och förmodligen sjukdomsalstrande HLA-B*27 dimerer, som uttrycks på monocyternas cellyta hos AS-patienter. Studier visar ett ökat celluttryck av fria tunga homodimerkedjor på monocyter från AS-patienter, jämfört med monocyter från en kontrollgrupp. Detta kan förklara att ökat uttryck av dessa kedjor hos AS-patienter med HLA-B*27:05-allelen, som fungerar som ligander för immunoreceptorer, såsom KIR3DL2, troligen bidrar till främjande av proinflammatorisk leukocytöverlevnad och därmed AS [7-8, 12].

PCR-SSP

PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Priming) är en variant av PCR, där endast sekvensspecifika primers binder in för identifiering av specifika alleler. Primers används även för amplifiering av en intern kontroll (gensekvens av humant tillväxthormon, HGH). Om ingen specifik PCR-produkt bildats efter PCR, måste amplifiering av den positiva kontrollen vara tydlig. Med hjälp av PCR-SSP, kan HLA-typning utföras och därmed kan specifika HLA-B*27 alleler detekteras [15].

Fördelen med PCR-SSP är att fullständigt eller nästintill fullständigt matchande oligonukleotida primers utan mismatch vid 3'-änden är mer effektiva under PCR-reaktionen än mismatched primers med termostabil DNA-polymeras utan förmåga för proof-reading. Primerpar är utformade så att de matchar med enskilda alleler eller en grupp av alleler, beroende på vilken upplösning som krävs för typning. PCR-reaktion sker under mycket kontrollerade former och kommer att leda till amplifiering med matchande eller nästintill matchande primers som innebär positivt resultat, medan mismatched primers inte ger någon amplifiering vilket tyder på negativt resultat. Efter PCR-reaktionen, separeras amplifierade DNA-fragment efter storlek med gelelektrofores som sedan visualiseras genom att tillsätta ethidium bromide och belysa det med UV-ljus. Med hjälp av fotografering, avläses och tolkas resultaten (se figur 1). På detta sätt bedöms närvaro eller frånvaro av specifik PCR-produkt [16].



Figur 1. Exempel på positivt (två band) och negativt (ett band) resultat med intern kontroll från gelelektrofores vid analys av HLA-B*27 med PCR-SSP metoden. Gelbilden är tagen efter en körning som utförts med kit från Olerup SSP (Olerup, Stockholm Sverige) Till vänster syns två storleksmarkörer (en för respektive prov) och det används som referens, för att bedöma storleken på DNA-provets respektive band. Storleksmarkören innehåller sju fragment, 1000 baspar (bp), 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp och 50 bp. Två band indikerar positivt utslag (närvaro av HLA-B*27 allelen) medan ett band indikerar negativt utslag (avsaknad av HLA B*27-allelen).

Ett band med storleken 430 bp motsvarar den interna kontrollen och indikerar frånvaro av HLA-B*27 allelen, medan två band indikerar närvaro av HLA-B*27 allelen (430 bp för den interna kontrollen respektive HLA-B*27 specifikt band med storleken 145 bp).

Realtids-PCR

I qPCR jämförs mängden syntetiserat PCR-produkt med mängden som syntetiserats under PCR-reaktionen med känd mängd DNA som fanns från början. Tidigare utfördes detta med hjälp av agarosgelelektroforesmetoden. Efter infärgning av gel analyserades gelbanden för att identifiera den PCR-kontroll, vars produkt liknade testets. Dock är denna metod ospecifik p.g.a att stora skillnader i mängden start DNA, ger relativt små skillnader i färgintensiteten i gelbanden av slutprodukt [16]. Vidare kan olika molekyler med snarlika molekylärvikt inte urskiljas [17]. Idag utförs kvantitativ DNA-analys med hjälp av realtids-PCR, som är en modifikation av den traditionella PCR-metoden, där syntetiserad PCR-produkt analyseras för varje PCR-cykel med fluorescens.

Realtids-PCR kan utföras med ett detektionssystem som baseras på allellspecifik PCR liknande PCR-SSP. Numera används ett icke-toxiskt fluorescerande ämne, SYBR Green, istället för det giftiga ämnet etidiumbromid, för att identifiera närvaro eller frånvaro av specifika alleler. När SYBR Green binder in till dubbelsträngad DNA, kommer det att ändra form, som leder till en ökning av

fluorescens. När temperaturen ökar, smälter DNA och fluorescensen minskar. Nackdelen med denna metod är dock att primers ibland binder in till varandra ospecifict och därmed binder färgen in ospecifict till dubbelsträngat DNA, vilket ger falskt höga värden av den totala mängden vid detektion [15-18].

Analysen med realtids-PCR kan snabbt fullbordas utan krav på efterarbete för amplifiering. Identifikation av amplifierade produkter genom detektion med probe i realtid har hög specificitet jämfört med gelelektrofores. Analys under pågående reaktionsprocess möjliggör en exakt kvantifiering av målsekvens inom ett brett dynamiskt intervall, förutsatt att lämpliga standarder finns tillgängligt. Genom vidare analys av realtids PCR-produkter från ursprunglig provmix kan skilda sekvenser inklusive enskilda mutationer detekteras med hjälp av prober och smältkurvsanalyser [17].

Syfte

Syftet med denna studie är att jämföra analysresultaten för typning av HLA-B*27 med realtids-PCR och PCR-SSP.

Frågeställning

Är realtids-PCR en bättre, snabbare och mer specifik metod för typning av HLA-B*27 än PCR-SSP?

MATERIAL OCH METOD

Material

24 DNA-prover som redan hade förbehandlats och extraherats, analyserades med realtids-PCR, varav 12 var från sjuka patienter med AS och 12 från friska individer. Samtliga DNA-prover var från samma patienter som tidigare hade typats med PCR-SSP på sjukhuset i Lund samt fått sin diagnos för AS (positiv eller negativ) och där kit från Olerup SSP (Olerup, Stockholm Sverige) använts. Dessa resultat hämtades ut från sjukhusets interna databas DoReMi och sammanställdes samt jämfördes med bearbetade resultat från analys som i denna studie utfördes med realtids-PCR (LinkSeq HLA-B*27 kit ® från Linkage Biosciences™ och tillhörande mjukvaruprogram Suretyper™, San Francisco, USA). Renheten och koncentrationen för samtliga DNA-prover kontrollerades med spektrofotometern Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, Waltham USA).

Realtids-PCR (Linkage Biosciences)

12 remsor med intorkat reagens, 2 flaskor LS buffert, 1 flaska DNA polymeras och 12 PCR optiska täckremsor. Tillhörande mjukvaruprogrammet SureTyper™.

Metod

Analysen utfördes med hjälp av LinkSeq HLA-B*27 kit ® (Linkage Biosciences™, San Francisco, USA), enligt tillverkarens instruktioner. En fluorescensmärkt prob binder till dubbelsträngat DNA, inkluderades i provmixen och gav en fluorescenssignal vid inbindning.

Följande material LS-buffert, DNA-polymeras och LinkSeq strips-rör togs ut från frysen. Väl tinad, förvarades LS-bufferten och DNA-polymeras kylt.

Patientproverna var förmärkta med provnummer. Renheten och koncentrationen DNA kontrollerades genom att mäta absorbansen för varje prov, vid våglängden 260 och 280 nm med hjälp av spektrofotometern NanoDrop™. Därefter beräknades renheten genom att räkna ut absorbanskvoten.

Stripsen märktes med kolumnnummer. Flaskan med LS-buffert förbereddes, genom att tillsätta 12 µl DNA-polymeras. Därefter tillsattes 5 µl LS-buffert (innehållande DNA-polymeras) varje brunn. 5µl sterilt vatten tillsattes sedan till brunn märkt H (NTC, no template control). 2 µl prov och 3 µl sterilt vatten tillsattes alla brunnar utom den som var märkt H (NTC).

Om mängden DNA ligger mellan 8-100ng tillsätts 2 µl prov och 3 µl sterilt vatten. Om DNA-koncentrationen ligger mellan 1,6 ng/µl och 20 ng/µl, tillsätts 5 µl DNA-prov. Om koncentrationen DNA är mellan 4 ng/µl och 50 ng/µl, tillsätts 2 µl prov och 3 µl sterilt vatten. Om DNA-koncentrationen är mindre än 1,6 ng/µl, ökas koncentrationen DNA före analys.

Stripsen täcktes med PCR Optical Strip Cap, som medföljde kitet och centrifugerades i ca 30-60 s i 1000g. Därefter placerades stripsen omedelbart i realtids-PCR-instrumentet. Detektionen av PCR-produkt utfördes genom att mäta fluorescenssignaler under varje PCR-cykel. Den totala mängden dubbelsträngat DNA i varje prov mättes i obestämd tid, under PCR-reaktionen. Om en amplifieringskurva erhöles, indikerade detta positiv reaktion. Efter amplifiering, överfördes data från realtidsinstrumentet enligt instruktioner från SureTyper-manualen.

Statistisk bearbetning

Samtliga resultat bearbetades med hjälp av ett mjukvaruprogram (Suretyper), som medföljde Linkseq-kitet. Fluorescenssignalen av varje prov analyserades i realtids-PCR instrumentet vid olika temperaturer och kunde avläsas genom att smältkurvan avbildades på en graf, med hjälp av programvaran. Därefter sammanställdes resultaten i tabellformat från Microsoft Word. Analysvärdena jämfördes sedan med uthämtade resultat från de DNA-prover som analyserats av sjukhuspersonal med PCR-SSP (Olerups kit). Dessa resultat hämtades ut via sjukhusets interna databas.

Etikprövning

Inget fysiskt ingrepp utfördes i denna studie. Tidigare analyserade resultat från patientprover hämtades ut från ett internt datasystem på sjukhuset för jämförelse, men dessa var aidentifierade. Även aidentifierade DNA-prover användes i studien och kan således heller inte spåras. Etikprövning bedömdes därför inte vara nödvändigt och utfördes inte.

RESULTAT

24 DNA-prover analyserades med realtids-PCR (LinkSeq kit), varav 12 st var från friska individer och 12 från patienter med konstaterad AS. Alla DNA-prover var samma som tidigare hade typats och analyserats med Olerups SSP-PCR kit. Renheten och koncentrationen DNA för samtliga DNA-prover (se tabell 1) låg inom det optimerade intervallet (kvot 1,8-2,0, för vad som ansågs vara tillräckligt

rent enligt NanoDrop™ 2000c manual respektive DNA koncentration 4 ng/ul-50ng/ul samt total mängd 8 ng-100 ng per brunn, enligt Linkseq bruksanvisning).

Tabell 1. Resultat för samtliga positiva prover. Absorbans vid 260 nm respektive 280 nm, renhet, koncentration och positivt utslag.

Provnummer	260 nm	280 nm	Kvot 280/260 nm	Konc. DNA (ng/ul)	Resultat realtids-PCR (LinkSeq)
277	1,270	0,687	1,85	91,7	+
316	1,317	0,709	1,86	52,3	+
325	0,842	0,449	1,88	44,5	+
361	1,733	0,951	1,82	73,5	+
252	0,980	0,522	1,88	53,3	+
267	1,096	0,584	1,87	57,7	+
273	1,030	0,545	1,89	44,2	+
145	1,236	0,664	1,86	39,3	+
153	1,277	0,685	1,86	62,4	+
162	1,565	0,847	1,85	95,4	+
194	0,935	0,495	1,89	28,4	+
180	0,788	0,429	1,84	39,4	+

Tabell 2. Resultat för samtliga negativa prover. Absorbans vid 260 nm respektive 280 nm, renhet, koncentration och negativt utslag.

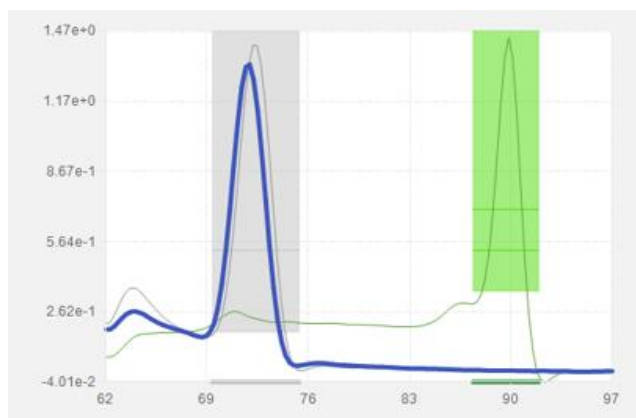
Provnummer	260 nm	280 nm	Kvot 280/260 nm	Konc. DNA (ng/ul)	Resultat realtids-PCR (LinkSeq)
225	0,487	0,244	1,99	23,6	-
211	0,952	0,503	1,89	33,3	-
360	0,597	0,324	1,84	42,9	-
359	1,134	0,606	1,87	71,6	-
343	1,278	0,694	1,84	65,7	-
317	0,937	0,501	1,87	38,5	-
318	0,797	0,419	1,90	44,5	-
298	1,406	0,762	1,85	67,2	-
287	1,532	0,829	1,85	75,4	-
278	1,462	0,796	1,84	68,8	-
143	1,143	0,616	1,86	62,2	-
144	1,033	0,551	1,87	48,8	-

Samtliga resultat som erhöles efter analys med realtids-PCR (LinkSeq-kitet) och uthämtade resultat från sjukhuset efter analys med PCR-SSP (Olerups kit), visade efter sammanställning och jämförelse av dessa, att alla stämde väl överens. Resultaten från båda kit, gav endast information om närvaro eller frånvaro av HLA B*27-allelen, oberoende av subtyp.

Alla DNA-prover som tillhörde de patienter som diagnosticerats med AS gav positivt utslag för HLA-B*27 allelen med kit från LinkSeq (se tabell 1) och de DNA-prover som tillhörde de friska individerna gav negativt utslag (se tabell 2), vilket var förväntat. Sammanställning och jämförelse av samtliga resultat från de DNA-prover som analyserats med realtids-PCR, visade också att 100% av både de positiva och negativa resultaten stämde väl överens med de analysvärdena som hämtades ut från sjukhusets interna databas.

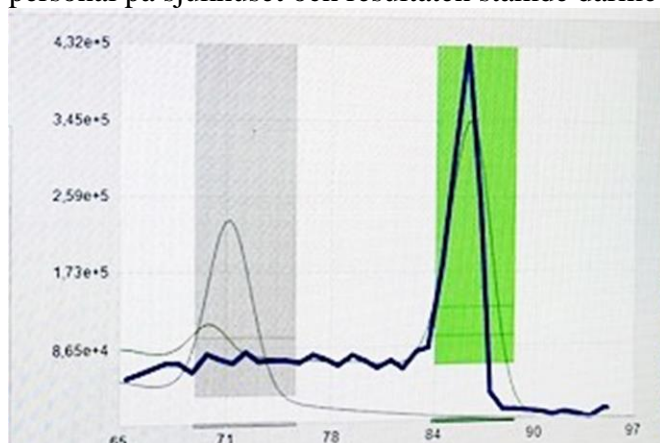
Realtids-PCR (LinkSeq)

Nedan visas exempel på hur smältkurvan kan se ut vid frånvaro (figur 1) respektive närvaro (figur 2) av HLA-B*27 allelen i ett DNA-prov.



Figur 2. Smältkurva vid negativt utslag (avsaknad av HLA-B*27-allelen, blå kurva). Grå zon anger smältpunktsintervallet för frånvaro av HLA-B*27 allelen och grön zon anger intervallet för närvaro av allelen.

Alla de negativa proverna hade en smältpunkt inom intervallet 69,5-75,5 °C vilket indikerade frånvaro av HLA-B*27 allelen (figur 1). Dessa prover uppvisade också endast ett gelband vid tidigare analys med Olerups kit (se figur 3), som utförts av personal på sjukhuset och resultaten stämde därmed överens med dessa.



Figur 3. Smältkurva vid positivt utslag (närvaro av HLA-B*27 allelen, blå kurva).

Alla de positiva proverna hade en smältpunkt inom intervallet 84-89 °C, vilket indikerade närvaro av HLA-B*27 allelen (figur 2). Dessa resultat stämde överens med de som analyserats med Olerups kit (figur 3), där dessa uppvisade två gelband (ett för den interna kontrollen och ett för det HLA-B*27 specifika bandet).

DISKUSSION

HLA-B*27 är en polymorf av HLA-B och förekommer i över 100 allelvarianter. Tidigare studier som gjorts indikerar att HLA B*27-genen är starkt associerad till AS. Studier visar också att individer med vissa allelvarianter inom HLA-B har större mottaglighet för sjukdomen än individer med andra allelvarianter, varav HLA-B*27:05 generellt är den mest förekommande världen över i samband med AS [4].

Dessutom förekommer stor geografisk och etnisk skillnad mellan de olika allelvarianter, både hos sjuka och friska individer. HLA-B*27:05 och 02 är tillsammans de vanligaste hos AS-patienter i Europa medan B*27:04 dominerar hos AS-patienter i Asien [3]. HLA-B*27:06 och 09 saknar helt koppling till AS [19,20]. Vidare har en studie påvisat att HLA-B*27:04 och HLA-B*27:02 är associerat till AS i en population, medan det i andra studier saknades sådan koppling i en annan population [3,21]. Detta innebär att ett negativt utslag av HLA-B*27 i ett test inte med säkerhet kan utesluta sjukdom. Däremot kan ett positivt utslag ytterligare bekräfta sjukdom (dock inte i förväg fastställa diagnos), efter diagnosticering med andra metoder och har därmed en större klinisk betydelse vid diagnosticering av AS. HD6 hämmar immunoreceptorernas förmåga att känna igen HLA-B*27 molekylens homodimerkedjor och kommer därför vara ett kraftfullt verktyg vid undersökning samt som behandling av AS.

Det finns olika teorier om HLA-B*27 molekylens roll i sjukdomsutvecklingen, vilket bland annat inkluderar aktivering av korsreaktiva autoimmuna T-celler via artrogena peptider och proinflammatoriska cytokiner, som en konsekvens av felveckat HLA-B*27. Vid frånvaro av β_2m -molekylen bildas felveckade fria tunga homodimerkedjor med förmåga att binda in till killer cell immunoglobuline-like receptor family (KIRs) på ett peptidberoende sätt till skillnad från andra HLA-molekyllkedjor som binder in på ett peptidberoende sätt. Vidare visar studier att HLA-B*27 dimerer och tunga kedjor binder in till KIR3DL2 starkare än andra HLA-klass I molekyler. Skillnaden i denna affinitet med starkare inbindning av HLA-B*27-molekylens fria tunga kedjor och β_2m jämfört med den svagare bindningen av HLA-A3 till KIR3LD2 kan förklara HLA-klass I-molekylernas olika benägenheter att utveckla sjukdom [7-10].

Metoddiskussion

Urvalet i denna studie bestod av sammanlagt 24 DNA-prover, som tidigare analyserats med Olerup kit PCR-SSP av sjukhuspersonalen och därmed HLA-B*27 typats. 12 av dessa prover var från HLA-B*27 negativa friska individer och 12 var från HLA-B*27 positiva patienter som diagnosticerats med AS. Realtids-PCR med LinkSeq kit är en väldigt enkel och tidsbesparande metod. Dessutom är risken för kontaminering väldigt liten, då proverna endast är oskyddade en kort tid vid tillsats av reagenserna. Efter tillsats, skyddas proverna med optiska strips ända tills analysen slutförts. Proverna är därmed skyddade även i PCR-maskinen. Detta är en stor fördel jämfört med PCR-SSP, där proverna står oskyddade under en längre tid, vid till exempel gelelektroforesen. PCR-SSP tar också betydligt längre tid att utföra bland annat på grund av flera analyssteg. Metoden tar flera timmar att slutföra, jämfört med realtids-PCR som endast tar 75 minuter. PCR-SSP kräver ett extra steg för detektion av HLA-B*27 allelen, [16] medan det i realtids-PCR metoden inte krävs något efterarbete för detektion.

Dock erhålls endast information om närvaro eller avsaknad av HLA-B*27 allelen med båda metoderna, vilket tyder på att metoden ändå endast kan användas som screening och för att ytterligare bekräfta diagnos av AS på grund av den stora HLA-B*27 allelvariationen som råder [15-18].

Det finns idag inga diagnostiska laborativa verktyg för att fastställa diagnos av AS i ett tidigt skede, innan kliniska symtom uppträder. Även om HLA-B*27 är starkt kopplat till AS och används som markör, kan enbart ett HLA-B*27 test inte med säkerhet fastställa diagnos. Ett HLA-B*27 positivt test, innebär inte per automatik att individen kommer att utveckla sjukdomen. Omvänt betyder inte ett HLA-B*27 negativt test att personen aldrig kommer att insjukna i AS. Ett HLA-B*27 test kan alltså endast användas som ett komplementverktyg för att ytterligare bekräfta diagnos av AS. Dessutom förekommer stora allelvariationer av HLA-B*27 inom olika etniska grupper och även geografiskt, vilket också försämrar tillförligheten vid diagnosticering med endast ett HLA-B*27 test [1-4, 19,22].

Resultatdiskussion

Samtliga 12 HLA-B*27 positiva prover som tidigare hade analyserats med PCR-SSP av sjukhuspersonalen, stämde överens med de HLA-B*27 positiva proverna. Detsamma gällde de 12 HLA-B*27 negativa proverna. De som hade tolkats som negativa av sjukhuspersonalen, var också negativa efter analys med realtids-PCR. Alltså stämde samtliga resultat överens till 100% med de två olika analysmetoderna.

I en annan studie som tidigare utförts, jämfördes två analyser med realtids-PCR och en metod med PCR-SSP. Även denna studie visade liknande resultat, där sammanlagt 61 prover analyserades. Samtliga 28 HLA-B*27 positiva prover visade positivt med alla tre analysmetoder och övriga 33 HLA-B*27 negativa prover var också negativa i alla tre analysmetoder. Resultaten stämde även här överens till 100% [23].

KONKLUSION

Realtids-PCR är en betydligt mindre avancerad och mer tidseffektiv metod än analys med PCR-SSP. Samma information erhålls med realtids-PCR som vid analys med PCR-SSP, men på kortare tid. Realtids-PCR är en mer specifik metod och kontaminationsrisken är låg, vilket ökar dess tillförlitlighet. Inget efterarbete för detektion av HLA-B*27 allelen krävs. Resultaten av samtliga DNA-prover med båda analysmetoderna stämde överens till 100% och stämde även överens med liknande resultat från en annan studie, vilket indikerar att realtids-metoden fungerar utmärkt som substitut. Metoden kan användas som screening i rutinanalys vid utredning av AS. Endast information om HLA-B*27 allelens närvaro eller frånvaro erhålls. Fler studier bör därför utföras för att hitta ett lämpligt laborativt verktyg, som kan fastställa diagnos av AS i ett tidigt skede innan kliniska symtom uppträder. Eftersom tidigare studier visat koppling mellan AS och HLA-B*27₂ molekylen starka inbindning till KIRs, bör detta undersökas närmare för att ytterligare förstärka teorin om att HLA-B*27 molekylen fria tunga kedja ensamt bidrar till sjukdomsutveckling. Därmed skulle möjligheten att utveckla en ny laborativ metod finnas, för att fastställa diagnos av AS.

REFERENSER

1. Johansson T, (2017) *Ankyloserande Spondylit, AS*.
><https://medibas.se/handboken/kliniska-kapitel/reumatologi/patientinformation/ankyloserande-spondylit/ankyloserande-spondylit-bechterews-sjukdom-oversikt/>< HTML (20180131)
2. Weisman M, (2011) *Ankylosing Spondylitis*. Oxford, EBSCO Publishing.
3. Lin H, Shen GY, (2017) Association of HLA-B27 with ankylosing spondylitis and clinical features of the HLA-B27-associated ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Rheumatology journal*, 37, 1267-80.
4. Oliveira G, Ambrosio-Albuquerque E, Visentainer J, (2016) Application of PCR-SSP method for HLA-B*27 identification as an auxiliary tool for diagnosis of ankylosing spondylitis. *Scielo*, 52, 217-222.
5. Masood T, Nautiyal S, Sailwal S, Sharma N, Sharma V, Singh R, Kushwaha R, (2013) Usage of conventional PCR technology for the detection of HLA-B27 allele: A significant molecular marker of ankylosing spondylitis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28, 189-192.
6. Burke D, (2017) *Human Leukocyte Antigen*.
><https://www.healthline.com/health/hla-b27-antigen#purpose>< HTML (20180131)
7. Bowness P, Brackenbridge S, Chan A, Fernandes R, Hatano H, Kollnberger S, McHugh K, Piper C, Ridley A, Rysnik O, Shaw J, Wong-Baeza I, (2013) KIR3DL2 binds to HLA-B27 dimers and free heavy chains more strongly than other HLA class I and promotes the expansion of T cells in ankylosing spondylitis. *The Journal of immunology*, 190, 3216-24.
8. Bowness P, Giles J, Keidel S, Kleber S, Kollnberger S, Kuroki K, Maenaka K, Marroquin Belaunzaran O, Mchugh K, Payeli SK, Renner C, Ridley A, Thiel M, Shaw J, Wadle A, Wong-Baeza I, (2012) Inhibiting HLA-B27 homodimer-driven immune cell inflammation in spondylarthritis. *Arthritis and rheumatology*, 64, 3139-49.
9. Chen B, He C, Li D, Li J, Tong W, Xu W, Zou Y, (2017) Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Molecular medicine reports*, 15, 1943-51.
10. Aldemir H, Braud VM, Dong T, Hansasuta P, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Rowland-Jones S, (2004) Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *European journal of immunology*, 34, 1673-79.
11. Colbert RA, Layh-Schmitt G, Tran TM, (2013) HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Molecular immunology*, 57, 44-51.

12. Bowness P, Blanco-Gelaz MA, Carette A, Cauli A, Desogus E, Dessole G, Fiedler S, Garau P, Giles J, Hatano H, Hölper S, Ibba V, Kollnberger S, Lanas G, López-Larrea C, Mathieu A, McHugh K, Renner C, Payeli S, Piga M, Porru G, Rysnik O, Shaw J, Vacca A, (2013) The arthritis-associated HLA-B*27:05 allele forms more cell surface B27 dimer and free heavy chain ligands for KIR3DL2 than HLA-B*27:09. *Rheumatology*, 52, 1952-62.
13. Ploegh HL, Stam NJ, Spits H, (1986) Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *The Journal of immunology*, 137, 2299-306.
14. Favino E, Ferrone S, Franco D, Luccarelli G, Perosa F, Prete M, (2003) β_2 -microglobulin-free HLA Class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific Peptide. *The Journal of immunology*, 171, 1918-26.
15. McLaughlin C, Reichenbecher V, (2005) *Biotechnology and Human Disease*. I: Champe P, Harvey R, Ferrier D, (Red.) *Biochemistry*. Philadelphia, Lippincott
16. Brown T, (2016) *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. Manchester, Wiley-Blackwell
17. Saunders NA, (2004) *An Introduction to Real-time PCR*. I: Edwards K, Logan J, Saunders N, (Red.) *Real-time PCR: An essential guide*. London, Horizon
18. Brown T, Lee MA, Leslie DL, Squirrel DJ, (2004) *Homogenous Fluorescent Chemistries for Real-Time PCR*. I: Edwards K, Logan J, Saunders N, (Red.) *Real-time PCR: An essential guide*. London, Horizon bioscience.
19. Khan M, (2009) *Ankylosing Spondylitis*. New York, Oxford University Press.
20. Khan M, (2005) Etiopathogenic role of HLA-B27 alleles in ankylosing spondylitis, *International Journal of Rheumatic Diseases*, 8, 146-153.
21. Duan Z, Fan D, Li G, Liu S, Pan F, Wang S, Wu S, Xu S, Yang T, Ye D, Zeng Z, Zhang L, (2013) Association of HLA-B27 genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide: a meta-analysis. *Modern Rheumatology*, 24, 150-161.
22. Akkoç N, Yarkan H, Kenar G, Khan M, (2017) Ankylosing spondylitis: HLA-B*27-Positive Versus HLA-B*27-Negative Disease. *Current rheumatology reports*, 19, 1-11.
23. Cho HE, Lee GS, Lee HE, Park NY, Seok HJ, (2009) Evaluation of Two Commercial HLA-B27 Real-Time PCR Kits. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29, 589-593.

