

MODUL 2.36 KLINISCHE CHEMIE UND LABORDIAGNOSTIK

TAG 6: HLA-Typisierung

*Diese Anleitung bitte ausdrucken, vor dem Praktikumstag durcharbeiten und mitbringen!
Inhalte der Einführungsvorlesung und der Anleitung werden mündlich geprüft.*

1. Grundlagen:

HLA steht für *human leukocyte antigens*. Es ist die in der Klinik gebräuchliche Bezeichnung für die menschlichen MHC-Moleküle, die in der Hauptvorlesung Immunologie sowie im zugehörigen Skriptum (www.helmberg.at/immunologie.htm) ausführlich besprochen wurden; daher nur eine kurze Zusammenfassung:

MHC (*major histocompatibility complex*) bezeichnet einen Genlocus auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, der für die Gewebeverträglichkeit von Transplantaten entscheidend ist. Die im MHC kodierten Transmembranproteine beinhalten an ihrer Oberfläche eine Tasche, in der kurze Peptide von 8 bis 20 Aminosäuren den vorbeikommenden T-Lymphozyten zur Kontrolle präsentiert werden. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen mit unterschiedlichen Zielsetzungen.

MHC-I-Moleküle (HLA-A, -B und -C-Moleküle, jeweils komplettiert durch β_2 -Mikroglobulin) präsentieren ein Abbild dessen, was in der Zelle synthetisiert wird. Ist eine Zelle von einem Virus befallen, tauchen neben normalen, zellulären Peptiden auch Viruspeptide in den MHC-I-Molekülen auf. Auch wenn eine Zelle maligne entartet, ist es möglich, dass Proteine exprimiert werden, die dem Immunsystem vorher nicht bekannt waren. CD8-T-Zellen erkennen diese Abweichungen und töten die verdächtigen Zellen. Dieser Überwachungsmechanismus ist für alle Zellen sinnvoll und MHC-I-Moleküle werden damit auf allen gekernteten Zellen exprimiert.

MHC-II-Moleküle (HLA-DR, -DP und -DQ-Moleküle) präsentieren eigentlich extrazelluläres Material, das von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und klein gehackt wurde. MHC-II-Expression findet man daher gewöhnlich nur auf jenen Zellen, die extrazelluläres Antigen (z. B. Bakterienbestandteile) präsentieren: Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen. Dadurch werden jene T-Helfer (CD4)-Zellen aktiviert und zur Proliferation gebracht, die diese Peptidantigene erkennen. HLA-DR, DP und DQ-Moleküle bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Kette.

Der MHC ist polymorph. Zwar hat jeder Mensch beispielsweise nur zwei HLA-A-Gene -- eines auf dem mütterlichen, eines auf dem väterlichen Chromosom 6-- doch gibt es in der humanen Spezies mindestens 700 verschiedene Allele für HLA-A --also Genvarianten mit geringfügigen Unterschieden, die vielfach auch zu Unterschieden im kodierten Protein und oft zu Unterschieden in der Bindungsfähigkeit für spezifische Antigen-Peptide führen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass zwei Individuen identische HLA-A-Moleküle tragen. Dasselbe gilt sinngemäß für alle HLA-Moleküle mit Ausnahme von DR α , das bei fast allen Menschen identisch ist. Die Kombination von Polygenie des Individuums (9 Genloci: A, B, C, DR α , DR β , DQ α , DQ β , DP α , DP β) und Polymorphismus der Population (für 8 dieser 9 Loci) führt dazu, dass es extrem unwahrscheinlich ist, zwei Individuen mit identischem MHC zu finden.

Das führt zu Problemen bei der Organtransplantation, da gegen MHC-Moleküle, die dem eigenen Immunsystem unbekannt sind, eine heftige Immunantwort erfolgt— sowohl durch zytotoxische T-Zellen, als auch durch Antikörper.

Unsere Möglichkeiten, die Immunantwort durch Medikamente zu unterdrücken, sind inzwischen so entwickelt, dass der MHC für z. B. Nierentransplantationen nur mehr eine untergeordnete Rolle spielt. Bei allogener Knochenmarktransplantation ist es allerdings unbedingt notwendig, einen Spender zu finden, dessen MHC dem des Empfängers möglichst ähnlich ist.

HLA-Typisierung

Ursprünglich wurde der HLA-Typ serologisch bestimmt. Man versuchte, die sehr ähnlichen Varianten durch möglichst spezifische Antikörper voneinander zu unterscheiden. Für MHC-I-Moleküle führte das zu akzeptablen Ergebnissen. Diese Typisierungssysteme mussten allerdings häufig revidiert werden, da immer mehr Subtypen auftauchten, die von den bis dahin verwendeten Antikörpern nicht unterschieden werden konnten. Die Typen wurden mit einfachen Zahlen bezeichnet: ein Individuum wurde also z. B. als A2, A32, B7, B35 typisiert.

Für MHC-II-Moleküle waren die serologischen Unterscheidungsmöglichkeiten nicht gut genug; man ging daher dazu über, vor einer möglichen Transplantation Spender- und Empfängerlymphozyten in Zellkultur zu mischen, um zu kontrollieren, ob sich eine Immunreaktion ergibt (*mixed lymphocyte reaction*). Man versuchte auch, mit lokalen Standard-Lymphozytenspendern Typisierungssysteme auf dieser Technik aufzubauen. Solche Methoden waren verständlicherweise ein logistischer Alptraum.

Mit dem Fortschritt in der Erforschung des humanen Genoms ergab sich eine neue Möglichkeit: die Verlagerung der Typisierung vom Protein auf das zugrunde liegende Gen. Das bedingt eine veränderte Nomenklatur: Allele werden mit Locusbezeichnung-Stern-Zahlenkombination bezeichnet, wobei die ersten zwei Stellen eine Grobtypisierung mit versuchter Verbindung zur serologischen Nomenklatur darstellen, die nächsten zwei Stellen Subtypen mit Aminosäureunterschieden, die nächsten zwei Stellen Subtypen mit stummen Polymorphismen in der kodierenden Sequenz und die letzten zwei Stellen Subtypen mit Intronpolymorphismen:

z. B.: A*0101 (0101) (stumme Polymorphismen/Intron-P.)
A*0102
A*0103
.....
A*0201

MHC-II Typisierung erfolgt heute routinemäßig auf DNA-Ebene; diese Technik wird zunehmend auch zur MHC-I-Typisierung verwendet. Das Prinzip soll an diesem Praktikumstag am Beispiel der Grobtypisierung eines Probanden am HLA-DQ-Locus verständlich gemacht werden. HLA-DQ wurde aus praktischen Überlegungen gewählt, da er einerseits der am wenigsten polymorphe Locus ist, andererseits relevant für die Empfänglichkeit für häufige Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Coeliakie (DQB1*02).

2. Aufgabenstellung:

Typisierung des HLA-DQ-Locus eines Probanden.
 Folgende Allel-Hauptvarianten sollen getestet werden
 (mit Angabe der Allelfrequenzen in Europa):

DQ α		DQ β	
DQA1*01	44 %	(DQB1*01)	existiert nicht
DQA1*02	14 %	DQB1*02	20 %
DQA1*03	11 %	DQB1*03	33 %
DQA1*04	3 %	DQB1*04	3 %
DQA1*05	27 %	DQB1*05	21 %
DQA1*06	fast 0 %	DQB1*06	23 %

Typisierungssystem: modifiziert nach *Feolo et al., J. Immunol. Methods 258: 65-71 (2001)*

Die Typisierung beruht darauf, dass Sequenz-spezifische Primer (SSP) verwendet werden, die nur dann zu einem PCR-Produkt führen, wenn sie genau passen. Um nicht allzu viele Primer zu benötigen, verwenden die Autoren auf der einen Seite einen unspezifischen Primer, der in mehreren Reaktionen verwendet wird, auf der anderen Seite Primer, die am 3'-Ende bei einer bestimmten Temperatur nur mit einem der Haupttypen, nicht aber mit allen anderen hybridisieren. Für jeden Allel-Haupttyp wird eine PCR angesetzt, von denen am DQ α und DQ β -Locus jeweils nur zwei (im heterozygoten Zustand) oder eine (bei Homozygotie) positiv sein sollten.

Folgende Oligonucleotide (Primer) werden verwendet:

Tabelle 1: Primer				
Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	5' Codon	Spezifität	Fragmentlänge
ALall	GGTGTAACCTGTACCAGT	12	5 DQA1	-
AR1	GTTTTGCCACAGCCATGTTTC	71	3 DQA1 01	178 bp
AR2	AGTCTGTGGAACAGAGGCAACTT	54	3 DQA1 02	128 bp
AR3	ATCTTCTAAATCTGCGGAACAG	57	3 DQA1 03	133 bp
AR4	GGATGTTCAAGTTGTGTTTTGT	76	3 DQA1 04/06	194 bp
AR5	AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC	82	3 DQA1 05	208 bp
BR234	CGCTGCAAGGTCGTGCGGAG	93	3 DQB1 02/03/04	-
BL2	AGAGCGCGTGCGTCTTGTGAG	21	5 DQB1 02	216 bp
BL3	GGTGACGCCGCTGGGGCC	49	5 DQB1 03	132 bp
BL4	CCCGCAGAGGATTTTCGTGTT	(5)	5 DQB1 04	271 bp
BR56	CGACGACGCTCACCTCTCCT	(95)	3 DQB1 05/06	-
BL5	ACGGAGCGCGTGCGGGGTGT	21	5 DQB1 05	237 bp
BL6	AACGGGACGGAGCGCGTGCGT	19	5 DQB1 06	242 bp
KoL	AAAGCCCACAAGAAGCTCAC	(+Kontrolle)	(21-Hydroxylase)	-
KoR	CACCCTGAGAAAGGGAATCA	(+Kontrolle)	(21-Hydroxylase)	498 bp

Fettgedruckt: Intronsequenzen- diese Nukleotide können in der cDNA auf Seite 7-10 **nicht** gefunden werden!

Aus Leukozyten gereinigte DNA eines Probanden wird zur Verfügung gestellt.

3. Praktische Durchführung:

Zeitplan:

früh	spät	
12:00-12:15	16:00-16:15	Einführung: Organisatorisches
12:15-12:45	16:15-16:45	PCR-Ansatz pipettieren
12:45-14:30	16:45-18:30	PCR –Lauf, Gele gießen Eintragen auf Seite 7-10: Primerlokalisation, Position 57 DQ β , kodierende/stumme Polymorphismen Prüfung
14:30-15:15	18:30-19:15	Gele laden, Elektrophorese
15:15-15:45	19:15-19:45	Foto, Interpretation

- Bitte begeben Sie sich in den voreingeteilten Vierergruppen an die gekennzeichneten Arbeitsplätze. Dort finden Sie alle benötigten Reagenzien mit Ausnahme der Primer.
- Pro StudentIn wird ein Allel getestet oder eine Positivkontrolle angesetzt. Bitte einigen Sie sich innerhalb Ihrer Vierergruppe über Ihre Zuordnung a, b, c oder d. Entnehmen Sie dann Ihre Primerkombination dem Pipettierplan (Tabelle 2, Seite 6), und holen Sie die benötigten Primer bei der "Primerbank". Bitte holen Sie pro Vierergruppe nur ein Röhrchen von mehrfach benötigten Primern wie DQALall, DQB234 oder DQB56.
- Pipettieren Sie jeweils Ihre Reaktion nach dem Pipettierplan in ein kleines Eppendorf-Röhrchen, das Sie zuerst am Deckel mit Ihrem Code (z. B. 5c) beschriften. Die KollegInnen helfen, die Übersicht zu bewahren. Beachten Sie, dass jede(r) eine andere Primerkombination verwendet; die anderen Bestandteile des Ansatzes sind für alle vier gleich.
Einige der Reagenzien sind empfindlich und teuer. Daher stellen wir sie in knappen Aliquots zur Verfügung. Die Mengen genügen für vier Reaktionen, mit wenig Überschuss. Sollten Sie sich verpipettieren, kann es sein, dass ein Aliquot ausgeht. In diesem Fall können Sie nach Rücksprache Nachschub bei der Primerbank holen. Um nicht an Aktivität/Integrität zu verlieren, sollten besonders Taq-Polymerase, Desoxyribonucleotid-Triphosphate (dNTPs) und Probanden-DNA immer auf Eis stehen. Stellen Sie auch Ihren fertig pipettierten Ansatz inzwischen auf Eis.
- Wenn alle Ansätze fertig sind, werden Kontrollen und DQ α -Ansätze in die kleinen Löcher von Thermocycler 1, die DQ β -Ansätze in jene von Thermocycler 2 gestellt. Folgende Programme werden mit Hilfe der BetreuerInnen gestartet:

Thermocycler 1: Kontrollen und DQ α			Thermocycler 2: DQ β		
Temperatur	Zeit		Temperatur	Zeit	
95°C	1 min		95°C	1 min	
95°C	20 sec	x35	95°C	20 sec	x35
53°C	30 sec		65°C	30 sec	
72°C	20 sec		72°C	20 sec	
72°C	1 min		72°C	1 min	
4 °C	bis Gel		4 °C	bis Gel	

5. StudentInnen 1a, 4a, 7a, 10a gießen mit Hilfe der Betreuer die Gele (1% Agarose in Boratpuffer, mit etwas Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Dieser lagert sich an die DNA-Fragmente an, sodass diese nachher auf einer UV-Lampe als orange fluoreszierende Banden sichtbar gemacht werden können. ACHTUNG! Blaue Handschuhe verwenden, damit das mutagene Ethidiumbromid nicht in Kontakt mit der Haut kommt). Wir haben die Agarose schon vorher aufgekocht und warm gestellt.
6. Auf den letzten vier Seiten dieser Anleitung finden Sie die Nukleotidsequenzen der getesteten Allele. Lokalisieren und markieren Sie in diesen Sequenzen in Ihrer Vierergruppe **alle** Primer aus Tabelle 1 (außer KoL und KoR), um das Typisierungssystem wirklich zu verstehen. Diskutieren Sie in der Vierergruppe, wie gut die Spezifität der jeweiligen Reaktion abgesichert ist. Welches andere Allel könnte am ehesten falsch positiv werden?
7. Die Position 57 von DQ β spielt eine Rolle für das Risiko, an Diabetes mellitus Typ I zu erkranken. Bestimmen Sie mit Hilfe des genetischen Codes (Schema liegt auf), welche Aminosäure an Position 57 der dargestellten Allele codiert ist!
8. Suchen und markieren Sie sechs weitere polymorphe Codons im Rest des Moleküls: drei kodierende und drei stumme Polymorphismen! Inwieweit kann das Bestimmungssystem eine Aussage über diese Positionen machen? Kommen Sie als Vierergruppe mit den Ergebnissen der Punkte 6., 7. und 8. zu den BetreuerInnen zur Prüfung. Auch über die Inhalte der Einführungsvorlesung müssen Sie hier informiert sein!
9. Kaffeepause! -bis die Thermocycler mit ihrer Arbeit fertig sind (Zeitpunkt wird angesagt).
10. StudentInnen 1a, 4a, 7a, 10a positionieren mit Hilfe der Betreuer ihre Gele in den Gelkammern und füllen die Kammer mit Boratpuffer. Sie laden zunächst 5 μ l bereitgestellten *size marker* in *lane 1*, dann 10 μ l ihres Ansatzes (Positivkontrolle) in *lane 2*. Verwenden Sie dazu nicht die bis dahin benutzten Pipetten, sondern die speziell markierte "Post-PCR-Pipette", um die anderen Pipetten nicht mit PCR-Produkt zu kontaminieren.
11. Alle weiteren StudentInnen laden in numerisch-alphabetischer Reihenfolge 10 μ l ihres Ansatzes in die jeweils nächste *lane*. Bitte Post-PCR-Pipette verwenden!
12. Die DNA-Fragmente werden für 15 min bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt.
13. BetreuerIn nimmt die Gele zum Dokumentationssystem im 2. Stock und macht dort Fotos, falls die Banden schwach ausgefallen sind.
14. Ergebnis wird im großen Kreis gemeinsam mit den BetreuerInnen interpretiert.
15. Anschließend können die Gele im Dunkelraum auf der UV-Lampe angesehen werden. ACHTUNG! Nicht direkt in die UV-Lampe sehen (Gefahr der aktinischen Keratopathie) sondern immer nur durch die transparente Plastikabdeckung!

Abschlussbemerkung: Aus praktischen Gründen können wir Sie nur mit dem Prinzip einer HLA-Bestimmung vertraut machen. In der Realität sind wesentlich strengere Regeln einzuhalten, um z. B. Kontaminationen zu vermeiden: Trennung von Prä-PCR- und Post-PCR-Räumlichkeiten und -Geräten, Pipettieren der Ansätze nur in Sterilwerkbänken mit Handschuhen, Mund- und Körperschutz etc.

Tabelle 2: Pipettierplan

DQ α -Locus	Farbkodierung	Volumen (μ l)	StudentIn (Gruppe; a-d) / Allel und Primer					
			1a	1b	1c	1d	2a	2b
			4a	4b	4c	4d	5a	5b
			7a	7b	7c	7d	8a	8b
			10a	10b	10c	10d		
			Kontrolle	DQA1*01	DQA1*02	DQA1*03	DQA1*04/6	DQA1*05
"nuclease-free water"	klar, groß	31						
5x-PCR-Puffer	HELLBLAU	10						
dNTP (5 mM)	GRÜN	2						
Primer1 (5 μ M)	GELB	2	KoL	ALall	ALall	ALall	ALall	ALall
Primer2 (5 μ M)	GELB	2	KoR	AR1	AR2	AR3	AR4/6	AR5
Probanden-DNA (25 ng/ μ l)	ROT	2						
Taq-Polymerase	ORANGE	1						

DQ β -Locus	Farbkodierung	Volumen (μ l)	StudentIn (Gruppe; a-d) / Allel und Primer					
			2c	2d	3a	3b	3c	3d
			5c	5d	6a	6b	6c	6d
			8c	8d	9a	9b	9c	9d
			Kontrolle	DQB1*02	DQB1*03	DQB1 *04	DQB1 * 05	DQB1*06
"nuclease-free water"	klar, groß	31						
5x-PCR-Puffer	HELLBLAU	10						
dNTP (5 mM)	GRÜN	2						
Primer1 (5 μ M)	BLAU	2	KoL	BL2	BL3	BL4	BL5	BL6
Primer2 (5 μ M)	BLAU	2	KoR	BR234	BR234	BR234	BR56	BR56
Probanden-DNA (25 ng/ μ l)	ROT	2						
Taq-Polymerase	ORANGE	1						

DQA

	Exon1																Exon1	
Position	-23	-22	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6
DQA1*010101	ATG	ATC	CTA	AAC	AAA	GCT	CTG	CTG	CTG	GGG	GCC	CTC	GCT	CTG	ACC	ACC	GTG	ATG
DQA1*0201	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---
DQA1*030101	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	--C	---	---	---	---
DQA1*050101	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	--T	--C	---	---	---	---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	--C	---	---	---	---

	Exon1				Exon1] [Exon2												Exon2	
Position	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
DQA1*010101	AGC	CCC	TGT	GGA	GGT	GAA	GAC	ATT	GTG	GCT	GAC	CAC	GTT	GCC	TCT	TGT	GGT	GTA
DQA1*0201	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-AC	---
DQA1*030101	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-AC	---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---
DQA1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---

	Exon2																Exon2	
Position	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
DQA1*010101	AAC	TTG	TAC	CAG	TTT	TAC	GGT	CCC	TCT	GGC	CAG	TAC	ACC	CAT	GAA	TTT	GAT	GGA
DQA1*0201	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---
DQA1*030101	---	---	---	---	-C-	--T	---	---	---	--G	---	---	-G-	---	---	---	---	---
DQA1*040101	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*050101	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*060101	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---

	Exon2																Exon2	
Position	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
DQA1*010101	GAT	GAG	GAG	TTC	TAC	GTG	GAC	CTG	GAG	AGG	AAG	GAG	ACT	GCC	TGG	CGG	TGG	CCT
DQA1*0201	--C	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	AA-	-T-
DQA1*030101	--C	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	-A-	-T-	---
DQA1*040101	--C	---	C--	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	-T-	---	T-T	-T-	---
DQA1*050101	---	---	C--	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	-T-	---	T-T	-T-	---
DQA1*060101	--C	---	C--	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	-T-	---	T-T	-T-	---

	Exon2																Exon2	
Position	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
DQA1*010101	GAG	TTC	AGC	AAA	TTT	GGA	GGT	TTT	GAC	CCG	CAG	GGT	GCA	CTG	AGA	AAC	ATG	GCT
DQA1*0201	CT-	---	CA-	-G-	C--	A--	...	---	---	---	---	--A	TT-	---	---	-C-	---	--C
DQA1*030101	CT-	---	C--	-G-	---	A--	A-A	---	---	---	---	--A	TT-	---	---	-C-	---	--C
DQA1*040101	-TT	C--	--A	C--	---	A--	...	---	---	---	---	--A	TT-	---	---	-C-	---	--C
DQA1*050101	-TT	C--	--A	C--	---	A--	...	---	---	---	---	--A	TT-	---	---	-C-	---	--C
DQA1*060101	-TT	C--	--A	C--	---	A--	...	---	---	---	---	--A	TT-	---	---	-C-	---	--C

	Exon2																Exon2	
Position	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
DQA1*010101	GTG	GCA	AAA	CAC	AAC	TTG	AAC	ATC	ATG	ATT	AAA	CGC	TAC	AAC	TCT	ACC	GCT	GCT
DQA1*0201	---	CT-	---	--T	---	---	---	---	C--	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---
DQA1*030101	---	CT-	---	--T	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---
DQA1*040101	---	A--	---	---	---	---	---	---	C--	---	---	---	---	-C-	---	---	--T	---
DQA1*050101	--C	CT-	---	--T	---	---	---	-GT	C--	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---
DQA1*060101	---	A--	---	---	---	---	---	---	C--	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---

	Exon2] [Exon3												Exon3					
Position	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
DQA1*010101	ACC	AAT	GAG	GTT	CCT	GAG	GTC	ACA	GTG	TTT	TCC	AAG	TCT	CCC	GTG	ACA	CTG	GGT
DQA1*0201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---
DQA1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---

	Exon3																	Exon3
Position	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
DQA1*010101	CAG	CCC	AAC	ACC	CTC	ATT	TGT	CTT	GTG	GAC	AAC	ATC	TTT	CCT	CCT	GTG	GTC	AAC
DQA1*0201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*030101	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*050101	---	---	---	-T-	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon3																	Exon3
Position	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
DQA1*010101	ATC	ACA	TGG	CTG	AGC	AAT	GGG	CAG	TCA	GTC	ACA	GAA	GGT	GTT	TCT	GAG	ACC	AGC
DQA1*0201	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*030101	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon3																	Exon3
Position	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
DQA1*010101	TTC	CTC	TCC	AAG	AGT	GAT	CAT	TCC	TTC	TTC	AAG	ATC	AGT	TAC	CTC	ACC	TTC	CTC
DQA1*0201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon3																	Exon3
Position	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
DQA1*010101	CCT	TCT	GCT	GAT	GAG	ATT	TAT	GAC	TGC	AAG	GTG	GAG	CAC	TGG	GGC	CTG	GAC	CAG
DQA1*0201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T---
DQA1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G---
DQA1*050101	---	---	---	---	-G	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G---

	Exon3																	Exon3] [Exon4		Exon4
Position	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193		
DQA1*010101	CCT	CTT	CTG	AAA	CAC	TGG	GAG	CCT	GAG	ATT	CCA	GCC	CCT	ATG	TCA	GAG	CTC	ACA		
DQA1*0201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
DQA1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
DQA1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		

	Exon4																	Exon4
Position	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
DQA1*010101	GAG	ACT	GTG	GTC	TGC	GCC	CTG	GGG	TTG	TCT	GTG	GGC	CTC	GTG	GGC	ATT	GTG	GTG
DQA1*0201	---	---	---	---	---	-T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	---	---	---	---	---	---	---

	Exon4																	Exon4
Position	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229
DQA1*010101	GGC	ACT	GTC	TTC	ATC	ATC	CAA	GGC	CTG	CGT	TCA	GTT	GGT	GCT	TCC	AGA	CAC	CAA
DQA1*0201	---	-G	---	---	-G	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*030101	---	-G	---	---	-G	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*040101	---	---	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*050101	---	---	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQA1*060101	---	---	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon4				Exon4]			
Position	230	231	232	233	230	231	232	233
DQA1*010101	GGG	CCA	TTG	TGA	GGG	CCA	TTG	TGA
DQA1*0201	---	---	-C	---	---	---	-C	---
DQA1*030101	---	---	-C	---	---	---	-C	---
DQA1*040101	---	---	-C	---	---	---	-C	---
DQA1*050101	---	---	-C	---	---	---	-C	---
DQA1*060101	---	---	-C	---	---	---	-C	---

DQB

	Exon1																Exon1	
Position	-32	-31	-30	-29	-28	-27	-26	-25	-24	-23	-22	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15
DQB1*020101	ATG	TCT	TGG	AAA	AAG	GCT	TTG	CGG	ATC	CCC	GGA	GGC	CTT	CGG	GCA	GCA	ACT	GTG
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---T
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon1																Exon1	
Position	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4
DQB1*020101	ACC	TTG	ATG	CTG	TCG	ATG	CTG	AGC	ACC	CCA	GTG	GCT	GAG	GGC	AGA	GAC	TCT	CCC
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

] [Exon2

	Exon2																Exon2	
Position	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
DQB1*020101	GAG	GAT	TTC	GTG	TAC	CAG	TTT	AAG	GGC	ATG	TGC	TAC	TTC	ACC	AAC	GGG	ACA	GAG
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Exon2

	Exon2																Exon2	
Position	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
DQB1*020101	CGC	GTG	CGT	CTT	GTG	AGC	AGA	AGC	ATC	TAT	AAC	CGA	GAA	GAG	ATC	GTG	CGC	TTC
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Exon2

	Exon2																Exon2	
Position	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
DQB1*020101	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	GAG	TTC	CGG	GCG	GTG	ACG	CTG	CTG	GGG	CTG	CCT	GCC	GCC
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Exon2

	Exon2																Exon2	
Position	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
DQB1*020101	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	ATC	CTG	GAG	AGG	AAA	CGG	GCG	GCG	GTG	GAC
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Exon2

	Exon2																Exon2	
Position	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
DQB1*020101	AGG	GTG	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	CAG	TTG	GAG	CTC	CGC	ACG	ACC	TTG	CAG	CGG	CGA
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

] [Exon3

	Exon3																Exon3	
Position	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
DQB1*020101	GTG	GAG	CCC	ACA	GTG	ACC	ATC	TCC	CCA	TCC	AGG	ACA	GAG	GCC	CTC	AAC	CAC	CAC
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon3																Exon3	
Position	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
DQB1*020101	AAC	CTG	CTG	GTC	TGC	TCG	GTG	ACA	GAT	TTC	TAT	CCA	GCC	CAG	ATC	AAA	GTC	CGG
DQB1*030101	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	AG-	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---

	Exon3																Exon3	
Position	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
DQB1*020101	TGG	TTT	CGG	AAT	GAC	CAG	GAG	GAG	ACA	GCT	GGC	GTT	GTG	TCC	ACC	CCC	CTT	ATT
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A-C	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	--C	---
DQB1*0602	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon3																Exon3	
Position	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166
DQB1*020101	AGG	AAT	GGT	GAC	TGG	ACC	TTC	CAG	ATC	CTG	GTG	ATG	CTG	GAA	ATG	ACT	CCC	CAG
DQB1*030101	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0401	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*050101	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon3																Exon3	
Position	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184
DQB1*020101	CGT	GGA	GAC	GTC	TAC	ACC	TGC	CAC	GTG	GAG	CAC	CCC	AGC	CTC	CAG	AGC	CCC	ATC
DQB1*030101	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---	---
DQB1*050101	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DQB1*0602	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	Exon3																Exon3] [Exon4		Exon4
Position	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	
DQB1*020101	ACC	GTG	GAG	TGG	CGG	GCT	CAA	TCT	GAA	TCT	GCC	CAG	AGC	AAG	ATG	CTG	AGT	GGC	
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DQB1*0401	-T-	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DQB1*050101	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DQB1*0602	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

	Exon4																Exon4	
Position	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
DQB1*020101	ATT	GGA	GGC	TTC	GTG	CTG	GGG	CTG	ATC	TTC	CTC	GGG	CTG	GGC	CTT	ATC	ATC	CAT
DQB1*030101	---	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---
DQB1*050101	G--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	--T	---	---	---	---	-G-
DQB1*0602	G--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	-G-

	Exon4				Exon4] [Exon5								Exon5] [Exon6				Exon6]	
Position	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238
DQB1*020101	CAC	AGG	AGT	CAG	AAA	G**	**	**	**	**	**	**	**	*GG	CTC	CTG	CAC	TGA
DQB1*030101	---	---	---	---	---	-**	**	**	**	**	**	**	**	*--	---	---	---	---
DQB1*0401	---	---	---	---	---	-**	**	**	**	**	**	**	**	*--	---	---	---	---
DQB1*050101	--A	---	---	-G-	---	-**	**	**	**	**	**	**	**	*--	--T	---	---	---
DQB1*0602	--A	---	---	---	---	-**	**	**	**	**	**	**	**	*--	--T	---	---	---