

## **Propuesta de Tipaje HLA y KIR NGS en Stanford University de un grupo de 200-300 Individuos Sanos procedentes de diferentes Centros de Transfusión / Laboratorios de Inmunología de España**

El Prof. Marcelo Fernández-Viña y su colaborador Gonzalo Montero Martín, se han puesto en contacto con nosotros para solicitar nuestra colaboración en el proyecto que detallan en su correo. Por favor, respondedme a la mayor brevedad posible comunicando vuestra opinión sobre este tema, si os interesa participar en el proyecto y cualquier sugerencia que se os ocurra en relación al mismo.

A la espera de vuestras prontas noticias, recibid un saludo,

Dolores Planelles.

Estimados miembros del GETHIT así como otros potenciales colaboradores españoles interesados en esta propuesta (inicial y abierta a modificaciones/aclaraciones) que a continuación presentamos en este mismo email.

Somos el Profesor Marcelo Fernandez-Viña, Ph.D. y el estudiante de Doctorado Gonzalo Montero Martin (por la Universidad Complutense de Madrid, Ftad de Medicina, Investigación Biomedica), del Stanford Blood Center en la Universidad de Stanford (CA, EEUU).

A traves de este email queriamos consultaros la posibilidad de colaborar con el GETHIT en el estudio de la distribución de alelos HLA y KIR mediante Tipaje NGS en alta resolución (hasta el octavo dígito) de individuos sanos de España.

Estamos interesados en poder obtener un set de cientos de muestras de individuos sanos de Espana a traves de la participacion conjunta de varios Centros de Transfusión y Dptos de Inmunologia (que estuvieran interesados en participar) de los que hacer tipaje HLA NGS de alta resolución (200-300 individuos). Y por otro lado tambien hacer tipaje KIR NGS de un grupo reducido (96 individuos) de muestras dentro de este mismo set.

Con este estudio de HLA con tecnología NGS, y extensible a KIR NGS, buscaríamos dar una primera y novedosa descripción de distribución alélica HLA, y de KIR, con un nivel de resolución máxima (octavo dígito) y con la mínima ambigüedad descrita hasta la actualidad y de esta magnitud muestral en población española.

Donde sería interesante además, si fuera posible, poder comparar estos datos de HLA NGS Stanford con los que ya se dispusieran para las mismas muestras de HLA tipaje por Sanger o por NGS (aunque solo fuera hasta el cuarto dígito) que tuvieran cada uno de los centros españoles participantes. Así como para KIR NGS, comparándolo respecto al KIR gene content data obtenida mediante técnicas SSP y/o SSO (Artículo adjunto escrito por GETHIT-SEI KIR grupo) en cada centro.

Como entendemos, contactando con vosotros, esta propuesta de HLA NGS podría ser convenientemente valorada y llegar al resto de potenciales colaboradores (ver lista completa sugerida al final de este email).

En relación a KIR NGS, entendemos que Carlos Vilches, experto en el campo de KIR, nos puede orientar del mejor modo posible en este sentido.

Del mismo, contactamos en este mismo email con Jose Luis Caro ya que (en representación del Banc de Sang i Teixits, Barcelona) el ya nos ha mostrado interés en poder participar en esta colaboración que proponemos aquí.

Por tanto, creemos que a través de vosotros esta propuesta podría llegar al resto de Centros de Transfusión y Dptos de Inmunología de España que quisieran involucrarse en esta nuestra propuesta de colaboración.

A continuación os describimos los detalles de nuestra propuesta:

**"Estudio Distribución Alélica HLA (200-300 muestras) y KIR (96 muestras) por NGS en población sana de España"**

## **COMUNICADO INICIAL DE PROPUESTA DE COLABORACION A COMPARTIR CON POTENCIALES COLABORADORES**

El grupo en Stanford Blood Center-Stanford University de Investigación en Inmunogenética-HLA propone realizar el estudio de los polimorfismos de genes HLA-A, -B, -C, -DPA1, -DPB1, -DQA1, -DQB1, -DRB1, -DRB3/4/5 de una cohorte española de individuos estrictamente sanos (del orden de n=200-300 individuos en total) de muestras procedentes de varios Centros de Transfusión/Inmunología de España.

Además este estudio, podría hacerse extensible a polimorfismos de genes KIR también mediante otra plataforma NGS en paralelo a un número reducido (n=96) dentro de este mismo set de muestras de individuos sanos.

Con este estudio de HLA con tecnología NGS, y extensible a KIR NGS, buscaríamos dar una primera y novedosa descripción de distribución alélica HLA (y de KIR) con un nivel de resolución máxima (octavo dígito) y con la mínima ambigüedad descrita hasta la actualidad y de esta magnitud muestral en población española.

Donde sería interesante además, si fuera posible, poder comparar estos datos de HLA y KIR NGS con los que ya se dispusieran para las mismas muestras de HLA tipaje por Sanger o por NGS (solo hasta el cuarto dígito) que tuvieran cada uno de los centros españoles participantes. Así como para KIR NGS, comparándolo respecto al KIR gene content data obtenida mediante técnicas SSP y/o SSO (Artículo adjunto escrito por GETHIT-SEI KIR grupo).

### **HLA-NGS**

Se llevaría a cabo el tipaje molecular de alta resolución HLA empleando una novedosa tecnología de secuenciación masiva (NGS) y su respectivo posterior análisis bioinformático [Wang, C., Krishnakumar, S., Wilhelmy, J., Babrzadeh, F., Stepanyan, L., Su, L. F., ... & Mindrinos, M. (2012). High-throughput, high-fidelity HLA genotyping with deep sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8676-8681]. Esta tecnología NGS permite secuenciar toda la región de exones y la mayoría de la región de intrones de estos genes HLA. Y determinar así los 2 alelos de cada gen

**HLA con una máxima resolución (hasta el octavo dígito) y con la mínima ambigüedad posible lograda hasta la actualidad en el campo de la histocompatibilidad.**

**Este tipaje de HLA estaría liderado por Marcelo Fernández Viña, Ph.D. [<https://med.stanford.edu/profiles/marcelo-fernandez-vina>] y sería elaborado por el estudiante de Doctorado Gonzalo Montero Martin dentro de este grupo de Investigación en Inmunogenética-HLA de Stanford Blood Center-Stanford University.**

**Este grupo de Investigación en Inmunogenética-HLA de Stanford University asumiría los costes asociados a la realización de este tipaje y análisis HLA NGS de todas estas muestras (200-300), así como los gastos de envío de muestras biológicas desde España a EEUU.**

**Así, necesitaríamos que con la cooperación y coordinación de diferentes Centros de Transfusión/Inmunología se nos suministrara alícuotas de muestras de dsDNA genómico en un volumen de 200-250 uL (microlitros) y a una concentración final de 11-13 ng/uL (nanogramos/microlitro). Con esta cantidad de material genómico seríamos capaces de obtener todos estos datos de tipaje molecular en alta resolución de genes HLA.**

## **KIR-NGS**

**Podemos darles la siguiente información preliminar:**

**Se llevaría a cabo el tipaje molecular de alta resolución KIR empleando una novedosa tecnología de secuenciación masiva (NGS) y su respectivo posterior análisis bioinformático [Norman, P. J., Hollenbach, J. A., Nemat-Gorgani, N., Marin, W. M., Norberg, S. J., Ashouri, E., ... & Oksenberg, J. R. (2016). *Defining KIR and HLA class I genotypes at highest resolution via high-throughput sequencing. The American Journal of Human Genetics*, 99(2), 375-391.]. Esta tecnología NGS permite determinar los alelos de ~10 genes KIR además de proporcionar el KIR gene content y todo con la mínima ambigüedad posible lograda hasta la actualidad en el campo de la histocompatibilidad.**

Este tipaje de KIR estaría liderado por Paul Norman, Ph.D. [<http://web.stanford.edu/group/parhamlab/members/paul-norman/>] y sería elaborado por el estudiante de Doctorado Gonzalo Montero Martin dentro de este grupo de KIR de Stanford University.

Este grupo de KIR de Stanford University y/o este grupo de Investigación en Inmunogenética-HLA de Stanford University intentaría/n buscar todas las posibilidades para poder asumir los costes asociados a la realización de este tipaje y análisis KIR NGS de todas estas muestras (96), así como los gastos de envío de muestras biológicas desde España a EEUU.

Así, necesitaríamos que con la cooperación y coordinación de diferentes Centros de Transfusión/Inmunología se nos suministrara alícuotas de muestras de dsDNA genómico en un volumen de 15-20 uL (microlitros) y a una concentración final de 100-110 ng/uL (nanogramos/microlitro). Con esta cantidad de material genómico seríamos capaces de obtener todos estos datos de tipaje molecular en alta resolución de genes KIR.

### **HLA-NGS y KIR-NGS**

Solo requeriríamos un sistema de identificación “de-decodificada” (haríamos un estudio en “ciego”) para la identificación de muestras. En todo momento, solo los coordinadores de los respectivos Centros de Transfusión/Inmunología dispondrían de la información clínica y personal de estos sujetos controles sanos y su conexión con este estudio de HLA/KIR. Nosotros únicamente queremos aportar los datos de HLA/KIR al estudio. Y ver la forma de analizar estos polimorfismos HLA/KIR en conjunto con todos los colaboradores implicados del GETHIT.

Siendo conscientes de todos los esfuerzos e importantes contribuciones desde todas las entidades/grupos que estuviesen implicados. Planteamos un “EQUIVALENT CONTRIBUTION” “en todas las publicaciones que surgiesen a partir de estos estudios HLA/KIR. Cabe indicar que, adicionalmente, Gonzalo Montero Martin necesitaría escribir su Tesis Doctoral (para la Universidad Complutense de Madrid (España), donde él está inscrito) en base, en parte, a los resultados y publicaciones generados a través de esta colaboración entre Centros de Transfusión/Inmunología Espanoles y este grupo de Stanford University HLA/KIR.

Si la colección y envío de este número total de muestras de estos sujetos controles sanos pudiera producirse en Febrero-Marzo de 2017. En un periodo máximo de 2 meses desde la recepción de muestras en nuestro lab en Stanford, podríamos tener el tipaje HLA de todas las muestras y resultados de análisis estadísticos de HLA de todas estas muestras. Ya que en nuestro laboratorio de Stanford podemos hacer runs de tipaje HLA de hasta 384 muestras a la vez en nuestro protocolo de HLA-NGS de high-throughput y posteriormente en el secuenciador Illumina NextSeq. Contamos también con todas las herramientas bioinformáticas para el tipaje de HLA.

E igualmente para los respectivos análisis estadísticos, en los que el GETHIT estaría totalmente invitado a poder participar de modo activo.

De un modo similar se lograría lo mismo para tipaje NGS de genes KIR.

**Aspectos importantes a considerar respecto a la Colección de muestras (y datos HLA, KIR) de dsDNA desde Centros de Transfusión y/o Dptos de Inmunología de toda la región española:**

-Plazo deseable de envío de todas estas muestras: Finales de Febrero-Primera semana de Marzo 2017. Si además se buscara presentar estos datos en el GETHIT SEI de Zaragoza Mayo 2017 y/o en el IHIW de Septiembre de 2017.

-Obtener 20-40 muestras por centro (contar con al menos 10 centros de España, intentando que se abarque lo más posible toda la geografía del territorio español) . Realizar convenientemente los trámites burocráticos (justificación de investigación, consentimiento de sujetos de estudio, etc...) asociados a los respectivos Biobancos, etc...

-La selección de estas 20-40 muestras por cada centro, sugerimos que se hiciera asegurando que se tienen:

\*Los datos HLA y KIR (de aquellas que formen también parte del set final de 96 muestras) de baja resolución.

\*Que representen la mayor diversidad posible de la población de esa region donde se localiza el centro de transfusion o de inmunología. Por ejemplo, evitando que haya familiares en esas muestras. O, dentro de una misma comunidad autonoma, intentando tener un numero equivalente de individuos por cada provincia dentro de esa misma comunidad autónoma. Mismo numero de mujeres y hombres, etc...

**-Obtener directamente muestras de dsDNA extraído de individuos clínicamente sanos. En principio, donantes (de órganos, tejidos, sangre o del registro de donantes de medula ósea) sanos que donan en estos centros.**

**-Obtener estos volúmenes y concentraciones de muestras de dsDNA que se indican previamente para cada plataforma NGS (HLA por un lado, y por otro lado KIR).**

**-Centralizar en un único centro de Espana todas las respectivas muestras de dsDNA tanto para HLA (200-300 muestras, 200-250 uL @ 11-13 ng/uL) como para KIR (96 muestras, 15-20 uL @ 100-110 ng/uL) procedentes de los diferentes centros de Espana. Y desde este sitio centralizador realizar un único envío de todas estas muestras a:**

**Marcelo Fernandez-Vina/Spain Research**

**Stanford Medical School Blood Center**

**3373 Hillview Ave, Palo Alto, CA, 94304**

**USA**

**Esta misma institución centralizadora en Espana podría hacerse cargo (con el permiso y acuerdo de los diferentes centros de procedencia) de coleccionar los datos KIR y HLA de baja resolución de las muestras coleccionadas.**

**Muchas gracias por su atención e interés.**

**Atentamente,**

**Marcelo A. Fernández-Viña, Ph.D.**

Professor

Department of Pathology

Stanford School of Medicine

Director

Histocompatibility, Immunogenetics, and Disease

Profiling Laboratory

Stanford Medical School Blood Center

3373 Hillview Ave, Palo Alto, CA, 94304

650-723-7968

[marcelof@stanford.edu](mailto:marcelof@stanford.edu)

**Gonzalo Montero Martin**

Ph.D. Student (Ftad. de Medicina, UCM, Madrid, Spain)

Department of Pathology

Stanford School of Medicine

Histocompatibility, Immunogenetics & Disease Profiling Laboratory-Stanford Blood Center

3155 Porter Dr, Palo Alto, CA 94304

650-736-1537 office | 909-238-6422 cell



[gmonter2@stanford.edu](mailto:gmonter2@stanford.edu)

## Lista Propuesta de Colaboradores de Espana:

Planelles D<sup>1</sup>, Vilches C<sup>2</sup>, González-Escribano F<sup>3</sup>, Muro M<sup>4</sup>, González-Fernández R<sup>5</sup>, Sánchez F<sup>6</sup>, Gonzalo Ocejo J<sup>7</sup>, Eiras A<sup>8</sup>, Caro JL<sup>9</sup>, Palou E<sup>10</sup>, Campillo JA<sup>4</sup>, de Juan MD<sup>11</sup>, Montes O<sup>12</sup>, Balas A<sup>13</sup>, Marín L<sup>14</sup>, Torío A<sup>15</sup>, Fernández-Arquero M<sup>16</sup>, González-Roiz C<sup>17</sup>, López-Vázquez A<sup>18</sup>, Cisneros E<sup>2</sup>, Abad-Molina C<sup>3</sup>, López R<sup>6</sup>, Abad-Alastruey ML<sup>8</sup>, Serra C<sup>10</sup>, García-Alonso AM<sup>4</sup>, Vicario JL<sup>13</sup>.

### Author information

- <sup>1</sup>Histocompatibility, Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, Valencia, Spain. Electronic address: [planelles\\_dol@gva.es](mailto:planelles_dol@gva.es).
- <sup>2</sup>Immunogenetics and Histocompatibility, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Madrid, Spain.
- <sup>3</sup>Immunology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.
- <sup>4</sup>Immunology, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain.
- <sup>5</sup>Immunology, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain.
- <sup>6</sup>Immunology, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- <sup>7</sup>Immunology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain.
- <sup>8</sup>Molecular Biology and Histocompatibility, Centro de Transfusión de Galicia, Santiago de Compostela, Spain.
- <sup>9</sup>Histocompatibility and Immunogenetics, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain.
- <sup>10</sup>Immunology, Hospital Clínic Universitari, Barcelona, Spain.
- <sup>11</sup>Immunology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain.
- <sup>12</sup>Immunology, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- <sup>13</sup>Histocompatibility, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain.

- <sup>14</sup>Molecular Biology-Hematology, Hospital Clínico Universitario, Salamanca, Spain.
- <sup>15</sup>Immunology, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain.
- <sup>16</sup>Clinical Immunology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain.
- <sup>17</sup>Immunology and Genetics, Hospital Infanta Cristina, Badajoz, Spain.
- <sup>18</sup>Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain.

**y tambien buscamos colaborar con**

**Martinez Laso J.,**

**Immunology, Complejo Hospitalario Insular Materno-Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain**

**(CIERRE DEL COMUNICADO)**

Muchas gracias por vuestra atención a nuestro email y esperamos vuestra respuesta sobre nuestra proposición de colaboración.

Un cordial saludo,

**Gonzalo Montero Martin**

Stanford Blood Center

Histocompatibility, Immunogenetics & Disease Profiling Laboratory

3155 Porter Dr, Palo Alto, CA 94304

650-736-1537 office | 909-238-6422 cell

Email: [gmonter2@stanford.edu](mailto:gmonter2@stanford.edu)

Shipping address: 3373 Hillview Avenue, Palo Alto, CA 94304

bloodcenter.stanford.edu | ***Give blood for life!***

**CONFIDENTIALITY NOTICE:** Information contained in this message and any attachments are intended only for the addressee(s). If you believe that you have received this message in error, please notify the sender immediately by return electronic mail, and please delete it without further review, disclosure, or copying.