行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

計畫名稱：研究克雷白氏肺炎桿菌是否經由形成 HLA-B27 錯誤摺疊構型而引發僵直性脊椎炎

執行計畫學生：趙鎬芊

學生計畫編號：NSC 97-2815-C-040-017-B
研 究 期 間 ：97 年 07 月 01 日至 98 年 02 月 28 日止，計 8 個月

指 導 教 授 ：詹明修

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執 行 單 位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中華民國　　98 年 03 月 31 日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊
＊ 計畫 **研究克雷白氏肺炎桿菌是否經由形成HLA-B27錯誤摺疊** ＊
＊ 名稱 **構型而引發僵直性脊椎炎** ＊
＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊

執行計畫學生：趙鋙芊（已改名為沈庭靚）

學生計畫編號：NSC 97－2815－C－040 －017 -B

研 究 期 間 ： 97 年 7 月 1 日至 98 年 2 月底止，計 8 個月

指 導 教 授 ：詹明修 老師

執 行 單 位：中山醫學大學醫學系微生物及免疫學科

中華民國 98 年 3 月 30 日

研究克雷白氏肺炎桿菌是否經由形成HLA-B27錯誤摺疊構型而引發僵直性脊椎炎

摘要

文獻探討

1968 年 Dr. Eric Thorsby 發現 HLA-B27。1973 年許多研究證據發現 HLA-B27 與僵直性脊椎炎 (Ankylosing Spondylitis；AS)之間有高度關聯性。近幾年更進一步發現 HLA-B27 的異常構型存在，甚至此異常構型會誘導內質網壓力的產生，使內質網摺疊蛋白質的能力降低，導致未摺疊好的蛋白堆疊在內質網，產生主要的反應有轉譯作用減低 (translational attenuation)、帶有內質網伴護蛋白 (ER chaperone protein) 的基因被高度調控甚至走向細胞凋亡路徑 [Marciniak and Ron, 2006]。但僵直性脊椎炎的致病機轉及 HLA-B27 之間的相關性至今仍未明確，其中克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumonia*；KP) 被認為是可能造成 AS 的誘因，雖然有少數文獻顯示數個 KP 的蛋白質的部分胺基酸序列與 HLA-B27 或是自體抗原相近，可能符合分子模擬學說機制，然而至今仍未有一個明確的答案。目前研究的進展如下：

基因因素 (Genetic factors)：據統計，95%的病人為 HLA-B27 陽性，但 2-10% HLA-B27 陽性的人終將發展成為 AS。以台灣來說，全人口約有 5%的人帶有 HLA-B27 基因，病人總數約佔全人口的 0.1-0.4 %（約四萬人），表示僵直性脊椎炎並不少見，但卻常常被忽略。另外關於 HLA-B27 亞型也有相關的研究，認為 B27 異構物的蛋白質輸出率和折疊效率並沒有相關性，也不能以重鏈的表現程度來加以區分，即多型性 B27 的折疊與 AS 亞型有很大但不完全對應之關係 [Galocha et al., 2008]。至於其他 HLA 基因，在 HLA-B27 陰性 AS 病人的基因型分析中發現 HLA-B60 和 HLA-B61 這兩種與僵質性脊椎炎相關的基因 [Wei et al., 2004]。

細菌感染致關節炎抗原學說 (Bacterial infection and Arthritogenic peptide theory)：某些外來的細菌侵入人體之後，可能是細菌的片段或代謝產物會在關節等處產生一些「抗原」 。這些「抗原」可以與 HLA-B27 分子結合，並使此結合後的複合體 (B27+抗原) 形成可能的致關節炎抗原呈獻於細胞上，變成免疫細胞攻擊的目標，因而引發一連串的免疫反應 [Fiorillo et al., 2000]。

分子相似學說 (Molecular mimicry in AS)：由於有些細菌的結構與 HLA- B27 分子結構上的「凹槽」有相似之處，導致體內產生的抗體誤認自己身上正常的免疫細胞上的 HLA-B27 為入侵的細菌而進行攻擊，即所謂的交叉反應 (cross-reaction)，進而產生免疫反應 [Ramos et al., 2002]。

研究目的

詹明修老師實驗室的研究發現去莢膜的 KP 可以誘導免疫細胞株以及 AS 病人周邊淋巴細胞產生內質網壓力，我有興趣想了解是否微生物如 KP 的刺激之下，也會造

成細胞表現錯誤構型的 HLA-B27，使細胞有機會誘導自體免疫反應發生，藉由本研究，我們期望可以再進一步了解僵直性脊椎炎的致病機轉。

研究特定目標

1. **驗證 decapsulated KP 可誘導 B27 陽性細胞株表現錯誤構型 B27：**

   為了解 decapsulated KP 可增加錯誤構型之 B27 heavy chain，將不同濃度的 KP 與表現 HLA-B27 的 CA46 B 淋巴母細胞株共同培養，以蛋白質電泳與 Western blots 檢測 B27 重鏈單體、雙體(dimer)或是寡體(oligomer)的表現程度。

2. **驗證 decapsulated KP 可誘導 B27 陽性 PBMC 表現錯誤構型 B27：**

   以 HLA-B27 陽性的病人的 PBMC 取代 CA46，將不同濃度的 KP 與 HLA-B27 陽性的病人的 PBMC 共同培養，以蛋白質電泳與 Western blots 檢測 B27 重鏈單體、雙體或是寡體的表現程度。

   由於錯誤構型的 HLA-B27 可呈獻自體抗原，故推測當給與自體抗原以及 KP 刺激過的抗原呈獻細胞 (antigen presenting cell; APC)，可能可以刺激 autoreactive $CD4^+$ T 細胞的活化增生以及分泌細胞激素。故我們想要了解 HLA-B27+CA46 細胞或是 monocytes 是否可以當作 APC，藉 T 細胞活化來評估 KP 促進 AutoAg presentation 的程度。所以我們接著下來即：

3. **驗證 decapsulated KP 誘導表現錯誤構型 B27 陽性的 CA46 或是 PBMC 具呈獻自體抗原並刺激 T 淋巴細胞活化：**

   將未經 KP 刺激或是已受 KP 刺激過之 CA46 或是帶有 HLA-B27 基因的人的周邊血液之 monocytes 與 naïve PBMC 共同培養，培養中並加入自體抗原 (autoantigen; AutoAg) 蛋白質。經 48 小時培養後，以流式細胞儀及螢光抗體標定，觀察 $CD4^+$T 細胞活化的程度。

   實驗分組 (CA46 細胞數為 2×10^6 / ml / well, KP 菌量為 5×10^7 /ml)

group	KP	CA46	Monocytes	Collagen II
1	－	－	－	－
2	－	＋	－	＋
3	－	－	＋	＋
4	＋	＋	－	＋
5	＋	－	＋	＋
6	－	＋	＋	＋
7	＋	＋	＋	＋

4. **驗證 decapsulated KP 誘導表現錯誤構型 B27 陽性的 CA46 或是 PBMC 刺激 T 淋巴細胞表現細胞激素：**

   同目標 3 的條件進行培養，將細胞培養液收集並以 ELISA 試劑組測定細胞液中的細胞激素含量。

研究方法及步驟

細菌培養

挑 1 個 KP 菌落以四區塗盤方式塗在含 100 μg/ml Ampicillin LB plate 中，放入 37°C 培養箱中培養 12 至 16 小時，再取 100 ml 含 100 μg/ml Ampicillin LB broth 至一新的 15 ml 離心管，加入 1 個菌落，放到 37°C 培養箱中培養 12 至 16 小時。

細菌去莢膜化

取 100 ml 已培養隔夜的菌液到無菌的 250 ml 無菌三角玻璃瓶中，加入 20 ml 1% 3-14 Zwittergent (Sigma Cat. No. T-7763) 溶液，混合均勻後在 50℃ 中培養 20 分鐘 (保留 100 μl 做為稀釋塗菌測定菌量之用)。將菌液各 25 ml 分裝至 4 個 50 ml 離心管並在室溫下以 10,000 rpm 的轉速離心 10 分鐘，再分別加入 6 ml 1X 的 PBS 將離下的 pellets (主要為去莢膜的 *K. pneumoniae*) 分裝至 1.5 ml 微離心管後以 1X 的 PBS 清洗三次 (室溫下以 10,000 rpm 的轉速離心 10 分鐘)，最後一次取完清洗液後，再離心一次以除去多餘水分。將已去夾膜的 *K. pneumoniae* 儲存在-20℃ 冰箱直到使用之時。將保留的 100 μl 菌液稀釋塗盤以測定菌量。

細胞培養

從液態氮取出細胞株，快速置於 37℃ 水浴槽解凍，之後加入 9 ml 已含細胞培養液 (RPMI-1640 medium <Sigma Cat. No.R6504> containing 10% fetal bovine serum <FBS；Biological Industry Cat. No. 04-001-1A> and 50 μg/ml Gentamicin <Sigma Cat. No. G1397>) 的無菌 25-T flask，放入 37℃ 含 5% CO_2 的培養箱中培養，並每天觀察。依據培養狀況繼代 (約每 2~3 天更換培養液)。

臨床血液檢體收集與分離 PBMC

在室溫中將含抗凝劑之新鮮血液以 2000 rpm 離心 10 分鐘，以無菌 pipette 把 buffy coat 層取出裝至新的 15 ml 離心管，加入等體積 RPMI 稀釋並混和均勻。另外取新的 15 ml 離心管內裝 3 ml Histopaque-1077 ficoll plus solution (Sigma Cat. No. 10771) ，緩緩將 blood/RPMI 混和液加在 Histopaque solution 之上，於室溫中以 2000 rpm 離心 20 分鐘。用無菌 pipette 吸去部分上清液，從 medium 和 Histopaque solution 的介面中吸取出 PBMC。以 10 ml RPMI-1640 清洗兩次後，拍散 PBMC pellet 並加入 5 ml 細胞培養液重新懸浮於 25 T Flask 中於 37℃ 培養箱中培養兩小時使 monocytes 貼至 flask 底部，稍微搖晃 5 次後取出上層液體於 15 ml 離心管。取出 50 μl 細胞懸浮液至計數盤，加入 50 μl trypan blue exclusion 計數細胞，以得知細胞濃度。

細菌與細胞共同培養

以 2 x 10^8/0.5 ml/well 去莢膜 KP 加入含 2 x 10^6/0.5 ml/well CA46 細胞，或 2 x 10^5/0.5 ml/well 分離之 monocytes 的 24 well plate 中(兩種細胞各準備 3 wells)，置於 37°C 含 5 % CO_2 的培養箱中培養 12 小時後，將細胞取出，個別置於 12 ml 無菌試管以 RPMI mediun 清洗兩次以去除 KP，重新加入培養液以懸浮細胞，並計數細胞，以得知細胞濃度。於將 KP 刺激過之細胞做為 APC。

與 AS 相關的自體抗原有數種，如 Collagen type II、aggrecan 等，然經詢問廠商之後，僅購得人類 collagen type II (USBio Cat. No. C7510-23)。將 collagen II 濃度調整為 0.1 mg/ml 細胞培養液，與細胞共同培養，經 48 小時培養後以泛用離心機於 1,500 rpm 速度離心 10 分鐘，並取出上層培養液至 1.5 ml 微量離心管，保存在-80℃冰箱中至進行 ELISA 分析上層細胞培養液中之細胞激素。

萃取蛋白質

將細胞置於 15 ml 離心管內，以泛用離心機於 1,500 rpm 速度離心 10 分鐘，並取出上層培養液。加入 10 ml ice-cold 1X PBS 於 cell pellet，以 1,500 rpm 10 分鐘離心，共清洗兩次。拍散細胞，加入十倍於 cell pellet 體積之 1X Protein Lysis Buffer (含 protease inhibitor)，輕輕地混合細胞與溶解液。於冰上作用 20 分鐘後，在 4^{o}C 以 12,000 rpm 高速離心 30 分鐘，取出上清液至新的 1.5 ml 微量離心管。將 sample 加入 1/4 sample 體積之 5X sample buffer (without 2-ME or with 2-ME)，充分混合均勻 (低速 vortex) 後，放在 100^{o}C 乾熱槽中加熱 10 分鐘，之後迅速放在冰上冷卻，保存於-20^{o}C 至進行蛋白質電泳。

蛋白質電泳

依比例配製 running gel，輕輕混合均勻後，從中央倒入兩片玻璃片的間隙。在膠液上方緩緩加入 1 ml Milli-Q 水以壓平膠液以趕走氣泡，於室溫下靜置約 50-60 分鐘，待膠液完全凝固後倒掉上層水分。依比例配製 stacking gel，輕輕混勻後倒入玻璃片中至短玻璃片頂端。傾斜插入合適孔徑與厚度的製孔梳 (comb)，室溫下靜置約 50-60 分鐘直到試管內餘膠凝固為止。電泳槽內預先放入一半的 reused 1X running buffer，將玻璃片移至支架上後夾緊再置入電泳槽內。內層加入新鮮乾淨的 1X running buffer 淹過短玻璃片，小心的平行拔掉製孔梳，內層 running buffer 補至短玻璃上緣處，外層 running buffer 則補至與內層 running buffer 等高。以 100 伏特預跑 30 分鐘以除去 acrylamide monomer 之後每個孔加入 5 μl (或等重量蛋白質) 樣本及 Protein marker (Fermentas Cat.No.SM0671)，以 100 伏特進行電泳 90 分鐘或依實際需要進行更久的時間。

西方轉漬法

剪裁適當大小的 PVDF 膜、3 mm 的濾紙及 2 片纖維墊，以甲醇處理 PVDF 膜約 10 秒後，與 3 mm 濾紙及纖維墊共同加入 1X transfer buffer 浸泡。取出膠片切掉 stacking gel，依序將纖維墊、濾紙、膜、膠片、濾紙、纖維墊等排好，以轉漬匣夾好後置入電泳槽中，以 70 伏特進行轉漬 90 分鐘。將 PVDF 膜取出，放入乾淨的塑膠盒中，加入 5-10 ml 的牛奶，置於 4^{o}C 冰箱，以 25 rpm 震盪至少 8 小時。移除脫脂牛奶，加入 5-10 ml 含抗體脫脂牛奶，於 4^{o}C，25 rpm 震盪 8 小時。將含有抗體的脫脂牛奶移除，以 20 ml PBS-T (Merck, Cat. No. S4662084636) 清洗 4 次 (每次洗 5 分鐘)。加入含二級抗體之脫脂牛奶溶液，置於 4^{o}C 以 25 rpm 震盪至少 8 小時後，以 20 ml PBS-T 清洗 4 次。

螢光呈色與感光：於暗室中將 PVDF 膜移至另一乾淨的盤子中，將新鮮配製的化學冷光試劑均勻滴在膜上。PVDF 膜出現螢光訊號後，將 PVDF 膜移至濾紙上，吸去多餘的化學冷光試劑後進行壓片。將底片從壓片匣取出後，置入顯影劑 (developer solution) 中顯影 1~2 分鐘，之後以清水沖洗。將底片取出置入定影劑 (fixer solution) 中定影 1~2 分鐘，以清水沖洗，完成壓片步驟。

免疫酵素法

ELISA kits 購自 eBioscience。包括 Human IFN-γ kit (Cat. No.88-7316)、Human IL-2 kit (Cat. No.88-7026)、Human TNF-α kit (Cat. No.88-7449)等。

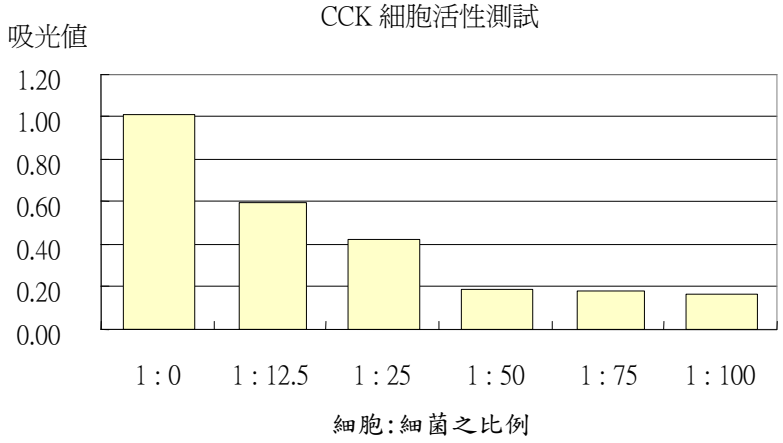
將 Capture antibody 依照作用濃度稀釋於 Coating buffer 內，於 96-well EIA plate 每個 Well 內加入 100 μl，蓋上封膜後置於 4℃作用至隔天。倒掉多餘的 Capture antibody 溶液，於每個 well 中各加入 200 μl 的 Wash buffer 清洗五次，再加入 200 μl/well 的 assay diluent reagent 室溫下作用 1 小時。加入 200 μl 的 Wash buffer 清洗五次，再於各盤中指定的位置加入 100 μl/well 的樣本和各種細胞激素的 Standards，室溫中作用 2 小時。之後再加入 200 μl 的 Wash buffer 清洗五次，然後加入 100 μl/well 的 detection antibody，室溫中作用 1 小時。加入 200 μl 的 Wash buffer 清洗三次後，將殘餘在盤中的水分清除乾淨，加入 100 μl/well 的 Streptavidin-HRP，室溫中避光作用 20 分鐘。加入 200 μl Wash buffer 清洗五次，最後加入 100 μl/well Substrate solution，室溫中作用至 96-well 盤中呈現藍綠色，加入 50 μl/well Stop solution 終止反應。輕輕將盤中的溶液混合，使用全波長酵素免疫分析儀以 450/620 nm 波長測量其 OD 值，依照已知濃度檢量線推算原樣本所含的細胞激素之濃度。

預期結果

1. 以去莢膜 KP 刺激 CA 46 B 淋巴母細胞株或是 naïve B27 陽性之 PBMC 可誘導錯誤構型的 HLA-B27 表現,此表現可利用其分子量差異被蛋白質電泳與西方墨點法所偵測。
2. 去莢膜 KP 刺激之 CA 46 B 淋巴母細胞株或是 B27 陽性之 PBMC 可刺激 B27 陽性病患未發病者之 PBMC，造成 PBMC 內 T 淋巴細胞活化。
3. 去莢膜 KP 刺激之 CA 46 B 淋巴細胞株或是 B27 陽性之 monocytes 可刺激 B27 陽性病患未發病者之 PBMC,造成 PBMC 內單核細胞分泌細胞激素 TNF-α刺激活化 T_H1 cell 進而釋放細胞激素 IFN-γ、IL-2 等。
4. 由(1)的結果將可證實細菌 KP 具有促使 B27 heavy chain 產生錯誤構型之能力。由(2)與(3)的結果則可證實由 KP 造成 HLA-B27 錯誤構型的 CA 46 B 淋巴母細胞株或是 PBMC 可做為導致關節炎抗原呈獻之呈獻細胞，進而引起發炎反應。

結果

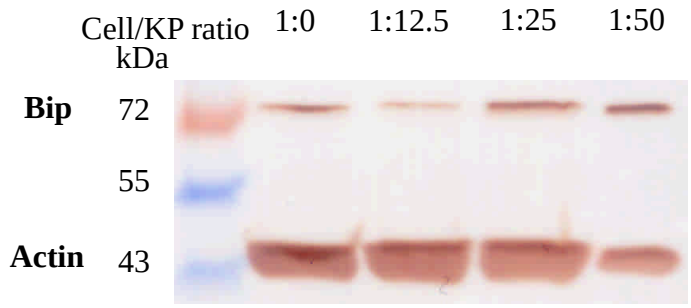
1. **Decapsulated KP 抑制 CA46 細胞增生** 將不同劑量之 decapsulated KP 與 CA46 共同培養 24 小時後，加入 CCK 試劑反應一個小時。由 CCK test 得知 KP 對細胞刺激後對細胞增生的影響，做為觀察自行至被之去莢膜 KP 的活性高低。實驗結果顯示細胞與細菌數量比例為 1:12.5 時對於細胞的增生及有抑制的作用,且隨 deCapKP 數量的提高，其抑制效果有增加，當比例為 1:50 即達最大反應值(圖一)。



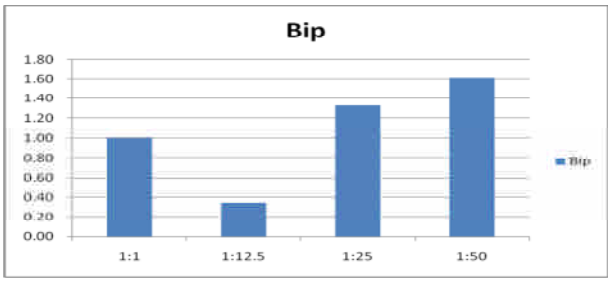
圖一 deCap KP 抑制 CA46 細胞生長。

2. **確認細胞內 ER stress** 為確定所製備之 deCapKP 可以活化 ER stress,將細胞與不同濃度的 KP 共同培養 24 小時。取得細胞萃取蛋白質以蛋白質電泳及西方點墨法，anti-Bip 抗體偵測之。如圖二所示，細胞與細菌數量比例為 1:50 的時候細胞內 Bip 的表現量有顯著地的增加。

A.

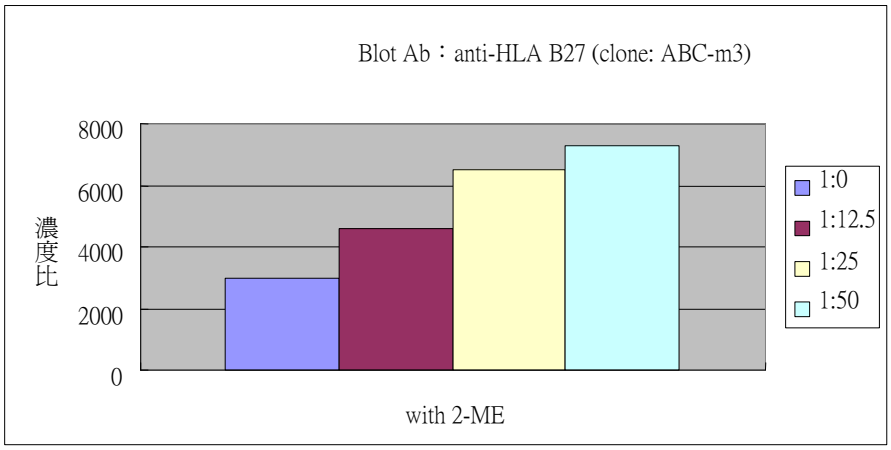


B



圖二 deCapKP 促進 ER stress marker Bip 表現。A. 細胞經不同濃度之 deCapKP 處理二十四小時後，以蛋白質電泳及西方點墨法測定 Bip 蛋白質的表現。 B. 經量化後 Bip/actin 之比值。

3. **確認 B27 錯誤折疊構型** 細胞與 KP 共同培養 24 小時後。將與 KP 共同培養的 CA46 萃取蛋白質。蛋白質電泳及西方點墨法，anti-HLA B27 單株抗體(clones ABC-m3 and EP-4)偵測。圖三顯示 HLA-B27 heavy chain 表現會隨 deCap KP 刺激而增加。



圖三 HLA-B27 heavy chain 蛋白質以蛋白質電泳及西方點墨法偵測，再以 densitometer 分析 HLA-B27 heavy chain 的表現。

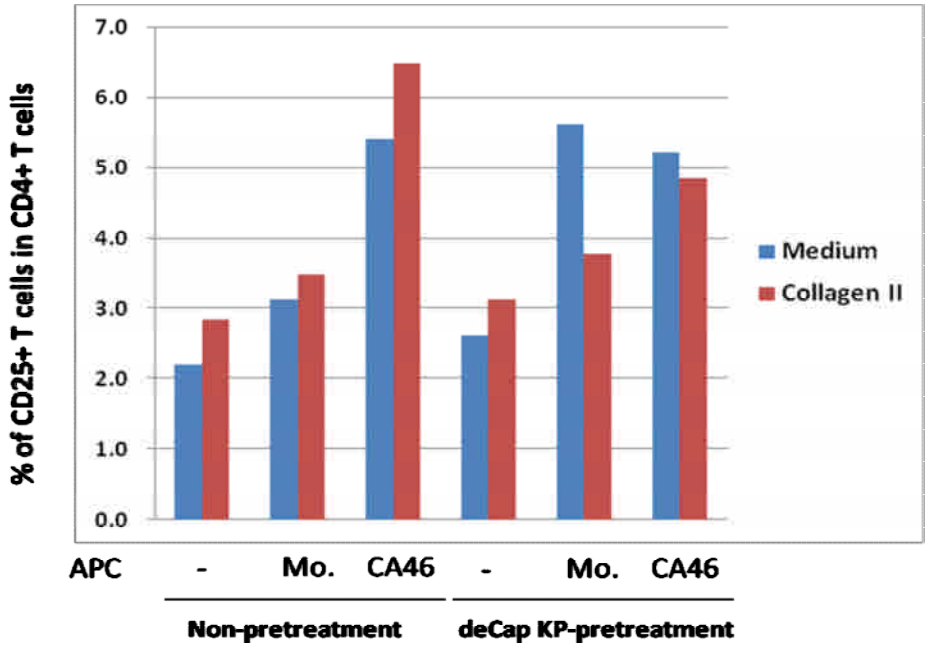
4. **deCap KP 刺激之抗原呈獻細胞對 autoreactive CD4$^+$ T 細胞的影響** KP 與 CA46 或 HLA-B27+ monocytes 共同培養 24 小時。清洗後，與 PBMC 中之淋巴細胞以及 Human Sternal Cartilage, collagen type II (USBio Cat No.C7510- 23) 共同培養 48 小時。收集 PBMC 等細胞之上清液進行 ELISA 分析細胞激素。實驗結果如圖四，淋巴細胞群無任何刺激下，CD25+CD4+ T 細胞群佔所有 T 細胞之 2%，經自體抗原 collagen II 刺激後有些許增加。若給與 monocytes (Mo.)或是 CA46 細胞，則也呈現增加的趨勢，由其是 CA46 細胞。若合併 APC 及 collagen II 則呈現協同性的增加 CD25+CD4+ T 細胞群，由其是以 CA46 做為 APC 下。然而以 deCap KP 先對 APC 刺激 12 小時，其中 deCap KP pretreated monocytes 加入會顯著增加 CD25+CD4+ T 細胞群百分比(增加為兩倍左右)，但是在 deCap KP pretreatment 下，抗原加入並無法進一步增進 CD25+CD4+ T 細胞群增加。觀察另一個活化指標 CD69 也顯示相同的趨勢。

   我們同時也收集細胞培養液以分析細胞激素的表現量，因試劑採購的問題，目前尚在整理數據當中，故沒有將此部分的結果放在報告之中。

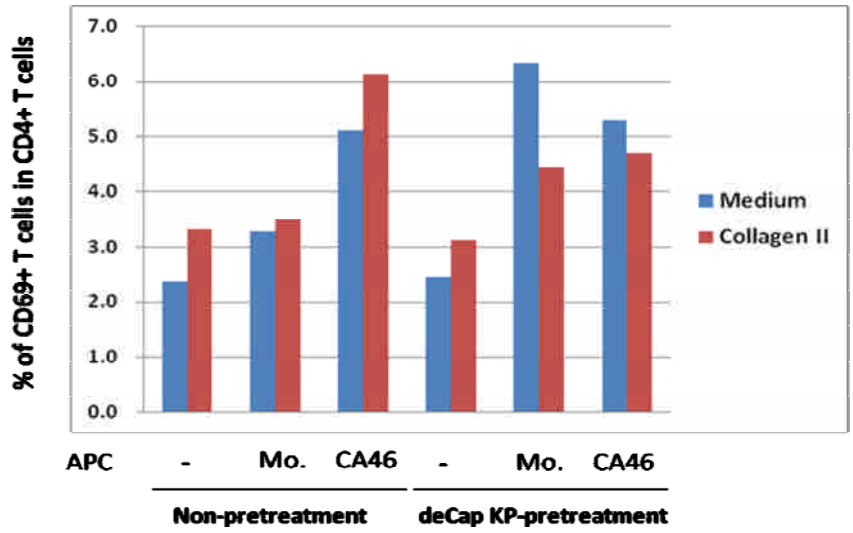
討論

我們再次確認去莢膜 KP 菌對 CA46 細胞具有刺激產生 ER stress 的作用，且隨劑量增加而增加，然而在觀察 HLA-B27 的表現時，雖然觀察到 HLA-B27 heavy chain 有增加，但是對於 misfolded form 之 HLA-B27 heavy chain 無法偵測，其原因可能是出自於抗體的專一性的問題。

由於 MHC class I 分子理應活化 CD8+ T 細胞，但由於 HLA-B27 易發生 misfolding，形成 homodimers 所以被認為可能會形成類似於 MHC class II 的結構而刺激 CD4 T 細胞。在預給去莢膜 KP 刺激 APC 產生 ER stress 以模擬可能因 B27 misfolding 而增加自體抗原呈獻的研究中，預給去莢膜 KP 反較難以刺激 CD4+T 細胞的活化，我們認為，由於 deCapKP 是 pretreated，所以這些自體抗原的呈獻機制可能會受到 UPR 活化後而反而到抑制。所以在無 deCap KP pretreatment 下，給與 APC 以及 collagent II 反而有顯著增加 CD4 T 細胞活化的現象。目前認為除了 collagens、aggrecan 是自體抗原外，HLA-B27 本身也可以是自體抗原。給與 CAA46 當作 APC 時，雖然 CA46 表現 HLA-B27，但由於 CA46 是不同人的細胞，故可能產生 mixed lymphocyte reaction (MLR)，故活化之 CD4T 細胞比例相對較高。有趣的是，給與 deCap KP pretreated monocytes 當作 APC，可以顯著增加活化之 CD4T 細胞比例，似乎意味著細菌直接就可以促進 APC 活化 CD4+T 細胞。由於可購買之自體抗原有限(僅購得 collagen II)，我們選用之 collagen II 無法對所有的 autoreactive T 細胞產生刺激，以至於所觀察的反應均較小。未來可考慮關節抽出液當輟自體抗原的來源，另 deCap KP 與抗原同時給予可能更能了解 APC 呈獻自體抗原的能力。



圖四　自體抗原及去莢膜 KP 刺激 T 淋巴細胞活化的程度(以 CD25 表現為指標)。



圖五　自體抗原及去莢膜 KP 刺激 T 淋巴細胞活化的程度(以 CD69 表現為指標)。

參考文獻

Fiorillo MT, **Maragno M**, **Butler R**, **Dupuis ML**, **Sorrentino R**. CD8(+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. J Clin Invest. 2000 Jul;106(1):47-53.

Galocha B, de Castro JA. Folding of HLA-B27 subtypes is determined by the global effect of polymorphic residues and shows incomplete correspondence to ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. 2008 Feb;58(2):401-12.

Marciniak SJ, **Ron D**. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. Physiol Rev. 2006 Oct;86(4):1133-49.

Ramos M, **Alvarez I**, **Sesma L**, **Logean A**, **Rognan D**, **López de Castro JA**. Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. J Biol Chem. 2002 Oct 4;277(40):37573-81. Epub 2002 Jul 16.

Wei JC, Tsai WC, Lin HS, Tsai CY, Chou CT. HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. Rheumatology (Oxford). 2004 Jul;43(7):839-42. Epub 2004 Apr 27.