

Typisierung von HLA-Klasse-II-Merkmalen mittels des TaqMan-Verfahrens

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

Dissertation
(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Matthias Tremmel

Kaiserslautern 2001

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1997 bis Mai 2000 im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer angefertigt. Die praktische Durchführung erfolgte am Institut für Immunologie der Universität Heidelberg in der Abteilung Transplantationsimmunologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med Gerhard Opelz.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 28.Juni 2001

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Schrenk

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Trommer

2.Berichterstatter: Prof. Dr. Opelz

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung.....	3
3	Problemstellung	5
4	Grundlagen	6
4.1	Lokalisation.....	6
4.2	Polymorphismus.....	9
4.3	Nomenklatur.....	10
4.4	Populationsgenetik.....	16
4.5	Struktur der HLA -Klasse I-Moleküle und –Gene.....	18
4.6	Struktur der HLA -Klasse-II-Moleküle und -Gene.....	19
4.7	Funktion und Expression der MHC-Moleküle.....	21
4.8	Entwicklung der Gewebetypisierung	25
4.8.1	Serologische Typisierung.....	25
4.8.2	Zelluläre Methoden	26
4.8.3	Biochemische Verfahren	28
4.8.4	Molekularbiologische Typisierung.....	29
5	Material und Methoden.....	36
5.1	Geräte.....	36
5.2	Chemikalien/Reagenzien	37
5.3	Enzyme.....	38
5.4	Sonstige Materialien.....	38
5.5	Probenmaterial.....	38
5.6	DNA-Isolierung (Aussalzverfahren aus Blut oder Zellen).....	38
5.7	DNA-Isolierung (Phenol-Chloroform-Extraktion nach Graham, aus Milz oder Lymphknoten).....	39
5.8	Konzentrationsbestimmung der DNA (Spektrophotometer).....	40
5.9	Primer.....	41
5.10	Herstellung der PCR-Reaktionsgemische ("Mixe").....	45
5.11	Sequenzierung mit dem ABI 377	46
6	Experimenteller Teil.....	49
6.1	Prinzip des TaqMan-Verfahrens	49
6.1.1	Farbstoffe	52
6.1.2	Kontaminationsschutz.....	56
6.1.3	Sondendesign.....	57
6.2	Entwicklung der High Resolution DRB1*15/16 Typisierung mittels TaqMan.....	58
6.3	Entwicklung der DRB1*04 Typisierung mittels TaqMan	65
6.4	DR-Low Resolution	69
7	Ergebnisse	75
8	Diskussion.....	81
9	Zusammenfassung	89
10	Anhang: Getestete DNA-Proben	90
11	Literatur.....	99

1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ASHI	American Society for Histocompatibility and Immunogenetics
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity Assay
CPG	Controlled Pore Glass
CTS	Collaborative Transplant Study
dATP	Dideoxy -Adenosintriphosphat
dCTP	Dideoxy -Cytidintriphosphat
dGTP	Dideoxy -Guanosintriphosphat
dTTP	Dideoxy -Thymidintriphosphat
dUTP	Dideoxy -Uraciltriphosphat
DMTr	Dimethyltrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Efi	European Federation of Immunogenetics
Elisa	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Ex	Exon
FET	Fluoreszenzenergietransfer
HCl	Salzsäure
THF	Tetrahydrofuran
HLA	Human Leucozyte Antigen
In	Intron
IPC	Internal Positive Control
LAN	Linker-Arm-modifiziertes Nukleotid
KOH	Kaliumhydroxid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MHC	Major Histocompatibility Complex
MLC/ MLR	Mixed Leucozyte Culture/ Reaction
MG	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NTC	No Template Control
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCR-HDA	PCR-Heteroduplexanalyse
PCR-SSCP	PCR-Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus
PCR-SSO	PCR-Sequenzspezifische Oligonukleotid-Hybridisierung
PCR-SSP	PCR-Sequenzspezifisches Priming
Q	Quencher
R	Reporter
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
Rn	normalisiertes Reportersignal
RT	Raumtemperatur
SBT	Sequenzierung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sHLA	lösliche HLA -Molekuele
TBE	Tris -Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris -EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris -(hydroxymethyl)-aminoethan
UNG	Uracil-N-Glykosilase

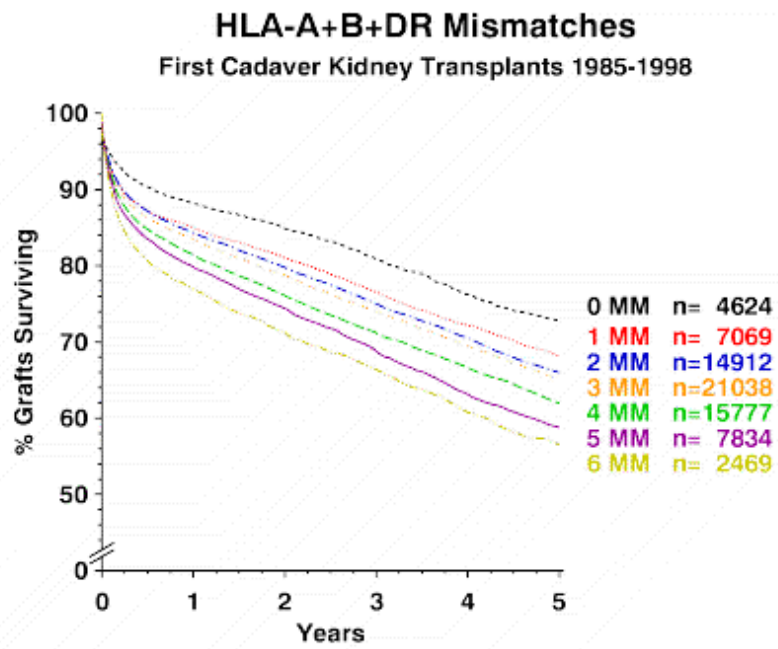
2 Einleitung

Organtransplantationen zählen heute zu den etablierten Therapieverfahren in der Klinik. Weltweit werden jährlich etwa 40.000 Organtransplantationen, davon etwa 25.000 Nierentransplantationen, (DSO, Eurotransplant) durchgeführt. Neben einer beträchtlichen Steigerung der Lebensqualität, ist die Transplantation in vielen Fällen wie z.B. einer infausten Herzinsuffizienz, die einzige Möglichkeit das Überleben des Patienten zu sichern. Der Erfolg der Transplantation ist jedoch von vielen Faktoren abhängig. Dazu zählen nicht-immunologische Faktoren wie z.B. die kalte und warme Ischämiezeit, Alter und Geschlecht des Spenders sowie Vorerkrankungen. Einen der wichtigsten Faktoren jedoch stellt die immunologische Abstoßung dar. Sie richtet sich gegen fremde Proteine auf dem Spendergewebe und wird durch cytotoxische T-Zellen, T-Helfer-Zellen (TH) oder auch durch Antikörper vermittelt. Vor allem unterschiedliche Moleküle des Major Histocompatibility Complex (MHC oder Haupthistokompatibilitätskomplex) gelten als Auslöser für eine immunologische Abstoßungsreaktion. Diese kann trotz des Einsatzes potenter Immunsuppressiva nicht vollständig unterdrückt werden. Es werden deshalb große Anstrengungen unternommen, Spender und Empfänger hinsichtlich ihrer Gewebemerkmale aufeinander abzugleichen.

Daten der Collaborative Transplant Study (CTS-Studie), die 1982 in Heidelberg initiiert wurde und an der sich über 300 Transplantationseinheiten aus 45 Ländern beteiligen, belegen eindeutig den Einfluß der HLA-Kompatibilität auf die Transplantatüberlebensrate. Die Studie enthält Daten von mehr als 200.000 Nieren-, Herz-, Leber- und Pankreas-Transplantationen (Opelz, 1999).

Im Gegensatz zur Nierentransplantation, die auch möglich ist, wenn keine völlige Übereinstimmung der HLA-Merkmale besteht, ist eine erfolgreiche Knochenmarktransplantation zur Zeit nur von einem exakt passenden Spender möglich. Die Suche nach einem passenden Spender wird durch den Aufbau von Knochenmarkregistern weltweit und den Einsatz von Nabelschnurblut erleichtert. Für eine Knochenmarktransplantation ist die Gewebetypisierung durch herkömmliche, serologische Methoden nicht ausreichend. Sie muß durch molekulare Verfahren ergänzt werden (Baxter-Lowe L A, 1994). Eine niedrig auflösende, auf PCR basierende Typisierung, wie sie bei der Nierentransplantation angewendet wird, bedarf im Falle einer Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation einer Erweiterung durch eine höher auflösende Technik.

Doch auch bei der Nierentransplantation scheint eine hochauflösende Typisierung das Transplantatüberleben positiv zu beeinflussen (Opelz et al., 1997). Eine Sequenzierung ist arbeitstechnisch sehr aufwendig, kostenintensiv und wegen des großen Zeitbedarfs (Spenderorgane sind nicht unbegrenzt haltbar!) bisher für die Routineanwendung ungeeignet. Deshalb gilt es eine Methode zu etablieren, die genau arbeitet, Ergebnisse in kurzer Zeit liefert und durch eine mögliche Automatisierung einen höheren Probendurchsatz erlaubt.



CTS Collaborative Transplant Study

CTS-K-21101-Mar1999

Abb. 1.1 zeigt die Überlebensraten von Transplantaten bei Patienten, die zum ersten Mal transplantiert wurden. Voll kompatible Organe zeigen die höchste Überlebensrate. Mit zunehmender Anzahl von Mismatches (1-6), sinkt das Transplantatüberleben dramatisch.

3 Problemstellung

Mit Hilfe der TaqMan-Methode sollte exemplarisch für den HLA-DRB1*-Locus eine Typisierungsmethode zur Anwendung im Routinebetrieb entwickelt werden, die mindestens das Auflösungsvermögen der herkömmlichen Low-Resolution SSP erreicht, besser noch übertrifft, aber einfacher und zeitsparender durchzuführen ist und dabei genauso zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefert. In einem zweiten Schritt sollte durch dieses Verfahren eine hochauflösende HLA-DRB*1-Typisierung durchgeführt werden.

4 Grundlagen

Alle Spezies, die in der Lage sind eine Immunantwort aufzubauen, besitzen eine chromosomale Region, auf der Faktoren kodiert sind, die die Erkennung von Fremd und Selbst ermöglichen. Diese Region heißt MHC und die daraus entstehenden Proteinprodukte MHC-Moleküle. Die eigentliche Aufgabe der MHC-Moleküle besteht darin, Peptidfragmente zu binden und diese auf der Zelloberfläche zu präsentieren, damit sie von geeigneten T-Zellen erkannt werden, wodurch eine Immunantwort aktiviert wird.

Pathogene mutieren leicht in ihren Strukturgenen, um der Präsentation durch ein MHC-Molekül zu entgehen und damit vom Immunsystem des Wirts unentdeckt überleben zu können. Um der Vielzahl dieser ständig wechselnden Pathogene zu begegnen, stehen 2 separate Mechanismen des Immunsystems zur Verfügung: Die Polygenie des MHC, d. h. die Existenz mehrerer MHC-Klasse-I- und II-Gene, die Proteine mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten codieren, und die Polymorphie, d.h. die Existenz mehrerer Allele für jedes Gen (MHC-Polymorphismus).

4.1 Lokalisation

Der MHC findet sich bisher nur bei Säugetieren und erhält für jede Spezies eine andere Bezeichnung: Beim Menschen wird er als HLA bezeichnet (Human Leucocyte Antigen), bei der Maus H-2.

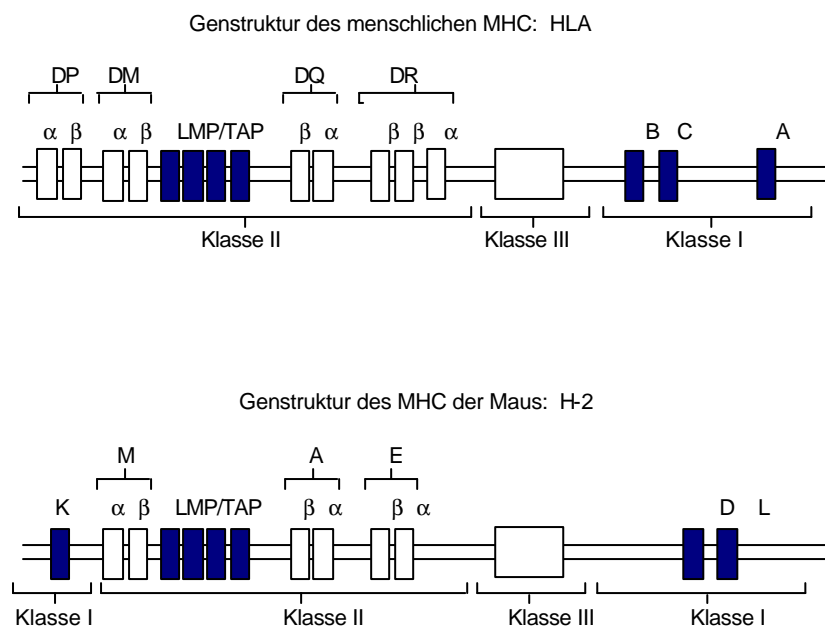


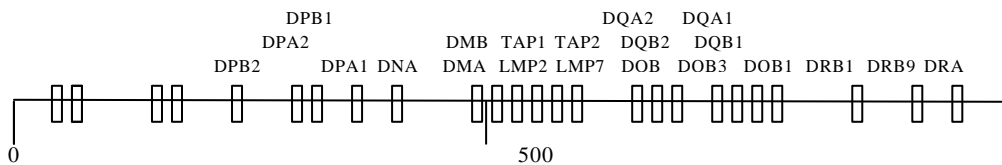
Abb. 3.1: Vergleich zwischen dem murinen (H2) und humanen MHC (HLA)

Beim Menschen liegen die HLA-Gene auf Chromosom 6, bei der Maus die H-2-Gene auf Chromosom 17. Die Organisation der MHC-Gene von Mensch und Maus ist sehr ähnlich: Die Regionen von Klasse I und II sind räumlich durch die sogenannten Klasse-III-Gene voneinander getrennt. Beide Arten besitzen drei MHC-Klasse-I-Genorte, HLA-A,-B und-C beim Menschen, H2-K, -D und-L, bei der Maus, wobei H2-K möglicherweise transloziert wurde, was zu einer Zweiteilung der Klasse-I-Region bei der Maus führt. Das Gen für das β_2 -Mikroglobulin bildet eine Ausnahme, es liegt beim Menschen auf Chromosom 15, bei der Maus auf Chromosom 2.

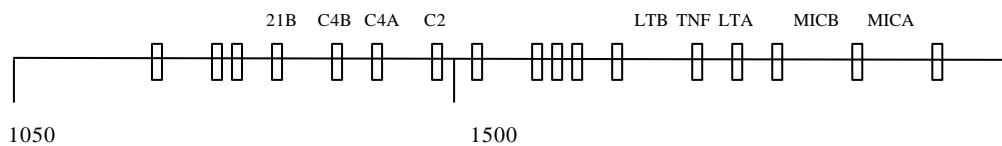
Der HLA-Komplex mit über 100 Genen ist auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosom 6 lokalisiert (6p21.1-6p21.3) und umfaßt einen Genabschnitt von etwa 4000 Kilobasenpaaren.

Noch vor der 99%igen Sequenzierung des menschlichen Genoms Anfang 2000, wurde Ende 1999 die vollständige Sequenzkarte des HLA-Genoms veröffentlicht (The MHC Sequencing Consortium, Nature, 1999).

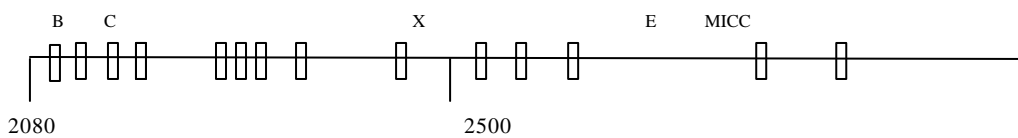
MHC-Klasse II



MHC-Klasse III



MHC-Klasse I



MHC-Klasse I

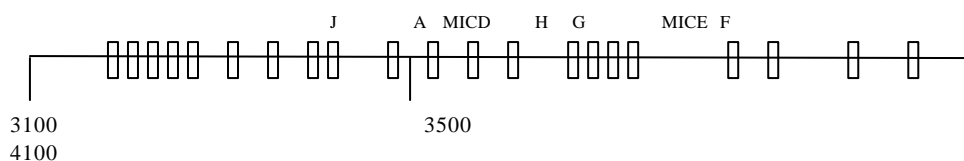


Abb.3.2: Schematische Genkarte des humanen MHC

Innerhalb dieses Komplexes werden 3 Regionen unterschieden. Die Region der HLA-Klasse-I-Gene liegt auf der telomeren Seite des Komplexes. Zentromerwärts findet man die HLA-Klasse-II-Genorte, die durch die historisch als Klasse-III bezeichnete Region von der Klasse-I-Region getrennt sind. Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Genen (Komplementfaktoren C2, Faktor B, C4A und C4B, Tumornekrosefaktor (TNF- α , β), Hitzeschockprotein (HSP 70), sowie Steroid-21-hydroxylasen), die zwar immunologische Relevanz besitzen, aber weder Klasse-I, noch Klasse-II zuzuordnen sind und allein wegen ihrer Lage auf dem Chromosom als HLA-Gene bezeichnet werden.

Bei den HLA-Klasse-I-Molekülen kennt man drei Genorte, HLA-A, -B und -C, die die klassischen serologisch definierten Spezifitäten kodieren, ferner -E, -F und -G, die ebenfalls funktionell aktive HLA-Moleküle exprimieren, sowie -H und -J, für die bis jetzt noch kein Genprodukt gefunden werden konnte.

Die HLA-Klasse-II-Region beinhaltet mehrere Gruppen von Genorten: Im Bereich der HLA-DR-Genorte sind ein nicht-polymorphes α -Kettengen (DRA) und mehrere β -Kettengene kodiert (DRB1-DRB9), von denen DRB1, DRB3, DRB4 und DRB5 exprimiert werden, die restlichen jedoch Pseudogene darstellen. Die Zahl der DRB-Gene auf einem Chromosom ist nicht konstant, sondern Haplotyp-abhängig.

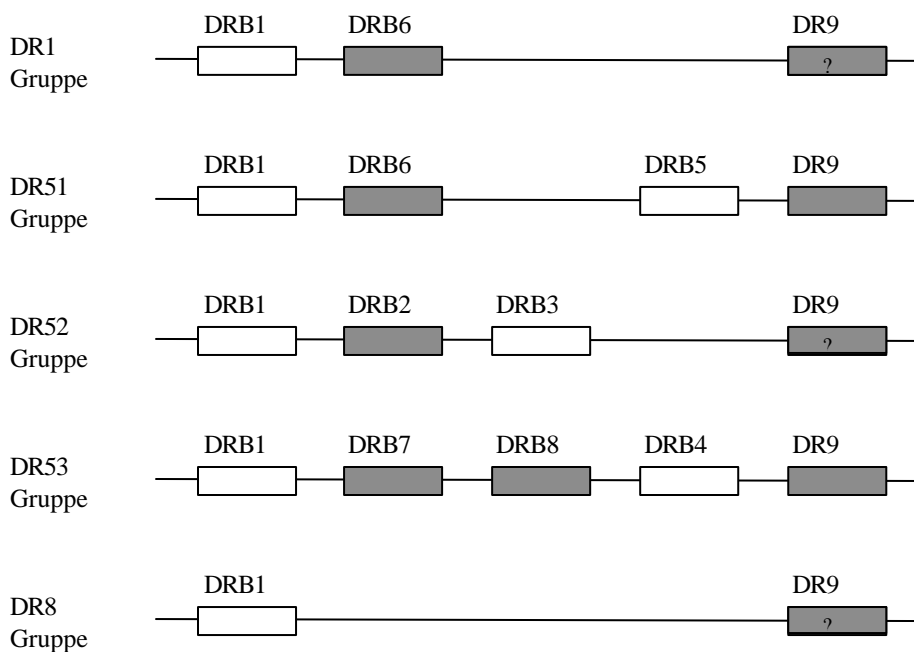


Abb.3.3: Übersicht über die Verteilung der DRB-Gene.

Während das DRB1 Gen, in dem die Spezifitäten von DR1 bis DR18 kodiert werden, stets vorhanden ist, sind weitere exprimierte DRB-Gene nur bei bestimmten Haplotypen vorhanden. So

sind der DR1-Gruppe DR1, 103, 10, in seltenen Fällen auch DR15 zugeordnet, der DR51-Gruppe, die durch DRB5 codiert wird DR15,16 und 1, der DR52-Gruppe DR3,11,12,13,14 der DR53-Gruppe DR4,7 und 9. Die HLA-DR52-Spezifitäten werden durch das DRB3-Gen, die DR53-Spezifitäten durch das DRB4-Gen codiert. Grau unterlegte Rechtecke stellen Pseudogene dar.

In der HLA-DQ-Region sind zwei α - und zwei β -Ketten codiert: DQA1, DQB1, DQA2 und DQB2. DQA1, DQB1 sind hochgradig polymorph und werden im Gegensatz zu DQA2 und DQB2, die nur einen diallelischen Polymorphismus besitzen, exprimiert. Ferner existiert noch ein invariantes β -Ketten-Genfragment, DQB3.

Auch die HLA-DP-Region umfaßt Genorte für zwei α - und zwei β -Ketten: DPA1, DPB1, DPA2 und DPB2. Analog zur HLA-DQ-Region werden die exprimierten DP-Moleküle von DPA1 und DPB1 codiert. DPA2 und DPB2 stellen Pseudogene dar.

DO, für das nur ein β -Kettengen, und DN, für das nur ein α -Kettengen bekannt ist, stellen möglicherweise Relikte aus der Zeit der Entstehung des MHC dar. Genprodukte wurden bisher nicht entdeckt.

Die DM-Region besitzt sowohl ein α - als auch ein β -Kettengen. Genprodukte dieses Genortes bilden ein Heterodimer, das eine wichtige Rolle in der Assoziation von Peptid und MHC-Molekül für die Antigenpräsentation spielt.

Neben diesen HLA-Klasse-II-Genen, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, existieren auch Gene, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind und somit einen funktionellen Bezug zu den Histokompatibilitätsmolekülen darstellen. TAP1- und TAP2-Gene (transporter associated with antigen processing) kodieren ein heterodimeres Molekül, das für den Transport von prozessierten Antigenen von Bedeutung ist, LMP2 und LMP7 (large multicatalytic proteasome) sind zwei Interferon- γ induzierbare Gene, die Komponenten des Proteasoms kodieren. Die ABC- (=ATP-Binding Cassette) Transporter- und LMP-Gene weisen nur einen limitierten Polymorphismus auf.

4.2 Polymorphismus

Die Struktur der HLA-Moleküle läßt sich in vier Regionen unterteilen (Abb. 3.4): Die zytoplasmatische Region besitzt womöglich Bedeutung in der Signaltransduktion, die Transmembranregion ist für die Verankerung und die Immunglobulin-ähnliche Region zur Strukturstabilisierung und CD4/CD8-Bindung verantwortlich. Zur Antigenpräsentation besitzt jedes HLA-Molekül bzw. jedes HLA-Heterodimer eine Peptidbindungsregion. Dies bedeutet, daß sämtliche zu präsentierende Proteinfragmente an diese Antigenbindungsstelle gebunden werden müssen. Durch ihre zentrale Rolle in der Unterscheidung zwischen selbst und nicht-selbst muß die Bindung zu solchen Proteinfragmenten ausreichend selektiv sein, um ihren Zweck erfüllen zu

können. Dafür stehen jedem Individuum nicht nur ein einziger, sondern mehrere Genorte zur Verfügung, was man als Polygenie bezeichnet. HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II-Moleküle weisen einerseits eine ausgeprägte Homologie ihrer DNA- und Proteinsequenzen auf, andererseits läßt sich innerhalb der hypervariablen Regionen der einzelnen Genorte eine ausgeprägte allelische Vielfalt finden. Dieser allelische Polymorphismus bildet somit einen zweiten Mechanismus, der während der Lebenszeit eines Individuums unverändert in seiner Keimbahnkonfiguration erhalten bleibt (angeborene Immunität). Im Gegensatz dazu erhält die Immungenetik der Immunglobuline und des T-Lymphozyten-Rezeptors ihre Variabilität und somit die Spezifität zur Antigenerkennung im wesentlichen durch somatische DNA-Rekombinationsvorgänge und somatische Mutationen (adaptive Immunität). Die allelische Variabilität ist die wichtigste Voraussetzung für die Selektivität des HLA-Moleküls, da die Polymorphismen meist in den antigenbindenden Epitopen zu finden sind. Die isotypische Diversität und die allelische Variabilität sind jedoch nicht die einzigen Mechanismen, die für die strukturelle Variabilität der HLA-Moleküle verantwortlich sind. So besitzen HLA-DQ und HLA-DP-Moleküle sowohl in der α -, als auch in der β -Kette eine gewisse Diversität, was bei Heterozygotie zu einer cis- und trans-Assoziation verschiedener Heterodimere führen kann. Bei der cis-Konformation stammen beide Ketten des Heterodimers von demselben Haplotyp, bei der trans-Konformation von verschiedenen Haplotypen. Ob sich die Paarung der α - und β -Ketten nur auf einen Genort bezieht (isotypic pairing) oder unter Beteiligung zweier verschiedener Klasse II-Genorte (mixed isotype pairing) abläuft ist noch nicht endgültig geklärt. Weiterhin sind nicht nur Anteile der MHC-Gene variabel, die die Struktur der MHC-Moleküle codieren, sondern auch die regulierenden Abschnitte. Inwieweit die differentielle Regulierung von MHC-Molekülen Einfluß auf die Differenzierung von selbst und nicht-selbst besitzt, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

4.3 Nomenklatur

Das WHO Nomenclature Committee legt die Richtlinien für die Benennung sowohl bestehender, als auch neuer Gene, Allele und serologischer Spezifitäten fest.

In der derzeit gültigen Nomenklatur von 2000 werden serologisch 28 verschiedene HLA-A, 62 HLA-B, 10 HLA-C_w-, 4 HLA-E und 4 HLA-G-Spezifitäten im Bereich der Klasse I-Gene unterschieden (Tab 3.1). Mit molekularbiologischen Methoden lassen sich diese Spezifitäten auf 168 HLA-A, 344 HLA-B und 90 HLA-C_w Allele differenzieren (Tab. 3.2a und 3.2b). Im Bereich der Klasse-II-Gene werden 21 serologische HLA-DRB1-Spezifitäten unterschieden, molekularbiologisch läßt sich dies jedoch auf 242 DRB1 und 2 DRA-Allele ausweiten. Darüberhinaus werden die serologischen DR-Spezifitäten DR51 (molekularbiologisch DRB5*, gekoppelt mit DRB1*15, 16), DR52 (DRB*3, gekoppelt mit DRB1*03,11,12,13,14) und DR53

(DRB4*, gekoppelt mit DRB1*04,07,09) exprimiert (Abb.3.3, Verwendung dieser Assoziation für die Typisierung siehe Ergebnisteil).

Die neun serologisch definierten HLA-DQ-Spezifitäten können auf der DNA-Ebene in 20 DQA1 und 45 DQB1-Allele unterteilt werden. Den sechs zellulär definierten DPw-Spezifitäten stehen 8 DPA1 und 88 DPB1-Allele gegenüber. Der HLA-DM-Genort splittet sich nur in je 4 Allele für DMA und DMB.

Tab3.1 serologische Spezifitäten

A	B	C	DR	DQ
A1	B5	Cw1	DR1	DQ1
A2	B7	Cw2	DR103	DQ2
A203	B703	Cw3	DR2	DQ3
A210	B8	Cw4	DR3	DQ4
A3	B12	Cw5	DR4	DQ5(1)
A9	B13	Cw6	DR5	DQ6(1)
A10	B14	Cw7	DR6	DQ7(3)
A11	B15	Cw8	DR7	DQ8(3)
A19	B16	Cw9(w3)	DR8	DQ9(3)
A23(9)	B17	Cw10(w3)	DR9	
A24(9)	B18		DR10	
A2403	B21		DR11(5)	
A25(10)	B22		DR12(5)	
A26(10)	B27		DR13(6)	
A28	B2708		DR14(6)	
A29(19)	B35		DR1403	
A30(19)	B37		DR1404	
A31(19)	B38(16)		DR15(2)	
A32(19)	B39(16)		DR16(2)	
A33(19)	B3901		DR17(3)	
A34(10)	B3902		DR18(3)	
A36	B40			
A43	B4005		DR51	
A66(10)	B41		DR52	
A68(28)	B42		DR53	
A69(28)	B44(12)			
A74(19)	B45(12)			
A80	B46			
	B47			
	B48			
	B49(21)			
	B50(21)			
	B51(5)			
	B5102			
	B5103			
	B52(5)			
	B53			
	B54(22)			
	B55(22)			

	B56(22)			
	B57(17)			
	B58(17)			
	B59			
	B60(40)			
	B61(40)			
	B62(15)			
	B63(15)			
	B64(14)			
	B65(14)			
	B67			
	B70			
	B71(70)			
	B72(70)			
	B73			
	B75(15)			
	B76(15)			
	B77(15)			
	B78			
	B81			
	Bw4			
	Bw6			

Tab. 3.2a Existierende HLA-Klasse-I-Allele Anfang 2000

HLA-A	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-B	HLA-B	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-C
A*0101	A*1105	A*31012	B*07021	B*1518	B*2710	B*3907	B*4415	B*5505	Cw*0102	Cw*12041
A*0102	A*1106	A*3102	B*07022	B*1519	B*2711	B*3908	B*4416	B*5507	Cw*0103	Cw*12042
A*0103	A*2301	A*3103	B*07023	B*1520	B*2712	B*3909	B*4417	B*5508	Cw*0104	Cw*1205
A*0104N	A*2302	A*3104	B*0703	B*1521	B*2713	B*3910	B*4418	B*5509	Cw*02021	Cw*1206
A*0105N	A*2303	A*3201	B*0704	B*1522	B*2714	B*3911	B*4419N	B*5601	Cw*02022	Cw*1207
A*0106	A*2304	A*3202	B*0705	B*1523	B*2715	B*3912	B*4501	B*5602	Cw*02023	Cw*1301
A*02011	A*2305	A*3203	B*0706	B*1524	B*2716	B*3913	B*4502	B*5603	Cw*02024	Cw*14021
A*02012	A*2402101	A*3204	B*0707	B*1525	B*2717	B*3914	B*4601	B*5604	Cw*0203	Cw*14022
A*02013	A*2402102L	A*3301	B*0708	B*1526N	B*2718	B*3915	B*4602	B*5605	Cw*0302	Cw*1403
A*02014	A*24022	A*3303	B*0709	B*1527	B*2719	B*3916	B*4701	B*5606	Cw*03031	Cw*1404
A*0202	A*24031	A*3304	B*0710	B*1528	B*2720	B*3917	B*4702	B*5607	Cw*03032	Cw*15021
A*0203	A*24032	A*3305	B*0711	B*1529	B*3501	B*3918	B*4703	B*5701	Cw*03041	Cw*15022
A*0204	A*2404	A*3401	B*0712	B*1530	B*3502	B*3919	B*4801	B*5702	Cw*03042	Cw*1503
A*0205	A*2405	A*3402	B*0713	B*1531	B*3503	B*3920	B*4802	B*5703	Cw*0305	Cw*1504
A*0206	A*2406	A*3601	B*0714	B*1532	B*3504	B*3921	B*4803	B*5704	Cw*0306	Cw*15051
A*0207	A*2407	A*4301	B*0715	B*1533	B*3505	B*40011	B*4804	B*5705	Cw*0307	Cw*15052
A*0208	A*2408	A*6601	B*0716	B*1534	B*3506	B*40012	B*4805	B*5706	Cw*0308	Cw*1506
A*0209	A*2409N	A*6602	B*0717	B*1535	B*3507	B*4002	B*4806	B*5801	Cw*0309	Cw*1507
A*0210	A*2410	A*6603	B*0718	B*1536	B*3508	B*4003	B*4807	B*5802	Cw*0310	Cw*1508
A*0211	A*2411N	A*68011	B*0719	B*1537	B*35091	B*4004	B*4901	B*5804	Cw*0311	Cw*1509
A*0212	A*2413	A*68012	B*0720	B*1538	B*35092	B*4005	B*5001	B*5805	Cw*0312	Cw*1601
A*0213	A*2414	A*6802	B*0801	B*1539	B*3510	B*4006	B*5002	B*5901	Cw*04011	Cw*1602
A*0214	A*2415	A*68031	B*0802	B*1540	B*3511	B*4007	B*5004	B*67011	Cw*04012	Cw*16041
A*0215N	A*2416	A*68032	B*0803	B*1542	B*3512	B*4008	B*51011	B*67012	Cw*0403	Cw*1701
A*0216	A*2417	A*6804	B*0804	B*1543	B*3513	B*4009	B*51012	B*7301	Cw*0404	Cw*1702

A*02171	A*2418	A*6805	B*0805	B*1544	B*3514	B*4010	B*51013	B*7801	Cw*0405	Cw*1703
A*02172	A*2419	A*6806	B*0806	B*1545	B*3515	B*4011	B*51014	B*78021	Cw*0406	Cw*1801
A*0218	A*2420	A*6807	B*0807	B*1546	B*3516	B*4012	B*51021	B*78022	Cw*0407	Cw*1802
A*0219	A*2421	A*6808	B*0808N	B*1547	B*3517	B*4013	B*51022	B*7803	Cw*0501	
A*0220	A*2422	A*6809	B*0809	B*1548	B*3518	B*4014	B*5103	B*7804	Cw*0502	
A*0221	A*2423	A*6810	B*0810	B*1549	B*3519	B*4015	B*5104	B*8101	Cw*0503	
A*0222	A*2424	A*6811N	B*1301	B*1550	B*3520	B*4016	B*5105	B*8201	Cw*0504	
A*0224	A*2425	A*6812	B*1302	B*1551	B*3521	B*4018	B*5106	B*8202	Cw*0602	
A*0225	A*2426	A*6813	B*1303	B*1552	B*3522	B*4019	B*5107	B*8301	Cw*0603	
A*0226	A*2501	A*6814	B*1304	B*1553	B*3523	B*4020	B*5108		Cw*0604	
A*0227	A*2502	A*6815	B*1401	B*1554	B*3524	B*4021	B*5109		Cw*0605	
A*0228	A*2503	A*6816	B*1402	B*1555	B*3525	B*4022N	B*5110		Cw*07011	
A*0229	A*2601	A*6817	B*1403	B*1556	B*3526	B*4023	B*5111N		Cw*07012	
A*0230	A*2602	A*6901	B*1404	B*1557	B*3527	B*4024	B*5112		Cw*0702	
A*0231	A*2603	A*7401	B*1405	B*1558	B*3528	B*4025	B*51131		Cw*0703	
A*0232N	A*2604	A*7402	B*14061	B*1559	B*3529	B*4026	B*51132		Cw*0704	
A*0233	A*2605	A*7403	B*14062	B*1801	B*3530	B*4027	B*5114		Cw*0705	
A*0234	A*2606	A*7404	B*1501101	B*1802	B*3531	B*4028	B*5115		Cw*0706	
A*0235	A*2607	A*8001	B*1501102N	B*1803	B*3532	B*4101	B*5116		Cw*0707	
A*0236	A*2608		B*15012	B*1804	B*3533	B*4102	B*5117		Cw*0708	
A*0237	A*2609		B*15013	B*1805	B*3701	B*4103	B*5118		Cw*0709	
A*0238	A*2610		B*1502	B*1806	B*3702	B*4201	B*5119		Cw*0710	
A*0239	A*2611N		B*1503	B*1807	B*3801	B*4202	B*5120		Cw*0711	
A*0240	A*2612		B*1504	B*1808	B*38021	B*4402	B*5121		Cw*0712	
A*0241	A*2613		B*1505	B*1809	B*38022	B*44031	B*52011		Cw*0713	
A*03011	A*2614		B*1506	B*1810	B*3803	B*44032	B*52012		Cw*0714	
A*03012	A*2901		B*1507	B*2701	B*3804	B*4404	B*5202		Cw*0801	
A*03013	A*2902		B*1508	B*2702	B*39011	B*4405	B*5301		Cw*0802	
A*0302	A*2903		B*1509	B*2703	B*39013	B*4406	B*5302		Cw*0803	
A*0303N	A*2904		B*1510	B*2704	B*39014	B*4407	B*5303		Cw*0804	
A*0304	A*3001		B*1511	B*27052	B*39021	B*4408	B*5304		Cw*0805	
A*0305	A*3002		B*1512	B*27053	B*39022	B*4409	B*5305		Cw*0806	
A*11011	A*3003		B*1513	B*27054	B*3903	B*4410	B*5401		Cw*0807	
A*11012	A*3004		B*1514	B*2706	B*3904	B*4411	B*5501		Cw*12021	
A*1102	A*3006		B*1515	B*2707	B*3905	B*4412	B*5502		Cw*12022	
A*1103	A*3007		B*1516	B*2708	B*39061	B*4413	B*5503		Cw*12023	
A*1104	A*3008		B*1517	B*2709	B*39062	B*4414	B*5504		Cw*1203	

Tab.3.2b: Existierende HLA-Klasse-II-Merkmale Anfang 2000

HLA-DRB1	HLA-DRB1	HLA-DRB1	HLA-DRB1	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DPB1	HLA-DPB1
DRB1*0101	DRB1*0434	DRB1*1127	DRB1*1402	DQA1*0101	DQB1*0201	DPB1*01011	DPB1*6001
DRB1*01021	DRB1*07011	DRB1*1128	DRB1*1403	DQA1*01021	DQB1*0202	DPB1*01012	DPB1*6101N
DRB1*01022	DRB1*07012	DRB1*1129	DRB1*1404	DQA1*01022	DQB1*0203	DPB1*02012	DPB1*6201
DRB1*0103	DRB1*0703	DRB1*1130	DRB1*1405	DQA1*0103	DQB1*03011	DPB1*02013	DPB1*6301
DRB1*0104	DRB1*0704	DRB1*1131	DRB1*1406	DQA1*0104	DQB1*03012	DPB1*0202	DPB1*6401N
DRB1*0105	DRB1*0801	DRB1*1132	DRB1*1407	DQA1*0105	DQB1*0302	DPB1*0301	DPB1*6501
DRB1*0106	DRB1*08021	DRB1*1133	DRB1*1408	DQA1*0106	DQB1*03032	DPB1*0401	DPB1*6601
DRB1*03011	DRB1*08022	DRB1*1134	DRB1*1409	DQA1*0201	DQB1*03033	DPB1*0402	DPB1*6701
DRB1*03012	DRB1*08032	DRB1*1135	DRB1*1410	DQA1*03011	DQB1*0304	DPB1*0501	DPB1*6801
DRB1*03021	DRB1*08041	DRB1*1136	DRB1*1411	DQA1*0302	DQB1*0305	DPB1*0601	DPB1*6901
DRB1*03022	DRB1*08042	DRB1*1137	DRB1*1412	DQA1*0303	DQB1*0306	DPB1*0801	DPB1*7001
DRB1*0303	DRB1*08043	DRB1*1201	DRB1*1413	DQA1*0401	DQB1*0307	DPB1*0901	DPB1*7101
DRB1*0304	DRB1*0805	DRB1*12021	DRB1*1414	DQA1*05011	DQB1*0308	DPB1*1001	DPB1*7201
DRB1*0305	DRB1*0806	DRB1*12022	DRB1*1415	DQA1*05012	DQB1*0309	DPB1*11011	DPB1*7301

DRB1*0306	DRB1*0807	DRB1*12032	DRB1*1416	DQA1*0502	DQB1*0310	DPB1*11012	DPB1*7401
DRB1*0307	DRB1*0808	DRB1*1204	DRB1*1417	DQA1*0503	DQB1*0401	DPB1*1301	DPB1*7501
DRB1*0308	DRB1*0809	DRB1*1205	DRB1*1418	DQA1*0504	DQB1*0402	DPB1*1401	DPB1*7601
DRB1*0309	DRB1*0810	DRB1*1206	DRB1*1419	DQA1*0505	DQB1*05011	DPB1*1501	DPB1*7701
DRB1*0310	DRB1*0811	DRB1*1301	DRB1*1420	DQA1*06011	DQB1*05012	DPB1*1601	DPB1*7801
DRB1*0311	DRB1*0812	DRB1*13021	DRB1*1421	DQA1*06012	DQB1*0502	DPB1*1701	DPB1*7901
DRB1*0312	DRB1*0813	DRB1*13022	DRB1*1422		DQB1*05031	DPB1*1801	DPB1*8001
DRB1*0313	DRB1*0814	DRB1*13031	DRB1*1423		DQB1*05032	DPB1*1901	DPB1*8101
DRB1*0314	DRB1*0815	DRB1*13032	DRB1*1424		DQB1*0504	DPB1*20011	DPB1*8201
DRB1*0315	DRB1*0816	DRB1*1304	DRB1*1425		DQB1*06011	DPB1*20012	DPB1*8301
DRB1*0316	DRB1*0817	DRB1*1305	DRB1*1426		DQB1*06012	DPB1*2101	DPB1*8401
DRB1*0317	DRB1*0818	DRB1*1306	DRB1*1427		DQB1*06013	DPB1*2201	DPB1*8501
DRB1*04011	DRB1*0819	DRB1*13071	DRB1*1428		DQB1*0602	DPB1*2301	
DRB1*04012	DRB1*0820	DRB1*13072	DRB1*1429		DQB1*0603	DPB1*2401	
DRB1*0402	DRB1*0821	DRB1*1308	DRB1*1430		DQB1*06041	DPB1*2501	
DRB1*04031	DRB1*09012	DRB1*1309	DRB1*1431		DQB1*06042	DPB1*26011	
DRB1*04032	DRB1*1001	DRB1*1310	DRB1*1432		DQB1*06051	DPB1*26012	
DRB1*0404	DRB1*11011	DRB1*1311	DRB1*1433		DQB1*06052	DPB1*2701	
DRB1*04051	DRB1*11012	DRB1*1312	DRB1*1434		DQB1*0606	DPB1*2801	
DRB1*04052	DRB1*11013	DRB1*1313	DRB1*1435		DQB1*0607	DPB1*2901	
DRB1*0406	DRB1*1102	DRB1*13141	DRB1*1436		DQB1*0608	DPB1*3001	
DRB1*0407	DRB1*1103	DRB1*13142	DRB1*15011		DQB1*0609	DPB1*3101	
DRB1*0408	DRB1*11041	DRB1*1315	DRB1*15012		DQB1*0610	DPB1*3201	
DRB1*0409	DRB1*11042	DRB1*1316	DRB1*15021		DQB1*06111	DPB1*3301	
DRB1*0410	DRB1*1105	DRB1*1317	DRB1*15022		DQB1*06112	DPB1*3401	
DRB1*0411	DRB1*1106	DRB1*1318	DRB1*15023		DQB1*0612	DPB1*3501	
DRB1*0412	DRB1*1107	DRB1*1319	DRB1*1503		DQB1*0613	DPB1*3601	
DRB1*0413	DRB1*11081	DRB1*1320	DRB1*1504		DQB1*0614	DPB1*3701	
DRB1*0414	DRB1*11082	DRB1*1321	DRB1*1505		DQB1*0615	DPB1*3801	
DRB1*0415	DRB1*1109	DRB1*1322	DRB1*1506		DQB1*0616	DPB1*3901	
DRB1*0416	DRB1*1110	DRB1*1323	DRB1*1507		DQB1*0617	DPB1*4001	
DRB1*0417	DRB1*1111	DRB1*1324	DRB1*1508			DPB1*4101	
DRB1*0418	DRB1*1112	DRB1*1325	DRB1*1509			DPB1*4401	
DRB1*0419	DRB1*1113	DRB1*1326	DRB1*16011			DPB1*4501	
DRB1*0420	DRB1*1114	DRB1*1327	DRB1*16012			DPB1*4601	
DRB1*0421	DRB1*1115	DRB1*1328	DRB1*16021			DPB1*4701	
DRB1*0422	DRB1*1116	DRB1*1329	DRB1*16022			DPB1*4801	
DRB1*0423	DRB1*1117	DRB1*1330	DRB1*1603			DPB1*4901	
DRB1*0424	DRB1*1118	DRB1*1331	DRB1*1604			DPB1*5001	
DRB1*0425	DRB1*1119	DRB1*1332	DRB1*1605			DPB1*5101	
DRB1*0426	DRB1*1120	DRB1*1333	DRB1*1607			DPB1*5201	
DRB1*0427	DRB1*1121	DRB1*1334	DRB1*1608			DPB1*5301	
DRB1*0428	DRB1*1122	DRB1*1335				DPB1*5401	
DRB1*0429	DRB1*1123	DRB1*1336				DPB1*5501	
DRB1*0430	DRB1*1124	DRB1*1337				DPB1*5601	
DRB1*0431	DRB1*1125	DRB1*1338				DPB1*5701	
DRB1*0432	DRB1*1126	DRB1*1339				DPB1*5801	
DRB1*0433	DRB1*1127	DRB1*1401				DPB1*5901	

Die Bezeichnung einer HLA-Spezifität setzt sich aus dem Namen des Genortes und der Nummer der Spezifität zusammen. Bei der Angabe der Numerierung wird die individuelle Spezifitätennummer (z.B. DRB1*0401) angegeben. Gelegentlich wird in Klammern die zugehörige serologische Spezifität angegeben (z.B. (B15)). Die Einführung eines w (workshop) zwischen

Genortsbezeichnung und Spezifitätsnummer charakterisiert die Definition dieser Spezifität als vorläufig. Sie wird gegenwärtig für die Bw4- und Bw6-Epitope zur Unterscheidung von anderen HLA-B-Spezifitäten, sowie für HLA-C zur Unterscheidung von anderen Komplementfaktoren verwendet.

Die Bezeichnung eines Allels bzw. einer Allelgruppe setzt sich ebenfalls aus der Genortsbezeichnung und einer Allelnummer zusammen, die beide durch einen "*" voneinander getrennt sind. Da serologische und zelluläre Methoden nicht in der Lage sind, solch eine feine Unterscheidung vorzunehmen, setzt das "*" voraus, daß das betreffende Allel molekularbiologisch bestimmt wurde. So ist auf serologischer Ebene nur eine niedrigauflösende Typisierung möglich (2 Ziffern, Tab 3.1). Mittels einer hochauflösenden Typisierung umfaßt die Allelnummer üblicherweise 4 Ziffern, wobei die ersten beiden eine Gruppe von Allelen, die ein bestimmtes Antigen erkennen, angeben. Die letzten beiden Ziffern sind für die Differenzierung dieser Gruppe in ein spezifisches Allel, auch als Subtyp bezeichnet, verantwortlich:

HLA-DQB1*0302	≡	DQB1*	03	02
		Genort	Hauptgruppe	spezifisches Allel

Eine fünfte Ziffer wird zur Bezeichnung eines Allels angefügt, welches sich nur durch eine stumme Mutation in der codierenden Sequenz unterscheidet, d.h. bei dem es nicht zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz kommt. So finden sich für DRB1*1601 2 verschiedene DNA-Sequenzen, die als DRB1*16011 und DRB1*16012 bezeichnet werden. Ein "N" am Ende der Ziffernsequenz entspricht einer fehlenden Expression des vorliegenden Allels. Damit können auch bisherige serologische "Blanks" durch eine molekularbiologische Typisierung gelöst werden. Der Subtyp DRB4*01012N exprimiert kein Protein und ist deshalb serologisch nicht nachweisbar (=Blank, Null-Allel), auf DNA-Ebene allerdings ist er nachweisbar. Inwieweit dies klinische Relevanz besitzt, muß allerdings noch untersucht werden. Die Ziffern fünf bis sieben stehen für eine Mutation außerhalb der kodierenden Region (Intron, HLA-DRB4*0103101). Handelt es sich um ein Null-Allel mit einer Mutation außerhalb der kodierenden Region folgt auf die Ziffern fünf bis sieben ein "N" (HLA-DRB4*0103102N). Neue Allele werden nur unter Angabe von eindeutigen DNA-Sequenzinformationen vom Nomenklaturkomitee akzeptiert. Die einzelnen Allele und Spezifitäten der HLA-Klasse I und II-Moleküle sind in den Tabellen 3.2a und 3.2b gemäß der derzeit gültigen Nomenklatur zusammengefaßt.

Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden werden ständig neue Allele definiert und differenziert, für die es keine serologischen oder zellulären Korrelationen gibt. Auch sind bisher

nicht alle Bevölkerungsgruppen der Welt typisiert. Zur Zeit wächst die Zahl von HLA-Allelen pro Woche um etwa 2 !

4.4 Populationsgenetik

Bei jedem Individuum werden zwei Allele jedes HLA-Genortes exprimiert. Differieren beide Allele voneinander, so wird das Individuum als heterozygot, bei Identität als homozygot für diesen Genort bezeichnet. Diese Expression der HLA-Moleküle erfolgt in kodominanter Weise, d.h. bei einem heterozygoten Individuum sind beide Allele auch im Phänotyp vertreten. Ein "Satz" von Allelen aller benachbarten HLA-Genorte, die gemeinsam auf einem Chromosom liegen und daher gemeinsam vererbt werden, wird als HLA-Haplotyp bezeichnet. Da Rekombinationen im Bereich des HLA-Komplexes verhältnismäßig selten beobachtet werden (<3%), werden einzelne HLA-Haplotypen normalerweise über mehrere Generationen als Einheit vererbt. Bei der Vererbung der HLA-Merkmale erhalten die Kinder je einen väterlichen und je einen mütterlichen Haplotyp. Bei leiblichen Geschwistern ergeben sich, unter Auslassung rekombinierender Vorgänge, folgende Möglichkeiten: Ein Geschwisterpaar kann vollidentisch, haploidentisch oder nicht-identisch sein.

Tab. 3.4: Kind 1 ist vollidentisch zu Kind 5, haploidentisch zu den Geschwistern 2, 3, 6 und 7 und nicht-identisch zu Kind 4 und 8.

	Vater								Mutter							
HLA-A	1				2				-				32			
HLA-B	7				8				62				39			
HLA-DR	3				4				1				7			
Kinder	1		2		3		4		5		6		7		8	
HLA-A	1	-	1	32	2	-	2	32	-	1	-	2	32	1	32	2
HLA-B	7	62	7	39	8	62	8	39	62	7	62	8	39	7	39	8
HLA-DR	3	1	3	7	4	1	4	7	1	3	1	4	7	3	7	4

Bei Vollidentität stimmen die HLA-Merkmale der Geschwister in beiden Haplotypen überein, während sie bei der Haploidentität einen väterlichen oder mütterlichen Haplotyp gemeinsam haben. Statistisch ergibt sich für die Vollidentität und die Nicht-Identität eine Wahrscheinlichkeit von je 25 Prozent, während eine Haploidentität in 50 Prozent der Fälle erwartet wird. Eltern und ihre Kinder sind jeweils haploidentisch. So beträgt die theoretische Wahrscheinlichkeit, ein vollidentisches Geschwister als Spender für eine Nieren- oder Knochenmarktransplantation zu finden 25 Prozent. Erfreulicherweise liegen die tatsächlichen Erfolgsquoten bei der Suche nach vollidentischen Geschwistern im Bereich von 30 bis 35 Prozent. Darüberhinaus können im erweiterten Familienkreis in etwa 5 Prozent partiell HLA-kompatible Spender gefunden werden. Diese sind

oftmals haploidentisch oder weisen soweit Übereinstimmungen mit dem Patienten auf, daß sie als Lebendnierenspender bedingt geeignet sind.

Als Population bezeichnet man eine Gruppe von Individuen, die eine Fortpflanzungsgemeinschaft bilden und definierte Regionen bewohnen. Die Gesamtheit der Gene und ihrer allelischen Variabilität einer Population bildet einen Genpool. Verschiedene Bevölkerungen der Erde unterscheiden sich bezüglich ihres Genpools. Infolge geschichtlicher Ereignisse können diese Genpools in unterschiedlichem Maße in einen Austausch treten (Genfluß). Aufgrund unterschiedlicher Grundausstattung bei der Begründung neuer Bevölkerungen (Gründer-Effekt), sowie durch Besonderheiten in der Fortpflanzungsgeschichte (Mutation, Selektion, Gendrift, Migration) einzelner Bevölkerungen, können sich innerhalb einer Bevölkerung unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen einzelner Allele polymorpher Gene entwickeln. Derartige bevölkerungsspezifische Unterschiede lassen sich auch für die Verteilung der HLA-Allele bzw. HLA-Spezifitäten nachweisen. Die Kenntnis dieser Verteilungsunterschiede ist nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht (Ethnologie, Evolutionsbiologie) interessant, sondern hat auch medizinische Relevanz im Bereich der Organtransplantation und des Studiums der Immungenetik von Krankheiten. So hängt die Wahrscheinlichkeit einen unverwandten HLA-kompatiblen Spender für eine Organtransplantation zu finden unter anderem von der Häufigkeit der HLA-Allelkombination des Empfängers in der Allgemeinbevölkerung ab, was die Wartezeit auf eine Organtransplantation beeinflusst. Für die Immungenetik verschiedener Erkrankungen konnte gezeigt werden, daß eine Korrelation zwischen den positiv assoziierten HLA-Allelen und der Erkrankungshäufigkeit bestehen kann und somit die bevölkerungsspezifische Häufigkeit einer Erkrankung durchaus von der Häufigkeitsverteilung der Allele in dieser Bevölkerungsgruppe abhängen kann. Zur Analyse eines Genpools und der Vorhersage der genetischen Veränderungen innerhalb einer Population wurde von Hardy und Weinberg ein gleichnamiges Gesetz entwickelt. Dieses Populationsgesetz stellt eine große Hilfe bei der Beurteilung der Verteilung von HLA-Spezifitäten innerhalb einer bestimmten Population dar. Abweichungen der beobachteten Genfrequenzen oder der Verteilung von Homo- und Heterozygoten von den Erwartungswerten gemäß des Hardy-Weinberg-Gesetzes geben Aufschluß über Selektions- und andere Vorgänge, die die Zusammensetzung eines Genpools beeinflussen.

Ein wesentliches Charakteristikum des HLA-Komplexes ist die Existenz eines Kopplungsungleichgewichts (linkage disequilibrium) zwischen den Allelen verschiedener HLA-Genorte. Hierunter versteht man eine vom Erwartungswert abweichende Häufigkeit der gemeinsamen Vererbung allelischer Varianten von 2 oder mehreren benachbarten Genen. Untersuchungen eines Marker-Gens geben Aufschluß über Krankheitsassoziationen des gekoppelten und für die Krankheit verantwortlichen Gens. Ein Kopplungsungleichgewicht wird beobachtet, wenn neue Gene oder Allele in einem Genpool auftreten (Mutation, Genfluß). Durch

Rekombinationsereignisse werden diese neuen Gene oder Allele nachfolgend innerhalb der Population auf verschiedene Haplotypen verteilt, so daß sich im Laufe der Zeit ein Gleichgewicht hinsichtlich ihrer Verteilung einstellt. Je geringer die Distanz zwischen 2 Genorten ist, desto länger dauert es, bis sich dieses Gleichgewicht einstellt. Es existieren sowohl im Bereich der HLA-Klasse-I als auch Klasse-II-Genorte Kopplungsungleichgewichte, besonders zwischen HLA-DR und -DQ. Die für die Entstehung und Aufrechterhaltung verantwortlichen Mechanismen sind noch nicht geklärt.

4.5 Struktur der HLA-Klasse I-Moleküle und –Gene

HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer schweren polymorphen α -Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa und einer nicht-polymorphen leichten Kette mit einem MG von 11,5 kDa, dem β_2 -Mikroglobulin. Dessen Bezeichnung rührt von seinem Wanderungsverhalten in der Elektrophorese (β -Mobilität), seiner Größe und seinem Lösungsverhalten her. Die Besonderheit ist, daß dessen Gen nicht wie das restliche HLA auf Chromosom 6, sondern auf Chromosom 15 liegt. Die glykosylierte α -Kette besteht aus 3 extrazellulär liegenden, 90 Aminosäuren langen Domänen ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), einer transmembranösen Region und einem zytosolischen Anteil. Ferner liegt im Übergangsbereich von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne ein N-gebundener Kohlenhydratanteil.

$\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne bilden mittels einer β -Faltblattstruktur eine Plattform, auf der 2 α -Helices parallel angeordnet sind und damit die Wände der Antigenbindungsstelle bilden (Abb. 3.4). Diese Antigenbindungsstelle ist $25 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 11 \text{ \AA}$ groß und bindet Proteinfragmente mit einer Länge von 8 bis 11 Aminosäuren. Die Spezifität der HLA-Moleküle in der Antigenpräsentation wird im wesentlichen durch den allelischen Polymorphismus bestimmt (Abschnitt 3.2). Dieser Polymorphismus wird bei den HLA-Klasse-I-Molekülen hauptsächlich durch Sequenzvariabilität der in den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen liegenden hypervariablen Regionen (HVR) bedingt. Die Sequenz im Bereich der $\alpha 3$ -Domäne ist hochgradig konserviert und weist, wie auch das β_2 -Mikroglobulin, eine Homologie zur konstanten Region der Immunglobuline auf. Die $\alpha 3$ -Domäne enthält ebenso wie die $\alpha 2$ -Domäne (bedingt durch eine Schleifenbildung mit etwa 63 Aminosäuren) eine Disulfidbrücke. Die nicht-kovalente Assoziation mit dem β_2 -Mikroglobulin ist im Bereich der $\alpha 3$ -Domäne lokalisiert und stellt eine Plattform dar, der die Antigenbindungsstelle aufsitzt und so die funktionell wichtige Konformation stabilisiert. Die kurze transmembranöse Region ist etwa 25 Aminosäuren lang und stellt das Verbindungsglied zwischen dem etwa 30 Aminosäuren langen, intrazellulären Anker dar, der wiederum ein Bindeglied zwischen HLA-Molekül und intrazellulärer Struktur sein könnte, da in

dessen Sequenz hochgradig konservierte Regionen mit Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen (Proteinkinase A, pp60 src Tyrosinkinase) und ein Glutaminrest (Transpeptidierung) vorhanden sind. Das HLA-Klasse-I-Gen erstreckt sich über eine Gesamtlänge von 3500 Basenpaaren und besteht aus 8 kodierenden Regionen (Exons), die für verschiedene Funktionen verantwortlich sind und durch regulatorische, nicht kodierende Abschnitte (Introns) voneinander getrennt sind. Das erste Exon kodiert die Signalsequenz. Es folgen die 3 extrazellulären Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) und die Transmembranregion. Der zytoplasmatische Bereich sowie die 3'-nicht-translatierte Region werden durch die restlichen 3 Exons codiert. Das Gen für das β_2 -Mikroglobulin besteht aus 4 Exons und 3 Introns. (Im Gegensatz zur schweren Kette des Klasse-I-Heterodimers).

4.6 Struktur der HLA-Klasse-II-Moleküle und -Gene

Die heterodimeren HLA-Klasse-II-Moleküle bestehen aus einer schweren α -Kette, je nach Glykosylierungsgrad mit einem Molekulargewicht zwischen 33 und 35 kDa, und einer leichteren β -Kette mit einem Molekulargewicht von 26-29 kDa. Beide Ketten besitzen sowohl 2 extrazelluläre Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\beta 1$, $\beta 2$), als auch eine Transmembranregion und einen intrazellulären C-terminalen Abschnitt. Die dreidimensionale Struktur weist eine große Analogie zum HLA-Klasse-I-Molekül auf.

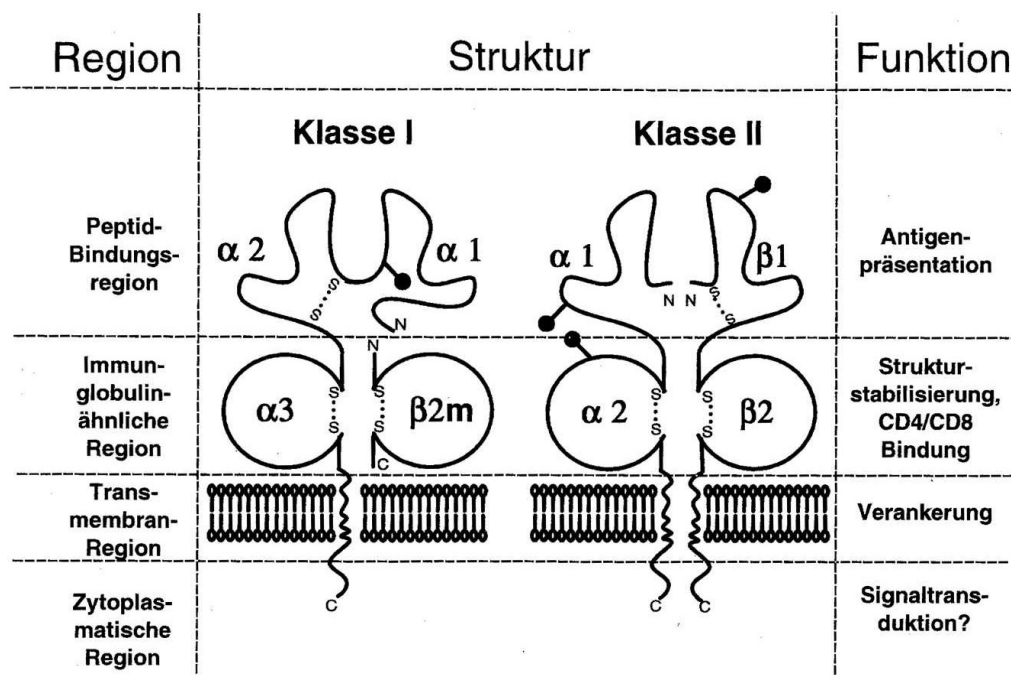


Abb. 3.4: Struktur von HLA-Klasse-I- und II-Molekülen

Die N-terminalen, 85-95 Aminosäuren langen α 1- und β 1- polymorphen Domänen sind maßgeblich an der Bildung der Antigenbindungsstelle beteiligt. Diese besteht ebenfalls aus einer achtsträngigen β -Faltblattstruktur und ist aus 2 α -helicalen Anteilen aufgebaut (Abb. 3.4). Allerdings ist sie im Gegensatz zum Klasse-I-Molekül nach beiden Seiten offen, was zu einer Bindung längerer Proteinfragmente (15-24 Aminosäuren) führt. Möglicherweise erfolgt die Oberflächenexpression von Klasse-II-Heterodimeren als parallele Dimere. Die Antigenbindungsstellen der beiden Heterodimere sind hierbei so orientiert, daß zwei T-Lymphozyten-Rezeptor-Moleküle gleichzeitig binden können. Dieser Dimerisationsmechanismus könnte für die Signaltransduktion von Bedeutung sein. Wie beim Klasse-I-Molekül weist die α 1-Domäne der HLA-Klasse-II- α -Kette keine Disulfidbrücke auf, während diese bei der β 1-Domäne, analog zur α 2-Domäne des Klasse-I-Moleküls, vorhanden ist. Ähnlich wie bei Klasse-I-Molekülen sind die meisten variablen Aminosäurepositionen im Bereich der N-terminalen Domänen zu finden. So besitzen die membranständigen Domänen α 2 und β 2 (je 95 Aminosäuren) eine Homologie zu den konstanten Regionen der Immunglobuline und enthalten beide eine Disulfidbrücke. Über ein Verbindungspeptid von 11 bis 13 Aminosäuren ist der extrazelluläre Teil, der etwa 80 % des gesamten HLA-Klasse-II-Moleküls ausmacht, mit der transmembranären Region (23 Aminosäuren) und dem intrazellulären Abschnitt (8-15 Aminosäuren) verbunden. Obwohl an der Zelloberfläche nur ein α/β -Heterodimer exprimiert wird, kommt es nach der Biosynthese intrazellulär zur Assoziation der α - und β -Kette mit einem, aufgrund fehlender intra- und interspezies Variabilität, als invariante oder γ -Kette bezeichnetem Molekül. Die humane γ -Kette ist 216 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 35 kDa. Die Funktion dieses auf Chromosom 5 kodierten Moleküls ist die Steuerung des intrazellulären Transports des α/β -Heterodimers und seine korrekte Beladung mit Antigen. Ein HLA-Klasse-II- α -Ketten-Gen setzt sich aus 5 Exons zusammen. Diese kodieren die 5'-nicht-translatierte Region, die Signalsequenz und einige Aminosäuren der α 1-Domäne (Exon 1), den größten Teil der α 1-Domäne (Exon 2), die α 2-Domäne (Exon 3), das Verbindungspeptid, die transmembranäre Region und einen Teil der 3'-nicht-translatierten Region (Exon 4), sowie den Rest der 3'-nicht-translatierten Region (Exon 5). Auch der Aufbau des β -Kettengens entspricht dieser Gliederung der Exon-Intron-Struktur. Im Gegensatz zum α -Ketten-Gen weist das β -Ketten-Gen ein weiteres Exon für den zytoplasmatischen Teil auf.

Neben der Existenz membranständiger HLA-Moleküle konnten in den frühen 70er Jahren auch die löslichen HLA-Produkte nachgewiesen werden. Lösliche HLA-Klasse-I und Klasse-II-Genprodukte, sogenannte sHLA (soluble HLA), können in Serum, Plasma und anderen

Körperflüssigkeiten gefunden werden. Für ihre Entstehung sind wahrscheinlich mehrere Mechanismen verantwortlich. So kann eine Freisetzung von HLA-Molekülen in die lösliche Phase durch Membranzerstörung (shedding), die Erzeugung alternativer Genprodukte, die nicht mehr in der Zellmembran verankert werden können (alternative splicing), oder die enzymatische Ablösung von der Zelloberfläche (proteolytic cleavage) erfolgen. Die hierbei entstehenden Produkte weisen, je nach Mechanismus, charakteristische Molekulargewichte auf und können so voneinander differenziert werden.

4.7 Funktion und Expression der MHC-Moleküle

Im Gegensatz zu Antikörpern, die Antigene in der löslichen Phase erkennen und binden können, erkennen antigenspezifische T-Lymphozyten Antigene nicht in freier oder löslicher Form, sondern nur als Proteinfragmente auf Zelloberflächen, die an MHC-Moleküle gebunden sind. Bei dieser MHC-Restriktion wird die Fähigkeit von T-Lymphozyten, Antigene zu zerstören, auf solche eingeschränkt, die von MHC-Molekülen präsentiert werden. Somit wird der Effektormechanismus der T-Lymphozytenaktivierung an den Ort der Antigenerkennung gebunden, wobei die Antigenbindungsstelle den funktionell wichtigsten Teil des MHC-Moleküls darstellt (und den größten Polymorphismus enthält, siehe Kap. 3.2). Die Antigenerkennung wird durch einen Komplex aus MHC-Molekül, prozessiertem Antigen und T-Lymphozyten-Rezeptor vermittelt. T-Lymphozyten durchlaufen während der Reifung im Thymus eine doppelte Selektion: Da nur T-Lymphozyten an der adaptiven Immunantwort teilnehmen können, die die körpereigenen MHC-Moleküle erkennen, muß diesbezüglich eine positive Selektion stattfinden (Unterscheidung zwischen Selbst- (autolog) und Nicht-Selbst- (allogen) MHC-Molekülen). Eine negative Selektion ist deshalb nötig, damit solche Zellen eliminiert werden, die gegen körpereigene Proteine gerichtet sind, die von Selbst-MHC-Molekülen gebunden werden. Im Falle einer Transplantation ist dies nicht mehr gewährleistet. T-Lymphozyten oder MHC-Moleküle des anderen Individuums können den Effekt der Selektion aufheben, was einen Einfluß auf das Transplantatüberleben haben kann.

Die Einteilung des MHC in 2 Klassen spiegelt die strukturellen Unterschiede wider, auf denen die funktionellen Differenzen im Bereich der Antigenprozessierung und der Antigenpräsentation basieren. So bindet CD8 an MHC-Klasse-I-Moleküle, weshalb CD8-positive, zytotoxische T-Lymphozyten Antigene nur in Zusammenhang mit MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen (Abb. 3.5). Der größte Teil der Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, entstammt der Prozessierung von intrazellulären, zumeist zytoplasmatischen oder nukleären Proteinen. Die Prozessierung von Antigenen erfolgt im zytoplasmatisch gelegenen Proteasom (LMP2 und LMP7) durch enzymatische Degradation des jeweiligen Antigens. Der Transport prozessierter Antigene

vom Zytoplasma aus ins endoplasmatische Retikulum erfolgt unter Beteiligung des TAP1/TAP2-Heterodimers. Dort erfolgt die Assoziation der Peptide mit de novo synthetisierten HLA-Klasse-I- und β_2 -Mikroglobulin-Molekülen. Die entstehenden heterotrimeren Moleküle werden durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

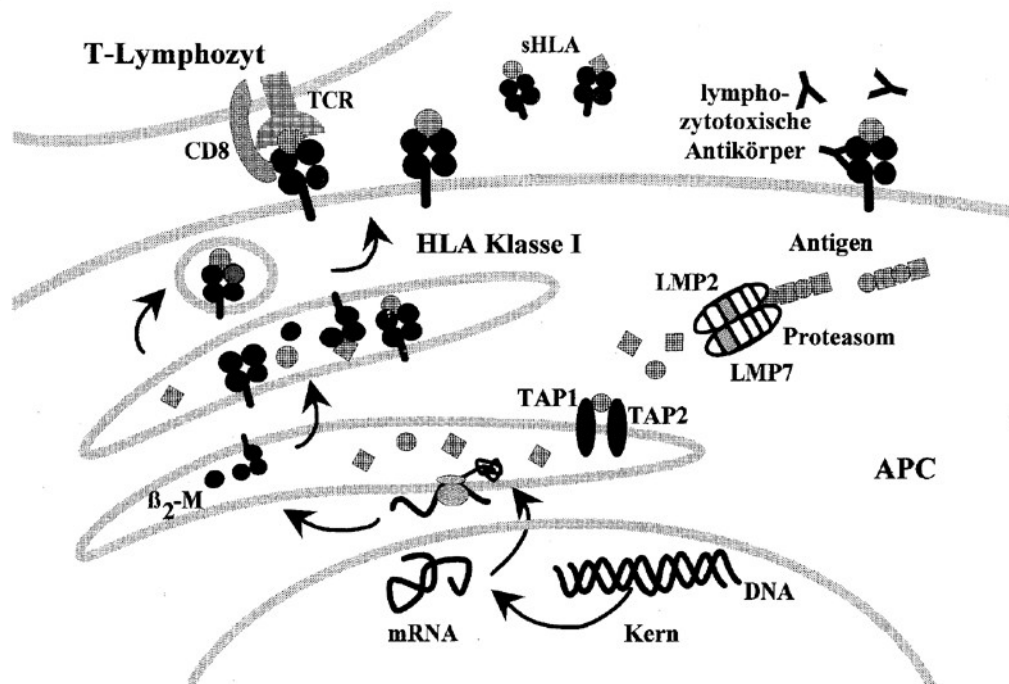


Abb. 3.5: Funktion der HLA-Klasse-I-Moleküle

CD4-positive T-Lymphozyten erkennen prozessierte Antigene im Komplex mit MHC-Klasse II (Abb. 3.6). Die Abfolge dieser Prozessierung und Erkennung läßt sich in folgende Schritte unterteilen:

Zunächst erfolgt die Aufnahme des nativen Proteins in Phagosomen durch Phagozytose. Die nachfolgende Prozessierung, d.h. die proteolytische Degradation des nativen Proteins, findet nach Fusion der Phagosomen mit Lysosomen bei niedrigem pH-Wert statt. Nach der Fusion der Phagolysosomen mit Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums, die MHC-Klasse-II-Moleküle in Assoziation mit der invarianten Kette enthalten, wird die invariante Kette proteolytisch abgespalten und die Antigenbindungsstelle mit prozessiertem Antigen (Proteinfragmenten) beladen. Nach Wanderung zur Zelloberfläche erfolgt die membranständige Expression von antigenbeladenen MHC-Klasse-II-Heterodimeren (Abb. 3.6). Somit führen die unterschiedlichen Abläufe der Antigenprozessierung zu einer Arbeitsteilung zwischen MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen: Klasse-I-Moleküle präsentieren Peptide, die von Proteinen stammen, die innerhalb der Zelle synthetisiert werden. Hierzu zählen Selbst-Peptide und auch intrazellulär synthetisierte Fremdproteine (z.B. virale Proteine). Klasse-II-Moleküle dagegen präsentieren Peptide, die durch Degradation von

Proteinen im Phagolysosom entstanden sind. Diese Proteine können sowohl exogener, als auch endogener Herkunft sein.

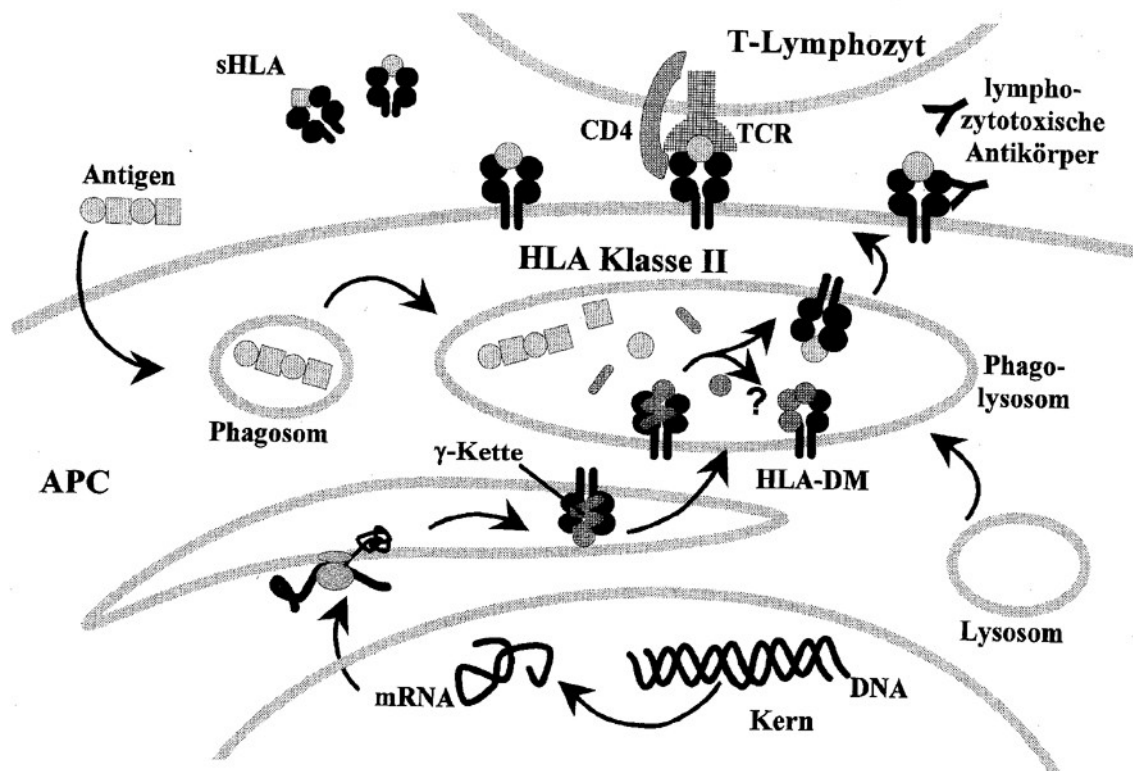


Abb. 3.6: Funktion der HLA-Klasse-II-Moleküle

Die biologische Funktion löslicher HLA-Moleküle ist derzeit noch unklar. Möglicherweise kommt ihnen eine Bedeutung bei der Toleranzentwicklung oder der Steuerung MHC-abhängiger Immunreaktionen zu. Da lösliche HLA-Moleküle bis auf ihren membranassoziierten Anteil intakte Moleküle darstellen, werden sie auch von HLA-Antikörpern erkannt. Es ist somit vorstellbar, daß lösliche HLA-Moleküle einerseits die Bindung von HLA-Antikörpern in der flüssigen Phase neutralisieren und andererseits auch als Antigen die Bildung von HLA-Antikörpern induzieren.

Die Expression von HLA-Molekülen ist nicht allein vom Zell- oder Gewebetyp, sondern von vielen weiteren Stimuli, wie z.B. dem Grad einer Immunantwort abhängig. HLA-Klasse-I-Moleküle werden auf der Mehrzahl kernhaltiger Zellen exprimiert, außer beispielsweise neuronalen Zellen im Gehirn, Spermien und Trophoblastenzellen der Plazenta, die negativ für die Produkte von HLA-A, -B und -C sind. Es gibt jedoch beträchtliche Schwankungen in der Rate der konstitutiven Expression: Auf endokrinen Zellen, Hepatozyten und allen Formen von Muskelzellen werden Klasse-I-Moleküle nur schwach exprimiert, während sie auf Zellen des Gastro- und Urogenitaltraktes deutlich nachweisbar sind. Ebenso besitzt nach Thrombozytentransfusionen wegen der Bildung lymphozytotoxischer Antikörper der Nachweis von Klasse-I-Molekülen auf Thrombozyten klinische Bedeutung. Klasse-II-Moleküle werden nur von einer kleinen Zahl von Zellen, die meist eine Funktion im Rahmen der Immunantwort ausüben, exprimiert. Dies sind einerseits B-Lymphozyten

und aktivierte T-Lymphozyten, die MHC-Klasse-II konstitutiv exprimieren, andererseits Zellen, bei denen durch externe Stimuli MHC-Klasse-II-Moleküle induzierbar sind, Zellen des mononukleären phagozytischen Systems (z.B. Monozyten/Makrophagen, Kupffersche Sternzellen), dendritische Zellen, Langerhans-Zellen der Haut, Mikroglia, endotheliale Zellen, etc. Eine solche Induktion kann im Rahmen von immunologischen Reaktionen bei entzündlichen Veränderungen, sei es bei autoimmunen oder infektiösen Prozessen, bei malignen Erkrankungen oder bei Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation auftreten. Bei Zellen des Immunsystems steht die Neoexpression der HLA-Klasse-II-Moleküle in engem Zusammenhang mit ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APCs). Inwieweit "nicht-immunologische" Zellen ebenfalls zur Antigenpräsentation fähig sind und welche funktionelle Konsequenz sich für die T-Lymphozyten-Aktivierung hieraus ergibt, ist derzeit noch unklar. Sowohl bei der konstitutiven als auch bei der induzierbaren Expression findet im allgemeinen eine Koexpression der Klasse-II-Genorte HLA-DR, -DQ und -DP statt, wobei der Expressionsgrad von HLA-DR am höchsten ist, gefolgt von -DQ und -DP.

Vor der kodierenden Sequenz (stromaufwärts des Startpunktes der Transkription, am 5'Ende) enthalten Gene regulatorische Elemente, auch Boxen genannt, mit hochgradig konservierten DNA-Sequenzen, die für die korrekte Expression des Gens sorgen. Je nach Funktion werden sie in Promotor, Enhancer oder Suppressor, bzw. in positive und negative regulatorische Elemente unterteilt. Im Gegensatz zu Prokaryonten, bei denen die Transkription durch die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor initiiert wird, kann bei Eukaryonten die RNA-Polymerase II nicht alleine den Promotor erkennen. Es wird die Bindung spezifischer Proteine, sogenannter Transkriptionsfaktoren, benötigt. Dies sind DNA-bindende Proteine, die die spezifischen, konservierten DNA-Sequenzen der regulatorischen Elemente erkennen, und mit der RNA-Polymerase II einen Initiationskomplex formen, der den Transkriptionsstartpunkt erkennt.

Die Vorgänge der Genregulation unterliegen somit dem Zusammenspiel von regulatorischen Elementen (cis) und ihren korrespondierenden DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (trans).

Trotz erheblicher Unterschiede in der 5'-regulatorischen Region von HLA-Klasse-I-Genen und dem β_2 -Mikroglobulin gibt es einige konservierte Elemente, die für die koordinierte Expression des Klasse-I-Heterodimers zuständig sind: TATA-Box, Enhancer A, B, IRE (interferone response element, Induzierbarkeit von Klasse-I-Genen durch Interferone), CRE (cAMP response element, regulatorisches Element, an das Transkriptionsfaktoren der Familie der Steroidrezeptoren binden). Die konstitutive Expression von HLA-Klasse-II-Genen ist zunächst auf wenige Zelltypen beschränkt (B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten). Zellen des mononukleären phagozytischen Systems z. B. Monozyten, Makrophagen, Kupffersche Sternzellen, dendritische Zellen, Langerhans Zellen der Haut, etc. werden nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch viele externe Stimuli (z.B.

Zytokine) sowohl positiv als auch negativ reguliert. Verantwortlich dafür sind Sequenzen wie X-Y-, W-(Z-)Box. Diese sind an der konstitutiven und induzierbaren (γ -IFN) Expression von MHC Klasse II-Genen in B-Lymphozyten beteiligt oder vermitteln z.B. die Reaktion auf cAMP (X2-Box). Über die differentielle Bedeutung einzelner regulatorischer Einheiten für die Expression der Gene, Allele und Zelltypen ist noch wenig bekannt, obwohl dies große klinische Relevanz besitzen kann: So ist bei B-Lymphozyten-Zelllinien von Patienten mit "Bare-Lymphocyte-Syndrom" (BLS), bei denen eine fehlende HLA-Klasse-II-Expression und kein X-Box-bindender Faktor RF-X aufzuweisen ist, durch Zugabe dieses Faktors die HLA-Expression zu rekonstituieren.

4.8 Entwicklung der Gewebetypisierung

4.8.1 Serologische Typisierung

Mittels serologischer Verfahren, wie des Komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitätstests (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC, Terasaki, McClelland, 1964), können einzelne HLA-Klasse-I- oder -II-Spezifitäten durch Inkubation mit Antikörpern (Alloantikörper) nachgewiesen werden. Erkennen die Antikörper die passenden Antigene auf der Oberfläche von Zellen, kommt es in Gegenwart von Komplement (Kaninchen) zur Lyse der Testzellen (Mikroskop). Für die Typisierung von HLA-Klasse-I-Merkmalen sind das meist periphere Blutlymphozyten (PBL), die sich aus 80 % T-Lymphozyten und 10-15 % B-Lymphozyten zusammensetzen. Für die Bestimmung von HLA-Klasse-II-Merkmalen sind es angereicherte B-Lymphozyten-Suspensionen (>85 % B-Lymphozyten), da ruhende T-Lymphozyten HLA-Klasse-II-Moleküle nicht exprimieren. Die Mehrzahl der eingesetzten Alloantisera stammt von Schwangeren, die durch den Übertritt allogener Zellen fötalen Ursprungs in den mütterlichen Kreislauf sensibilisiert wurden. Der Anteil dieser Antikörper nimmt mit der Anzahl der Schwangerschaften zu. Aber auch von den auf diese Art gewonnenen Seren ist nur ein geringer Teil für die HLA-Typisierung brauchbar, da es sich sehr häufig um ein Gemisch von Antikörpern handelt, die gegen mehrere HLA-Spezifitäten gerichtet sind. Neben der spontanen Alloantikörperbildung, kann man in Einzelfällen auch geplante Immunisierungen mit lymphozytenhaltigen Zellsuspensionen (habituelle Abortbehandlung) vornehmen. Desweiteren können solche Alloantikörper bei Patienten, die mehrere Blut- bzw. Thrombozytentransfusionen erhalten haben, sowie bei Patienten, die allogene transplantiert wurden, gefunden werden.

Ein wesentliches Charakteristikum dieser Alloantisera ist, daß sie polyklonal sind und somit eine Mischung von Antikörpern darstellen, die gegen mehrere Spezifitäten des fremden HLA-Typs gerichtet ist. Darüberhinaus gibt es häufig auch Kreuzreaktionen eines Antiserums mit Antigenen, die untereinander eine Strukturhomologie aufweisen. Die Alloantisera können auch Antikörper

enthalten, die gegen verschiedene Epitope eines einzelnen HLA-Moleküls gerichtet sind. Aufgrund der großen Zahl von Epitopen auf einem einzelnen HLA-Allel und der Tatsache, daß manche Epitope auf verschiedenen Allelen vorkommen können, unterscheidet man individuelle (private) und allgemeine (public) Spezifitäten. Als allgemeine oder auch breite Spezifitäten bezeichnet man solche, die in weitere Allele unterteilt werden können (HLA-Klasse I: HLA-A19 in HLA-A29, A30-A33 und HLA 74, Tab. 3.2, breite Spezifitäten sind in Klammern angegeben). Gerade bei der Detektion von „Split-Antigenen“ kann es zu Diskrepanzen zwischen serologischen und molekularbiologischen Methoden kommen. Bei Vergleichen zwischen serologischen und molekularbiologischen Methoden konnten mit serologischen Techniken nicht alle getesteten Individuen als „Split“ erkannt werden, sondern nur ihre breite Spezifität (Lempert, 1998). Als individuelle Spezifität bezeichnet man ein Allel, das nicht weiter differenziert (gesplittet) werden kann (A43). Neben der Polyklonalität führt eine allelübergreifende Epitopgemeinschaft zur Kreuzreaktivität. Als kreuzreaktive Gruppen (cross reactive groups, CREGs) bezeichnet man solche gemeinsamen Epitope, die für Kreuzreaktionen nicht nur zwischen Spezifitäten eines Genortes, sondern auch zwischen verschiedenen Genorten (HLA-A und HLA-B) mittels monoklonaler Antikörper und Sequenzstudien nachweisbar sind.

Epitopgemeinschaften gibt es nicht nur im Bereich der HLA-Klasse-I-Merkmale, sondern vor allem bei Klasse-II-Antigenen: So erschweren kreuzreaktive Epitope zwischen den serologischen Spezifitäten DR1, DR10, zwischen DR3, DR5, DR6, zwischen DR 4, DR7, DR9 und zwischen DR5 und DR8 die Interpretation des CDC-Tests. Durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper, die spezifisch für ein bestimmtes Epitop sind, das nur bei einer bestimmten Allelgruppe vorkommt, konnte die Arbeit mit der CDC-Technik erleichtert werden. Dennoch ist es oft schwierig anhand der Anzahl der angefärbten Zellen (Färbung mit Vitalstoff, z.B. Eosin) eindeutig zu beurteilen, ob die Zellen positiv oder negativ reagieren. Der Test ist von vielen Parametern abhängig: Ausreichende Anzahl und Vitalität der Zellen, medikamentös bedingte Effekte der Zellqualität, erhöhte Sensitivität der Testzellen, Kontaminationen durch Thrombozyten bei der Lymphozytenpräparation, erhöhter Anteil antihumaner Antikörper und unzureichende Komplementaktivität, Aktivitätsverluste, unzureichende Verdünnung der Antiseren, mangelnde Einhaltung von Inkubationsbedingungen und eingesetzten Reagenzienmengen. Hinzu kommen Schwierigkeiten bei der Interpretation, z. B. durch Kreuzreaktionen und Probleme bei neuen Spezifitäten und Subtypen.

4.8.2 Zelluläre Methoden

Durch die Einführung einer in vitro-Testung, der gemischten Lymphozytenkultur (mixed leukocyte culture, MLC oder mixed leukocyte reaction, MLR) konnte gezeigt werden, daß häufig HLA-

Klasse-I vollkompatible Personen sich gegenseitig trotzdem stimulieren können, was zur Charakterisierung der nachfolgend als HLA-D bezeichneten Klasse-II-Genregion (Dw-Spezifitäten) führte. Später konnten die Dw-Spezifitäten vielfach mit serologischen Allelen der Genorte HLA-DR (D-related) und HLA-DQ korreliert werden. Zelluläre Testverfahren basieren auf der Proliferationsantwort von T-Lymphozyten in einer zellulären "Kreuzprobe". Als Kontrahenten in dieser zellulären Kreuzprobe dienen Leukozyten, die von verschiedenen Individuen gewonnen werden und als Stimulatoren und Responder bezeichnet werden. Die Stimulatoren verlieren durch eine Röntgenbestrahlung oder Behandlung durch das Mitosegift Mitomycin vor dem Experiment ihre Proliferationsfähigkeit, können aber weiterhin die nicht bestrahlten Responder-Leukozyten zur Proliferation anregen (one-way-reaction). Das Ausmaß der Proliferationsantwort wird durch die ³H-Thymidin Einbaurrate quantifiziert und hängt vom Grad der HLA-Disparität ab. In der MLC wirken, wie bei der Transplantatabstoßungsreaktion, die HLA-Moleküle einerseits als antigenpräsentierende Moleküle, andererseits als Antigen. Im Gegensatz zur Serologie, bei der Antikörper Epitope auf nativen Molekülen erkennen, ist die antigenabhängige T-Lymphozyten-Proliferation von der Prozessierung und Präsentation des Antigens abhängig.

Abbildung 3.7 gibt anhand der serologischen Spezifität HLA-DR4 einen Überblick über die in der Routinediagnostik verwendeten Methoden zur HLA-Typisierung. So splittet sich diese serologisch als "DR4" charakterisierte Spezifität durch den MLC-Test in sechs Dw-Spezifitäten auf. Molekularbiologische Verfahren (Hybridisierung, SSP-PCR) erlauben eine weitere Unterscheidung in die einzelnen Subtypen, bzw. sind erstmals in der Lage alle Varianten zu bestimmen.

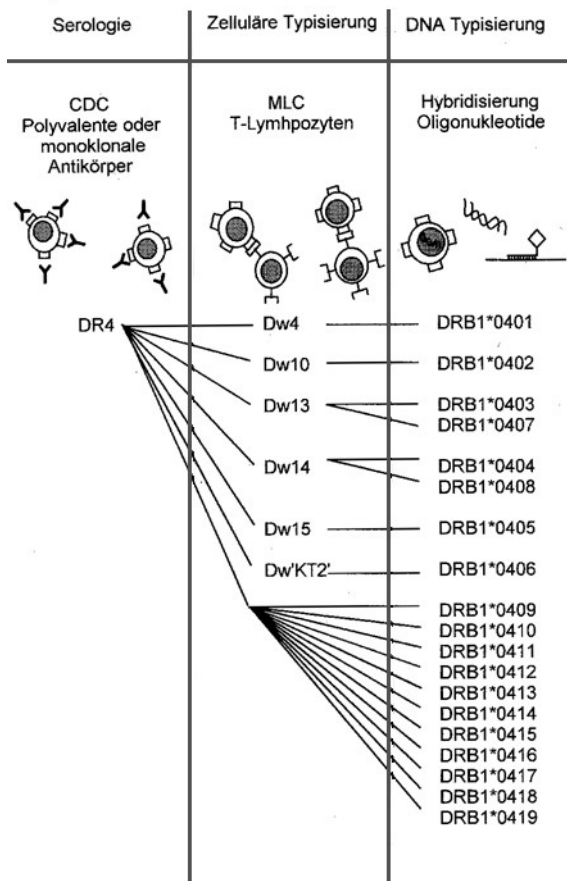


Abb. 3.7: Serologische Spezifität DR4, die mittels zellulärer Testung in sechs D_w und mittels molekularbiologischer Verfahren in 19 verschiedene Allele unterteilt werden kann (1994).

Aufgrund der weitergehenden Differenzierung molekularbiologischer Methoden und ihrer relativ einfachen technischen Handhabung, werden zelluläre Verfahren nicht mehr routinemäßig zur Typisierung eingesetzt. Lange Zeit spielten sie noch eine große Rolle bei der Beurteilung der Kompatibilität von Spender/Empfänger-Kombinationen in der Organtransplantation, besonders in der Knochenmarkstransplantation, oder für wissenschaftliche Fragestellungen.

4.8.3 Biochemische Verfahren

HLA-Moleküle können auch biochemisch d.h. gelelektrophoretisch charakterisiert werden: Für eine HLA-Klasse-I-Typisierung werden eine eindimensionale isoelektrische Fokussierung, für eine HLA-Klasse-II-Typisierung vorwiegend zweidimensionale gelelektrophoretische Verfahren eingesetzt. Diese Methoden besitzen ein höheres Auflösungsvermögen als die Serologie, sind aber wegen des großen technischen Aufwandes wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten und werden nicht zur Routinediagnostik eingesetzt. sHLA-Moleküle sind intakte HLA-Moleküle, die keinen membranassoziierten Anteil besitzen und sowohl mittels isoelektrischer Fokussierung, als

auch als antigene Zielstruktur im ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) zum Nachweis lymphozytotoxischer Antikörper eingesetzt werden können.

4.8.4 Molekularbiologische Typisierung

Der Einsatz molekularbiologischer Verfahren (Klonierung, Sequenzierung) kennzeichnet den Übergang vom Phänotyp zum Genotyp in der HLA-Typisierung. Anfangs benutzte man indirekte Verfahren, wie den Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (restriction-fragment-length-polymorphism, RFLP). Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction, PCR) gelang der Nachweis allel- bzw. gruppenspezifischer Sequenzunterschiede auf DNA-Ebene in der Routinediagnostik. Molekularbiologische Methoden zeichnen sich gegenüber serologischen und zellulären Verfahren insbesondere durch ihre reproduzierbare Genauigkeit und ihre erweiterte Differenzierungskapazität (Definition neuer Allele) aus.

Die zur Verfügung stehenden Mengen an DNA sind meist zu gering, um damit sofort Typisierungen vornehmen zu können. Deshalb ist es nötig die Zahl der vorhandenen Kopien zu vergrößern. Dies geschieht mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Bestandteile sind in Kap. 4.10 aufgelistet).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Mullis et al.1987) ist eine enzymatische Methode, die es erlaubt, über eine bestimmte Zyklenanzahl, definierte DNA-Sequenzabschnitte zu vervielfältigen. Die Auswahl des zu vervielfältigenden Bereiches erfolgt durch den Einsatz geeigneter, flankierender, synthetischer Oligonukleotide (Primer, Abb.3.8). Durch eine Temperaturerhöhung auf 94-96 °C wird eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge erreicht. Bei der nachfolgenden Abkühlung auf ca. 50-60 °C erfolgt die Anlagerung der Primer an komplementäre Sequenzen auf der Matrizen-DNA (annealing) und anschließend die Neusynthese (72 °C) des komplementären Strangs (extension). Die wesentliche Voraussetzung für eine zuverlässige Funktion dieses Prinzips war die Entwicklung einer thermostabilen DNA-Polymerase. Bei jedem Syntheseschritt kommt es theoretisch zur Verdopplung der Matrizen-DNA. Während beim ersten Schritt nur die Ausgangs-DNA zur Verfügung steht, wächst bei jedem weiteren Zyklus der Anteil der amplifizierten Zielsequenz, wobei andere Sequenzen der Ausgangs-DNA in den Hintergrund treten. Der Amplifikationsverlauf ist somit exponentiell und liefert 2^n Kopien der Matrizen-DNA nach n Zyklen.

Bedingt durch verschiedene Faktoren sinkt jedoch die tatsächliche Amplifikationseffizienz, so daß die theoretisch erwartete Molekülzahl nicht erreicht wird (Plateau-Effekt). Diese hängt von der Qualität und Quantität der Matrizen-DNA ab, denn eine zu geringe Kopienzahl bewirkt zu schwache richtig-positive Signale oder kann falsch-positive Amplifikationen begünstigen. Eine zu hohe Zahl an Startmolekülen kann ebenfalls zu unspezifischen Reaktionen führen. Gegebenfalls sind in der Lösung noch Proteine vorhanden wie Porphyrine (Hämoglobin-Abbauprodukte), SDS,

DMSO, Formamid, Salze oder Chelatbildner, die die Amplifikationseffizienz negativ beeinflussen oder ganz verhindern können. Außerdem spielt die Primerauswahl eine große Rolle; so begünstigen nicht-hochspezifische Primer unerwünschte Amplifikationen oder rekombinieren sich gegenseitig. Ist die Primerkonzentration zu hoch angesetzt, werden ebenfalls unspezifische Nebenreaktionen begünstigt, ist sie zu niedrig, ist die Amplifikation wenig effizient. Man verwendet heute zwar thermostabile DNA-Polymerasen, aber auch diese besitzen während der Denaturierungsphase (95 °C) nur eine Halbwertszeit von etwa einer halben Stunde, d. h. kurze Denaturierungsphasen und wenn möglich Annealing/Extension Schritte von kurzer Dauer und niedriger Temperatur erhöhen die Lebensdauer der DNA-Polymerase und dadurch die Effizienz der PCR. Andererseits liegt das Temperaturoptimum für eine Amplifizierung bei etwa 75-80 °C, was bedeutet, daß die Parameter für den PCR-Zyklus in Vorversuchen ausgetestet werden müssen. Für die Pufferzusammensetzung ist vor allem die Magnesiumkonzentration von Bedeutung, da diese die Effizienz der Polymerase beeinflusst. Zu hohe Magnesium-Mengen begünstigen unspezifische Reaktionen. Außerdem muß die Menge an dNTP's und Primer auf die Magnesiumkonzentration abgestimmt sein.

a) Durch die Entwicklung der PCR konnten sich eine Reihe von Methoden für die HLA-Typisierung etablieren: Bei der PCR-RFLP-Methode wird ein Exon- (eventuell auch Intron-) spezifischer DNA-Abschnitt mit Hilfe der PCR amplifiziert. Mit der nun größeren Menge zur Verfügung stehender Matrizen findet ein Verdau durch Restriktionsnukleasen statt. Dafür können auch mehrere Enzyme verwendet werden. Anschließend folgt eine Auftrennung mittels Agarose- oder Polyacrylamidgel und eine Interpretation des Fragmentmusters. Der Vorteil gegenüber der einfachen RFLP besteht im geringeren Bedarf an Ausgangsmaterial und einer Minimierung von Störeffekten, da synthetische DNA weniger stark verunreinigt ist, insbesondere nicht mit Proteinen. Bei der konventionellen RFLP-Methode (Southern 1975, Bidwell 1988) wird gelöste, aufgereinigte DNA mit Restriktionsendonukleasen inkubiert. Diese Restriktionsenzyme schneiden DNA-Moleküle spezifisch nach einer bestimmten Erkennungssequenz (4-6 Basen). Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wird die geschnittene DNA mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden unter denaturierenden Bedingungen in Einzelstrang-DNA überführt und dann auf eine stabile Trägermatrix transferiert (Southern blotting). Parallel dazu werden die Gensonden hergestellt: Dabei werden genomische DNA-Fragmente in einen Vektor überführt und dieser in Bakterien transformiert. Nach der Vermehrung der Bakterien kann der Vektor daraus isoliert werden. Alternativ kann die Gensonde durch Restriktionsenzyme aus dem Vektor herausgeschnitten, gelelektrophoretisch gereinigt und mittels PCR vermehrt werden. In jedem Fall müssen die Gensonden markiert werden. Die Hybridisierung der Gensonden an die

Fragmente entsprechend den Basenpaarungsregeln stellt die Grundlage für die RFLP-Methode dar.
 Hier findet die eigentliche Identifizierung statt.

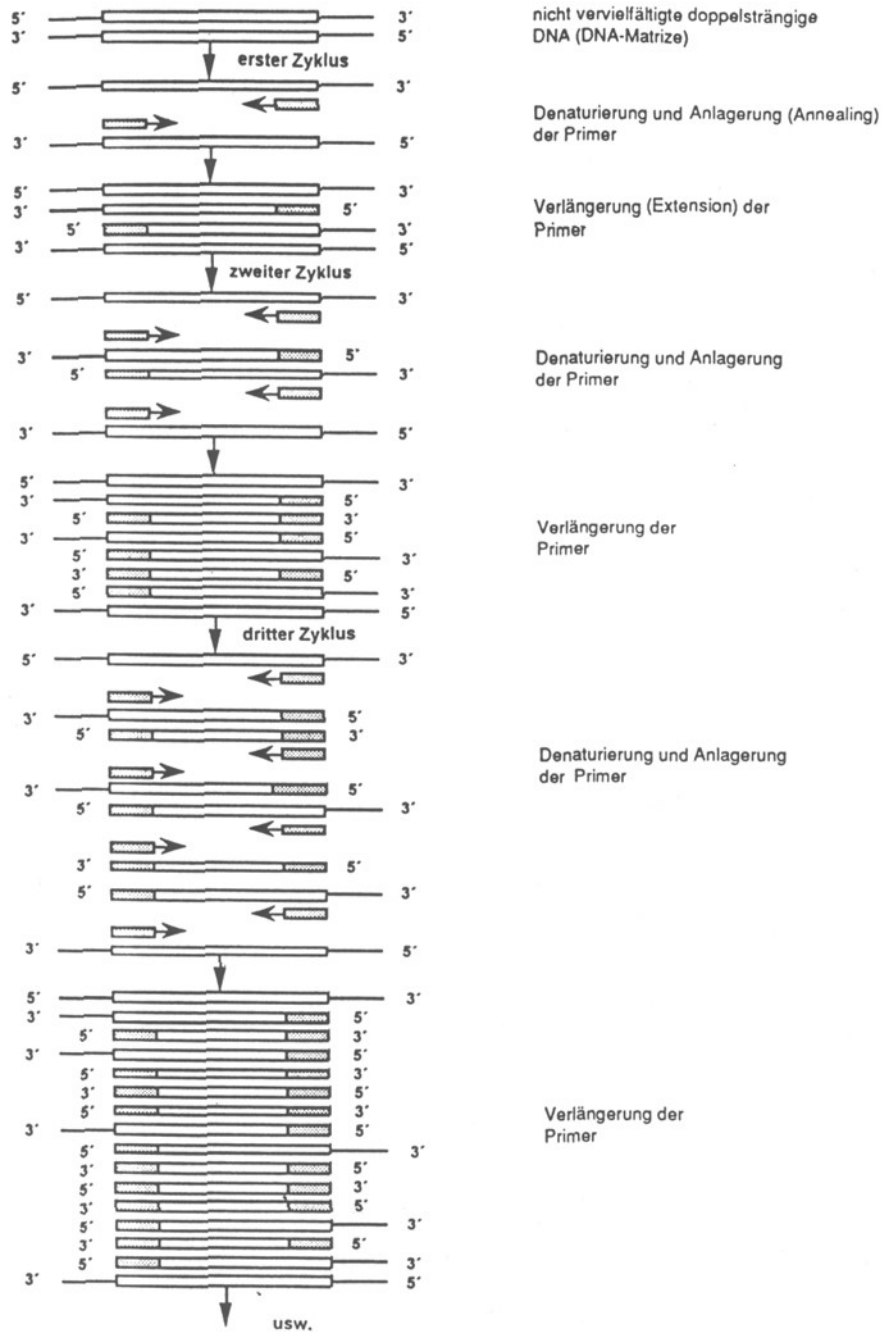


Abb. 3.8: Einzelne Schritte der PCR

Die Reaktionsbedingungen während der Hybridisierung und der nachfolgenden Waschschriffe entscheiden über die Stringenz und damit die Spezifität der grundsätzlich reversiblen Hybridisierung von DNA-Fragment und Gensonde. Durch die Markierung der Gensonde können die Hybride aus DNA-Fragment und Sonde erkannt werden. Radioaktive Markierung zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität aus, wogegen der Verzicht auf radioaktive Materialien den Vorteil der höheren Arbeitssicherheit und der einfacheren Handhabung besitzt (Biotin/Streptavidin, Digoxigenin). Nicht-radioaktive Techniken benötigen einen enzymatischen Verstärkermechanismus (z.B. Chemilumineszenz), bei dem das Enzym entweder direkt an die Gensonde binden kann oder die Verstärkung über ein Antikörper-Enzym-Konjugat möglich ist. Es entsteht ein charakteristisches Bandenmuster, das einer bestimmten HLA-Spezifitäten zugeordnet werden kann. Es handelt sich um ein indirektes Verfahren, d.h. die HLA-Spezifität wird nicht direkt anhand der Unterschiede im codierenden Bereich, sondern gekoppelt mit dem Schneiden der Restriktionsendonukleasen detektiert. Die RFLP-Methode besitzt für die Klasse-II-Typisierung eine höhere Auflösungsrate und eine bessere Reproduzierbarkeit als die Serologie. Bei der Klasse-I-Typisierung allerdings können die einzelnen Spezifitäten nicht genügend anhand der Verteilung der Restriktions-Endonuklease-Schnittstellen unterschieden werden. Wegen des hohen zeitlichen Aufwandes für die jeweiligen Einzelschritte, 5-10 Tage für eine komplette HLA-DR, -DQ-Typisierung, ist diese Methode nicht für Einzeltypisierungen im Routinebetrieb, aber sehr wohl für Studienzwecke mit höherem Durchsatz geeignet.

b) Um bei der Amplifikation mehrere Allele innerhalb einer Reaktion unterscheiden zu können, eignet sich auch die DNA Crossmatching oder Fingerprinting Methode (PCR-Heteroduplex-Analyse, PCR-HDA, Reference Strand Mediated Conformation Analysis, RSCA, Argüello et al., 1998, Turner et al., 2000). Bei dieser wird die Tatsache ausgenutzt, daß bei der Reassoziaton der komplementären DNA-Stränge, abhängig von der jeweiligen DNA-Stranglänge und Qualität/Quantität der Basenpaarunterschiede, nicht nur die komplementären Stränge des gleichen Allels rekombinieren können (Homoduplex), sondern auch die partiell heterologen Stränge verschiedener Allele (Heteroduplex). Durch verschiedene Größen- und Ladungsverhältnisse und die dadurch bedingten unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in der Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine Unterscheidung zwischen Homo- und Heteroduplex möglich.

c) Die PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) Methode nutzt die durch unterschiedliche Sequenzen verursachten Mobilitätsunterschiede von Einzelstrang-DNA in der

Elektrophorese. Die Charakterisierung eignet sich sowohl für Typisierungen, als auch für Vergleiche zwischen verschiedenen Individuen (Blaszcyk et al., 1995).

d) Die direkte Sequenzierung (sequence-based-typing) ist per definitionem die genaueste Möglichkeit Allele zu typisieren (Kotsch et al., 1997). Dafür muß mittels PCR ein Amplifikat hergestellt werden. Diese PCR kann genortspezifisch sein, sie kann aber auch für eine allelgruppenspezifische Vordifferenzierung eingesetzt werden, um bei der nachfolgenden Sequenzierung nur eine eingeschränkte Zahl von Allelen berücksichtigen zu müssen.

e) In der Routinediagnostik werden vor allem PCR-SSO und PCR-SSP verwendet.

Für die PCR-SSO-Methode (Saiki et al., 1986) werden einzelne Allele oder Allelgruppen nach vorheriger genortspezifischer PCR-Amplifizierung durch Hybridisierung mit sequenzspezifischen kurzen Gensonden charakterisiert. Die Typisierung erfolgt nur bei spezifischer Hybridisierung, d.h. falls Oligonukleotid und zu testende DNA eine komplementäre Sequenz besitzen. Die Markierung der Sonde kann auf radioaktivem oder nicht-radioaktivem Wege erfolgen. Für dieses Verfahren gibt es 2 Varianten: Dot-Blot-Format und reverses Dot-Blot-Format.

Zuerst werden genortspezifische PCR-Amplifikationen durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Im Dot-Blot-Verfahren (Kimura und Sasazuki, 1986) werden die PCR-Produkte dann unter denaturierenden Bedingungen auf eine Trägermatrix übertragen und fixiert. Die Hybridisierung erfolgt durch Anlagerung der Oligonukleotide gemäß Basenpaarungsregeln. Das Verfahren in seiner ursprünglichen Form ist für die parallele Typisierung einer großen Probenzahl geeignet. Das Reverse Dot-Blot-Verfahren (Buyse et al., 1993; Erlich et al., 1991) ist dagegen als Einzelverfahren geeignet, da hier nicht die PCR-Produkte, sondern die einzelnen Gensonden auf der Trägermatrix fixiert werden und darauf in einem Arbeitsschritt mit dem PCR-Produkt hybridisiert werden. Eine Einzeltypisierung im Dot-Blot-Verfahren wird erst durch eine räumliche Trennung der PCR-Produkte (Mikrotiterplatten) und damit parallelen Hybridisierung mehrerer Oligonukleotide möglich. Die Spezifität der Hybridisierungsreaktion zwischen Zielsequenz und Oligonukleotiden wird durch nachfolgende Waschschriffe gewährleistet. Die Detektion der spezifischen Hybride erfolgt mittels radioaktiver oder nicht-radioaktiver Detektionssysteme gemäß der Markierung des Oligonukleotids. Anhand der individuellen Hybridisierungsmuster kann dann die Zuordnung der zugehörigen Allele bzw. Spezifitäten erfolgen. Potentielle Fehlerquellen sind bei der DNA-Isolierung und der PCR zu suchen (Kontaminationen, mangelnde Effizienz durch Inhibitoren der Polymerase, unspezifische Amplifikation), beim Design und der Herstellung der Sonden (mangelndes Differenzierungsvermögen, Fehler in der Synthese), beim Einhalten der Hybridisierungsbedingungen, bei mangelnder Sensitivität, bei der Detektion und

der Interpretation. Die SSO-Methode ist flexibler als die RFLP, die durch die Anzahl der Restriktionsenzyme bzw. die Zahl der auf dem Blot unterscheidbaren Schnittstellen beschränkt ist (Jordan et al., 1995). Sie ist auch zuverlässiger als die Serologie, die durch die verwendbaren Antikörper limitiert ist. Der zeitliche Aufwand von mehreren Stunden (Reverses Dot-Blot Format) bis zu einigen Tagen (Dot-Blot) bedarf allerdings noch der Verbesserung.

f) Eine gängige Methode, die im HLA-Bereich weit verbreitet ist, ist die sogenannte SSP-PCR.

Diese nutzt die einzelnen Basenmutationen, die die Polymorphismen charakterisieren.

Bei der SSP-PCR-Methode wird die Tatsache genutzt, daß es nur zu einer Amplifizierung kommt, wenn beide Primer exakt (sequenzspezifisch) binden (Abb. 3.9 oben). Ist ein 3'-Ende eines Primers nicht kompatibel, so findet keine Amplifizierung statt (Abb. 3.9 unten).

```

ACTGACATCG   Forward Primer (5'-3')
|||||
TGACTGTAGCATCGGTAATTTGCTAATCGGTATCGCATTCGATC

ACTGACATCGTAGCCATTAAACGATTAGCCATAGCGTAAGCTAG
                                     |||||
Reverse Primer(3'-5')   GCATTCGATC

```

```

ACTGACATCA   Forward Primer (5'-3')
|||||/
TGACTGTAGCATCGGTAATTTGCTAATCGGTATCGCATTCGATC

ACTGACATCGTAGCCATTAAACGATTAGCCATAGCGTAAGCTAG
                                     |||||
Reverse Primer(3'-5')   GCATTCGATC

```

Abb. 3.9: Prinzip der SSP-PCR

Der Nachweis erfolgt über Gelelektrophorese (Gel-Photo). Eine stattgefunden Amplifizierung läßt sich in Form einer Bande auf dem Gel nachweisen. Paßt einer der Primer nicht zu der Matrix-DNA, so führt dies zu keiner Amplifizierung und keiner sichtbaren Bande im Gel. Im Vergleich zur PCR-SSO-Methode findet der Differenzierungsschritt schon bei der Amplifizierung statt, eine Hybridisierung ist nicht nötig (Zeitersparnis, Olerup und Zetterquist, 1992). Bei der direkten Variante der PCR-SSP wird genomische DNA als Matrize für die jeweiligen sequenzspezifischen Amplifikationen verwendet (hoher DNA-Verbrauch, Mytilineos 1996). Da man hierbei verschiedene Primer-Kombinationen für ein und dieselbe DNA benutzen kann, eignet sich die Methode sehr gut für Einzeltypisierungen. Steht wenig DNA zur Verfügung oder ist eine Vordifferenzierung nötig, läßt sich eine geschachtelte PCR (nested PCR, Bein et al., 1992)

durchführen. Hierbei wird zuerst mit gruppenspezifischen Primern, die auch im Intron lokalisiert sein können, ein DNA-Fragment voramplifiziert. Einen Teil dieser PCR-Produkte benutzt man anschließend für die zweite PCR mit internen, sequenzspezifischen Primern, die innerhalb des Amplikons aus der ersten Reaktion liegen. Man erhält hochspezifische PCR-Produkte in ausreichender Menge, die von der Qualität der DNA und Spezifität der Primer weniger stark abhängig sind. Als Fehlerquelle gilt sowohl die DNA-Isolierung, als auch die Wahl der PCR-Bedingungen oder ein fehlerhaftes Entscheiden zwischen positiv und negativ bei der Interpretation der Agarosegele.

Weiterhin kann der SSP-PCR ein zweites Primerpaar als Reaktionskontrolle zugesetzt werden. Dieses "Kontrollprimerpaar" amplifiziert nicht-polymorphe Bereiche und wird in einer Konzentration, die ca. 25 % geringer ist als die der spezifischen Primer, in der PCR-Reaktion eingesetzt. Somit kommt es nicht zu einer kompetitiven Konkurrenz mit den spezifischen Primern, falls diese komplementär zur DNA-Matrize sind; es ergibt sich aber ein positives Signal falls eine spezifische Amplifikation nicht stattfinden konnte.

Die PCR-SSP ist vor allem zur Typisierung einer kleinen Personenzahl geeignet. Ein gewisser Nachteil sowohl für SSP und SSO ist, daß nur bekannte Allele typisiert werden können. In vereinzelten Fällen liefert die PCR-SSP kein vollständiges oder klares Ergebnis: Neue Allele, die ein ähnliches Typisierungsmuster bilden, können sich beispielsweise hinter einem bekannten Allel „verstecken“. Problemfälle können auch seltene Spezifitäten sein, die durch die ausgewählten Primerkombinationen nicht erfaßt werden, oder Phänotypen, deren Sequenzen durch die eingesetzten Primer nicht unterschieden werden können. Wird nur ein Allel detektiert, ist nicht klar festzulegen, ob die Probe auf Allelebene homozygot ist oder ob sich hinter dem Ergebnis zwei Subtypen verbergen. So differenzieren die Primerpaare der in dieser Arbeit beschriebenen Assays nicht zwischen DRB1*1428, DRB1*0429 und DRB1*0430. In diesen Fällen muß mit einer zusätzlichen Methode gearbeitet werden (z.B. Nested-PCR, PCR-SSO oder direkte Sequenzierung).

g) Eine Verfeinerung der SSP-PCR-Methode stellt das TaqMan-Verfahren dar: Dabei handelt es sich um einen "single tube assay", d. h. die Detektion findet im Reaktionsgefäß statt, so daß keine Gelelektrophorese nötig ist. Die Detektion erfolgt mittels eines weiteren Oligonukleotids, das Doppelfluoreszenz-markiert ist und dessen Fluoreszenzstrahlung sich während der PCR verändert (Kapitel 5).

5 Material und Methoden

5.1 Geräte

Biofuge A, Heraeus Sepatech, Osterode

Biomek 2000, Beckman, Fullerton, USA

Hydra, Robbins Scientific, Sunnyvale, USA

Gefrierschrank GS 5203-3, Liebherr, Ochsenhausen

Kühlzentrifuge, Rotixa RP, Hettich, Asbach

Tischzentrifuge, Mikro 24-48 R, Hettich, Asbach

Kühltruhe, 300 l, -80° C, GFL, Burgwedel

Laborwasserbad, GFL 1083, GFL, Burgwedel

Lamda Scan 200, MWG-Biotech, Ebersberg

Lyophylle RC10.10, Jouan, Saint Nazaire, FMikrowellengerät Micromat, AEG

PCR-Thermocycler Gen Amp PCR System 9600, Perkin-Elmer, Foster City, USA

ABI PRISM 7700, Perkin-Elmer, Foster City, USA

ABI 377, Perkin-Elmer, Foster City, USA

DNA/RNA-Synthesizer 394, Perkin-Elmer, Foster City, USA

pH-Meter Fischerbrand Hydrus 200, Fischer, Nidderau

Magnetrührheizplatte MR2002, Heidolph, Kehlheim

Multipipette, Eppendorff, Hamburg

Pipettierhilfe, Pipettus-Akku, Hirschmann, Eberstadt

Pipetten, Varipette 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl, Eppendorf, Hamburg

Polaroidkamera MP-3, Polaroid Corp. Cambridge, USA

Powersupply Macrodrive1, Pharmacia-LKB, Freiburg

PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Watertown, USA

Quarzglasküvette, Hellma, Müllheim

Schlauchpumpe, Millipore, Eschborn

Schüttelapparat GFL 3013, Migge, Heidelberg

Speed Vac Concentrator, Bachofer, Reutlingen

Sterile Werkbank, "BSB 4 Gelaire", Gelman, Opera, Italien

Überkopfdreher REAX2, Heidolph-Elektro, Kehlheim

UV-Lichtpult N90, Benda, Wiesloch

UV/visible Spectrophotometer 4050, Pharmacia-Biotech, Freiburg

Videoprinter und Kamera, Quickstore System II, MS Laborgeräte, Heidelberg

5.2 Chemikalien/Reagenzien

Acetonitril, Perkin-Elmer, Foster City, USA

Acrylamid, Sigma, München

Agarose, Life Technologies, Karlsruhe

Ammoniumperoxiddisulfat (APS), Sigma, München

Borsäure, Merck, Darmstadt

Bromphenolblau, Sigma, München

Chloroform, J.T.Baxter, Deventer, NL

Dichlormethan, Perkin-Elmer, Foster City, USA

Dinatriumphosphat, Sigma, St. Louis, USA

Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Pharmacia LKB, Freiburg

Essigsäure, Roth, Karlsruhe

Ethanol, p.A., Merck, Darmstadt

Ethanol, 96%, vergällt, Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid, Sigma, St. Louis, USA

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz x 2 H₂O, Sigma, München

Formamid, Sigma, München

Gelatine, Merck, Darmstadt

Glyzerin, Baker, Deventer, NL

8-Hydroxchinolin, Merck, Darmstadt

Isopropanol, Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt

Kresolrot, Sigma, München

Large Bottle Reagent Kit for use with Model 392, Perkin-Elmer, Foster City, USA

Magnesiumchlorid, Ferak, Berlin

3-Methyl-1-butanol (Isoamylalkohol), Merck, Darmstadt

Natriumacetat, Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid, Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS), Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt

Natriumperchlorat, Roth, Karlsruhe

Phenol, Merck, Darmstadt

Tetramethylendiamin (Temed), Sigma, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Biorad, CA, USA
Triton X-100, Merck, Darmstadt
Wasser (HPLC-gereinigt), Merck, Darmstadt

5.3 Enzyme

AmpliTaq Gold, Perkin-Elmer, Foster City, USA
Platinum Taq, Life Technologies, Karlsruhe
TaqGold, AGS, Heidelberg
Uracil-N-Glycosylase (UNG), Perkin-Elmer, Foster City, USA

5.4 Sonstige Materialien

Alconox, Alconox Incorporation, New York, USA
Elektrophoresekammer GNA 200, Pharmacia-LKB, Freiburg
Elektrophoresekammer, Elektrowerkstatt Universität Heidelberg
Kimwipes Plus, Kimberley-Clark, Northop, UK
PCR-Gefäße, Robbins Scientific Corp., Sunnyvale, USA
Polaroidfilm 6678, Polaroid Corp, Cambridge, USA
Polypropylen-Röhrchen, 2 , 50 ml mit Schraubverschluß, Greiner, Frickenhausen
Polystyrolröhrchen, 5 ml, Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäß, 1,5 ml, 3810, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, 1,5 ml, "Safelock", Eppendorf, Hamburg
Einmal-Spritze (10 ml) mit Einmal-Kanüle, Braun, Melsungen
Einmal-Spritze (5 ml), Discardit II, Becton Dickinson, Heidelberg

5.5 Probenmaterial

Die für die Typsierungen verwendeten DNA-Proben wurden in erster Linie aus Blut, aber auch aus Milzgewebe und Lymphknoten isoliert. Die Proben stammten zum überwiegenden Teil von Organ Spendern und -Empfängern der CTS-Studie, aber auch von gesunden Blutspendern aus dem Raum Heidelberg.

5.6 DNA-Isolierung (Aussalzverfahren aus Blut oder Zellen)

Buffy Coat, 10 ml Vollblut oder $2-5 \times 10^7$ isolierte Lymphozyten (isoliert über Gradientenzentrifugation) werden in kaltem Lyse-I-Puffer aufgenommen und in ein 50 ml Gefäß überführt. Lyse-I-Puffer besteht aus 10 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, das mit 1 M HCl auf pH = 7,5 eingestellt ist, 0,3 mM Saccharose, 5 mM MgCl₂, 1 % (v/v) Triton X-100 und muß lichtgeschützt bei 4 °C gelagert werden. Das Gefäß wird auf 50 ml aufgefüllt und geschüttelt (Lyse der Zellmembran). Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 3200 U/min (Rotixa/RP, Hettich) und 4 °C wird der Überstand abgegossen und verworfen. Erscheint das Pellet stark verschmutzt, wird es erneut mit Lyse-I-Puffer gewaschen. Zur Lyse der Zellkernmembran wird das Pellet mit den einzelnen Komponenten des Lyse-II-Puffers versetzt, resuspendiert mit:

- 4,5 ml EDTA-NaCl
- 125 µl SDS(10%)
- 1,1 ml 5M Natriumperchlorat

und für mindestens 10 min im Überkopfdreher gemischt. Danach werden 2 ml einer 6 M NaCl Lösung dazugegeben und ca. 20 sec stark geschüttelt (Ausfällen von Proteinen). Es folgt ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 2500 U/min, ohne Bremse und bei RT. Der Überstand wird sofort in ein neues Röhrchen überführt, da das Pellet nicht sehr stabil ist. Zur Fällung wird 1 Volumenanteil (ca. 7,5 ml) Isopropanol zu dem Überstand gegeben. Durch langsames, vorsichtiges Schwenken fällt die DNA aus und wird als weißes Fasernetzwerk sichtbar. Es wird die Menge an TE-Puffer geschätzt, die zur vollständigen Auflösung der DNA in der optimalen Konzentration für die PCR benötigt wird. Die DNA wird mit einer zu einem Häkchen angeschmolzenen Pasteurpipette aus der Lösung gefischt, zweimal in 3 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, in ein Eppendorfgefäß überführt und unter dem Laminarflow getrocknet. Die zuvor geschätzte Menge an TE-Puffer wird zugegeben und die verschlossenen Röhrchen werden 2-3 Wochen, mindestens aber 2 Tage im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

5.7 DNA-Isolierung (Phenol-Chloroform-Extraktion nach Graham, aus Milz oder Lymphknoten)

DNA kann auch aus Milzgewebe oder Lymphknoten gewonnen werden. Um eine Degradierung der DNA durch Endonukleasen zu vermeiden, sollte die Zerteilung des Materials bei tiefen Temperaturen stattfinden. Hierfür wird ein etwa kirschkernegroßes Milzstück in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser fein zerkleinert, bis eine pulverige Masse entsteht. Das pulverisierte Gewebe wird mit einem vorgekühlten Löffel in ein 50 ml Röhrchen gegeben, in welches 7 ml gekühltes Extraktionsmedium und 5,85 ml Lyse II Puffer vorgelegt waren.

Extraktionsmedium:

- 50 % Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, 99 % (v/v) Chloroform mit 0,75 % (v/v) Ethanol stabilisiert, 98 % (v/v) 3-Methyl-1-butanol
- 50 % Phenol (im Wasserbad bei 65 °C geschmolzen, pro Liter eine Spatelspitze 8-Hydroxychinolin)

Lyse II Puffer wird direkt ins Gefäß pipettiert, siehe Abschnitt 4.6. Die verschlossenen Röhrchen werden 10 min bei RT geschüttelt und zentrifugiert (1470 x g, 10 min, RT), wonach 2 Phasen zu erkennen sind. Die untere Phase wird mit einer 10 ml Einmalspritze mit Kanüle abgesaugt und verworfen. Die verbliebene obere Phase wird mit einem Volumenanteil Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung versetzt und erneut 10 min geschüttelt und zentrifugiert. Mit einer 5 ml Spritze wird die obere Phase vorsichtig abgehoben und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 100 µl 4 M NaCl und einem Volumenanteil Isopropanol werden die Röhrchen leicht hin und her bewegt bis die DNA faserartig ausfällt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog zur Isolierung aus Blut (siehe Abschnitt 4.6).

5.8 Konzentrationsbestimmung der DNA (Spektrophotometer)

Um die Typisierungen in einer vergleichbaren Art durchführen zu können, ist es nötig das Verfahren möglichst zu standardisieren. Wichtige Voraussetzungen hierfür sind neben einer möglichst gleich guten Qualität auch die Quantität und die Reinheit der DNA.

Das Material wird erst nach vollständigem Auflösen in TE-Puffer (einige Stunden bei 37 °C, über Nacht bei 56 °C, 2-3 Tage bei RT oder mindestens eine Woche bei 4 °C) UV-spektrometrisch vermessen. Dafür werden 5 µl genomischer DNA-Lösung mit 495 µl H₂O Bidest in einer Quarzküvette gemischt und die Extinktion bei 260 und bei 280 nm gegen H₂O Bidest gemessen. Der Mittelwert aus drei Messungen der gleichen DNA bei einer Extinktion bei 260 nm wird mit dem Faktor 5 multipliziert um die Konzentration in µg/µl zu erhalten.

$$A_{(260\text{nm})} \times 5 = \text{Konzentration in } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die Messung bei 280 nm dient zur Überprüfung der Reinheit der DNA und zwar insbesondere im Hinblick auf Kontamination mit Proteinen. Der Quotient der Extinktionen von 260/280 sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

Zur Lagerung bzw. zur schnellen Verwendung für die meisten im Labor etablierten Methoden (PCR-SSP, RFLP) wird eine Konzentration von 0.1-2,5 µg/µl für aus Blut isolierter DNA

angestrebt. Die Isolierung aus Gewebe ist weniger schonend, da bei der Aufarbeitung des Gewebes darin enthaltene Endonukleasen freigesetzt werden, die eine stärkere Fragmentierung der DNA verursachen, was sich als problematisch für die Amplifikation längerer Fragmente (HLA-Klasse-I) erweisen kann. Durch den Einsatz einer größeren DNA-Menge wird versucht, diesem Effekt der Fragmentierung entgegenzuwirken. Um höher oder niedriger konzentrierte DNA-Lösungen einzustellen, ist es nötig sie mit TE-Puffer zu verdünnen oder gegebenenfalls ihr Volumen im Speed Vac Concentrator zu reduzieren.

Bei einem größeren Aufkommen von DNA-Proben werden diese nicht einzeln im UV-Spektrometer bestimmt, sondern in einem 96-well-Reader von MWG. Ist der Eichfaktor erst einmal bestimmt, lassen sich hiermit sehr schnell 47 bzw 31 DNA's gleichzeitig vermessen (Doppel- oder Dreifachbestimmung). Das Gerät benötigt nur wenige Minuten um die Proben mit dem dazugegebenen Puffer zu mischen und zu bestimmen. Ferner können sowohl die Meßwerte als auch die DNA-Konzentration ausgedruckt oder elektronisch gespeichert werden. Frisch isolierte Proben neigen dazu sich nicht vollständig durch das mechanische Schütteln des Readers zu lösen, was sich in extrem niedrigen Meßwerten oder in einer hohen Streuung zeigt. Wiederholtes Schütteln oder das Stehenlassen der Platte für 12 Tage bei RT bringt die Nukleinsäuren ausreichend in Lösung.

Für Typisierungen mit dem ABI PRISM 7700 ist eine 10-fach geringere DNA-Konzentration als für Bestimmungen mit der SSP-PCR-Methode ausreichend. Um diese 30 ng pro Reaktionsvertiefung reproduzierbar pipettieren zu können, werden die in der Regel auf 0.5-2,5 µg/µl eingestellten DNA-Stocklösungen auf 10 ng/µl eingestellt und davon 3 µl pro Plattenkavität abgegeben. Allerdings wird statt TE-Puffer H₂O Bidest zum Verdünnen verwendet, da das Verfahren eine höhere Mg²⁺-Konzentration benötigt und die sonst dreifach höhere, im TE-Puffer enthaltene EDTA-Menge die Amplifizierung und die Detektion stören könnte. Die Verdünnungen lassen sich sehr schnell herstellen, da die DNA schon in der Stocklösung homogen verteilt ist. Trotz der geringeren Pufferkonzentration sind die Proben über mehrere Monate stabil im Kühlschrank lagerbar.

5.9 Primer

Die für die PCR-SSP-Methode benötigten Primer wurden anhand von Mutationen, die in veröffentlichten Sequenzen (EFI/ASHI-Datenbanken) zu finden sind, entwickelt. Die Synthese geschah mittels zweier DNA/RNA-Synthesizer 394 der Firma ABI. Für eine solch hoch automatisierte Anwendung ist es nötig, stabile Monomerbausteine zu verwenden und die erste Base an eine Säule zu koppeln, um möglichst schnell Reagenzien zugeben und Nebenprodukte abtrennen zu können, ohne aufwendige Aufreinigungsschritte durchführen zu müssen. So ist es möglich, in

relativ hohen Ausbeuten zyklisch die einzelnen Basen anzuknüpfen und nach Beendigung der Reaktion von der Säule abzulösen. Die Oligonukleotidsynthese wird vom 3'-Ende her initiiert. Die "letzte" Base wird als 3'-Nukleosid-Succinat über einen Aminoalkyl-Spacer kovalent an ein polymeres Trägermaterial gebunden (Controlled Pore Glass, CPG, Glaskugeln mit definierter Porengröße; modifizierte Polystyrole, Mertes et al., 1997).

Die Beladung an Nukleosid ist abhängig vom Trägermaterial, ca. 25 $\mu\text{mol/g}$ für CPG, 8 $\mu\text{mol/g}$ für Polystyrol. Je niedriger die Trägerbeladung, um so weniger treten sterische Behinderungen zwischen den wachsenden Nukleotidketten auf. Um eine Verzweigung der Nukleotidkette zu vermeiden und ein Wachsen durch selektive Bildung von 3'-5'-Verknüpfungen zu erreichen, müssen entsprechende, nicht-erwünschte Reaktionen vermieden werden. Das heißt, solche nicht-benötigten, funktionellen Gruppen werden mit Schutzgruppen versehen. Die Trägeraufhängung bildet mittels der Succinatgruppe zugleich die 3'-Schutzgruppe des letzten Nukleosids (Abb. 4.1), die wie die weiteren Bausteine (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) an ihren primären Aminogruppen alkalilabil blockiert sind.

Die 5'-OH-Gruppe dagegen ist durch die Dimethoxytrityl (DMTr)-Gruppe säurelabil geschützt.

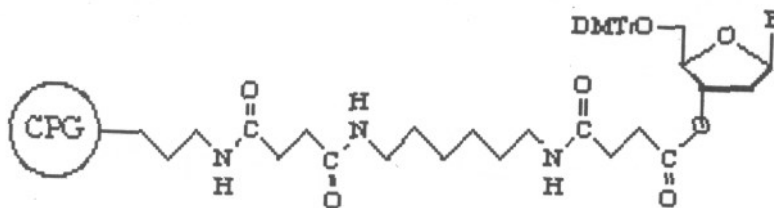


Abb. 4.1: Bindung der „letzten“ Base des Oligonukleotids über einen Aminolinker an das Säulenmaterial

Nach Eingabe der ausgewählten Basensequenz und Installation einer Säule, an die die letzte Base gekoppelt ist, wird zur Freisetzung der 5'-OH-Funktion die DMTr-Gruppe mit Dichloressigsäure/Dichlormethan (1-3 % w/w) abgespalten. Das dabei freiwerdende DMTr-Kation besitzt aufgrund seiner Mesomerie-Stabilisierung eine orangerote Farbe, deren Intensität in direkter Beziehung zur Effizienz der Abspaltung der DMTr-Gruppe steht und somit mittels UV-Strahlung gemessen werden kann. Nun können die Syntheszyklen beginnen, in denen die einzelnen Basen gekoppelt werden. Die eigentliche Monomeraddition stellt hohe Anforderungen. So soll die Reaktion bei Raumtemperatur und innerhalb weniger Sekunden mit Ausbeuten von mindestens 98 % stattfinden. Der Phosphor ist durch die Cyanoethylgruppe alleine nicht genügend aktiviert, deshalb wird die Reaktivität durch Zugabe von Tetrazol nochmals erhöht. Dabei entsteht durch nukleophile Substitution am Phosphor-Atom aus dem Nukleosid- β -cyanoethylphosphoamidit ein -tetrazolid, das

genügend reaktiv ist, um mit der zuvor freigesetzten 5'-OH-Gruppe des trägergebundenen Nucleosids nahezu quantitativ zu reagieren. (Thein et al. 1986).

Bei dieser Gleichgewichtsreaktion läßt sich die Reaktion nur bei absolutem Wasserausschluß in Richtung der erwünschten Produkte verschieben. Deshalb werden sämtliche Reaktionen unter Argon-Atmosphäre durchgeführt.

Weil eine solche Kondensationsreaktion nicht zu 100 % verlaufen kann, verbleiben neben der soeben verlängerten Nucleotidkette ca 1-2 % an nicht umgesetztem Ausgangsprodukt. Diese 1-2 Prozent reichern sich mit zunehmender Zahl an Additionsreaktionen an. Nach durchaus üblichen 20 Reaktionen könnte sich das zu etwa 20 % summieren und wäre nur sehr schwer vom Hauptprodukt abzutrennen. Deshalb werden die nach jeder Monomeraddition nicht umgesetzten 5'-OH-Gruppen durch einen "Capping -Schritt", Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und N-Methylimidazol als nukleophile Aktivator, maskiert. Die so gebildete Phosphorigsäureester-Internucleotidbrücke ist sowohl in saurem als auch in basischem Milieu instabil und wird zu stabilerem 5-wertigem Phosphorsäureester oxidiert. Man benutzt als Oxidationsmittel Iod in basischem Tetrahydrofuran (THF) und eine Spur Wasser als Sauerstofflieferant. Die Addition ist damit abgeschlossen und wird jeweils pro anzufügender Base wiederholt.

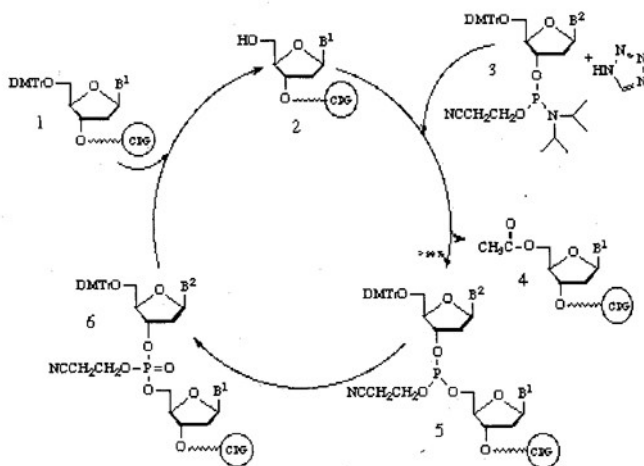


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Aufbaureaktion eines Oligonucleotids: (1) Die „letzte“ Base (3'-Ende) ist an das Säulenmaterial gekoppelt. Mit Trichloressigsäure wird die DMTr-Gruppe abgespalten (2), so daß weitere Monomerbausteine an der 5'-Position angebaut werden können (3). Nicht umgesetzte 5'-OH-Gruppen werden durch einen Capping-Schritt (Acetylierung mit Essigsäureanhydrid, (4)) inaktiviert. Der erhaltene Phosphorigsäureester (5) ist sehr instabil und wird zu stabilerem 5-wertigem Phosphorsäureester (6) oxidiert. Danach kann der nächste Monomerbaustein angefügt werden.

Mittels Computer werden sowohl Abfolge und Dauer der jeweiligen Reagenzienbeschickung, als auch Spülvorgänge gesteuert. Die Kopplungseffizienz wird nach jedem Syntheszyklus anhand der Konzentration an Dimethoxytrityl-kationen bestimmt, die in saurer Lösung eine orange Farbe besitzen und "On-line" photometrisch bestimmt werden. Bei Geräten anderer Hersteller werden sie durch Leitfähigkeitsmessungen der Reaktionslösung bestimmt.

Schwankt die Qualität der Reagenzien, beispielsweise durch Alterung, kann es zu erheblichen Verlusten bei der Ausbeute kommen. Werden bei 98,5 % Ausbeute pro Zyklus noch mehr als 80 % Endprodukt erhalten, bleiben bei 97 % nur noch 60 % an Primer-Endprodukt übrig.

Nach dem Ende der Synthese wird das Oligonukleotid mit 25 %igem Ammoniak, in ca. 45 min bei RT, von der Trägermatrix abgespalten. Anschließend wird die ammoniakalische Lösung zur Abspaltung der basenlabilen Schutzgruppen erhitzt (8 h bei 55 °C). Danach liegt ein Produktgemisch vor:

- Gewünschtes Oligonukleotid als Hauptprodukt
- Durch Capping entstandene kürzere Oligonukleotide der Länge n-1, n-2....
- Durch "Depurinierung" entstandene kürzere Fragmente
- Schutzgruppenfragmente

Zur Isolierung des Oligonukleotids aus diesem Rohgemisch gibt es drei gängige Verfahren, Gelelektrophorese, HPLC und Kapillarelektrophorese, die alle in Andrus et al. (1990) publiziert sind. Für die hier beschriebenen Versuche war es normalerweise nicht notwendig die Oligonukleotide weiter aufzureinigen, sondern sie konnten in der Speedvac in einigen Stunden lyophilisiert werden. Nur in seltenen Fällen, meist beim Sequenzieren mit dem ABI 377 kam es zu Problemen, womöglich durch nicht-abgetrennte Capping-Produkte, die kürzere Primer-Fragmente darstellen und somit durch unspezifisches Annealing zur Bildung weiterer Amplifikate führten. Nicht auszuschließen sind natürlich auch Störungen der PCR-Puffer durch unzureichend entsalzte Primer.

Die Verwendung definierter Mengen von Primern ist ebenso essentiell für das Gelingen der PCR wie die eingesetzte Menge an DNA (siehe 4.8). So sollte der molare Überschuß an Primer gegenüber der DNA-Matrix nicht mehr als einen Faktor 10^7 betragen.

Deshalb ist es von Bedeutung, die lyophilisierten Primer in Wasser aufzunehmen und spektrometrisch zu vermessen. Dies geschieht wie bei der DNA-Konzentrationsbestimmung (siehe 4.9) mittels UV-Spektrophotometer oder MWG-Reader. Allerdings müssen für die Verwendung des Spektrophotometers 2 µl in 498 µl Wasser, für den MWG-Reader 2µl in 300 µl TE-Puffer gemischt werden. Außerdem werden für die Konzentrationsberechnungen die Werte bei 260 nm verwendet. Zur Überprüfung der Existenz von Verunreinigungen, organischen Verbindungen oder Salzen, wird der 230 nm-Wert ebenfalls ermittelt. Der Quotient ME230/ME260 sollte kleiner als 0,9 sein. Aus Dreifachmessungen wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Faktor 5 multipliziert,

womit man die Primerkonzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erhält. Die Primer wurden in Lösungen von $50 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ eingesetzt.

Als erstes erfolgte die Berechnung der Primer-Konzentrationen in $\text{pmol}/\mu\text{l}$:

$$P = \frac{C}{N \times 330} \times 10^6$$

P = Konzentration der Ausgangslösung in $\text{pmol}/\mu\text{l}$

C = Konzentration der Rohprimerlösungen in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

N = Anzahl der Nukleotide des Oligos

330 = mittlere Molekülmasse eines Nukleotids

10^6 = Umrechnungsfaktor zur Berechnung in $\text{pmol}/\mu\text{l}$

Dann wurde berechnet wieviel Wasser (Z) zur Rohlösung (meist 1 ml Volumen) zugegeben werden muß, um die Stocklösungen, hier $50 \text{ pmol}/\mu\text{l}$, herzustellen.

$$Z = P \times V_a / C_x - V_a$$

Z = die Menge an Wasser, um die Lösung auf $50 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ einzustellen

P = Konzentration der Ausgangslösung in $\text{pmol}/\mu\text{l}$

V_a = Volumen der Ausgangslösung

C_x = einzustellende Endkonzentration der Lösung in $\text{pmol}/\mu\text{l}$

5.10 Herstellung der PCR-Reaktionsgemische ("Mixe")

Für die PCR wurden folgende Komponenten verwendet:

- a) SSP-PCR
 - 10 mM Tris HCl
 - 50 mM KCl
 - 1,5 mM MgCl_2
 - 0,1 % Gelatine
 - 0,2 % NP 40
 - 200 μM je dNTP (N=A,C,G,T)
 - 0,25-1 μM spezifische Primer

- 0,05-0,1 μM generische Primer (Kontrollreaktion)

Von jedem PCR-SSP Mix wurden 17 μl in eine Plattenvertiefung pipettiert. Es wurden jeweils Platten hergestellt, auf denen jede Kavität ein anderes Primergemisch beinhaltet. Diese vorgetropften Platten wurden dann bei -20 bzw. -80°C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden die Platten aufgetaut und mit 2 μl Glycerin/Kresolrot/Taq-Polymerase-Gemisch und 1 μl DNA (~ 300 ng) versetzt.

b) TaqMan-PCR

- 10 % 10x TaqMan-PCR-Puffer (Perkin-Elmer)
- 5 mM MgCl_2
- 200 μM je dATP, dCTP, dGTP, 400 μM dUTP
- 300 nM spezifische Primer
- 10 nM generische Primer
- 150 nM spezifische Sonde (FAM)
- 100 nM generische Sonde (TET oderVIC)

Von den TaqMan-Mixen wurden je 12 μl pro Kavität pipettiert und ebenfalls bei -20°C bzw. -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden 3 μl eines UNG/Taq/DNA (30 ng)-Gemischs zugegeben.

5.11 Sequenzierung mit dem ABI 377

Proben, die sich nach einer serologischen und anschließenden molekularen Testung (RFLP, SSP-PCR) nicht eindeutig bestimmen ließen, wurden mit dem ABI 377 sequenziert. Das Prinzip beruht darauf, daß der Nukleotidmix zu einem gewissen Prozentsatz aus fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden, den sogenannten Dye-Terminatoren besteht. Jedes Dideoxynukleotid ist mit einem anderen Farbstoff versehen. Der Einbau der Dideoxynukleotide während der Sequenzierreaktion (einfache Polymerasereaktion) bewirkt das zufällige Abbrechen der DNA-Synthese an der Stelle des Einbaus des jeweiligen ddNTP. Es entstehen unterschiedlich große DNA-Fragmente, die sich durch unterschiedliche Fluoreszenz-Emissionen eindeutig den jeweiligen Basen zuordnen lassen. Statistisch gesehen treten solche Kettenabbrüche an allen Positionen des Amplifikats auf. Durch ihre unterschiedlichen Längen besitzen die PCR-Produkte ein unterschiedliches Wanderungsverhalten während der Gelelektrophorese. So wandern kurze Amplifikate schneller als längere und werden vom Scanner im unteren Bereich des Gels zuerst

detektiert. Über die Reihenfolge der aufgenommenen Signale werden Rückschlüsse über das tatsächliche Amplikon möglich (Elektropherogramm).

Im Bereich der Klasse II-Sequenzierung wurden die Messungen, wie auch bei der SSP-PCR, auf das variable Exon II beschränkt. Da dieses nicht viel mehr als 300 Basenpaare besitzt, kann es in einem Ansatz und einem Primerpaar pro Genort sequenziert werden.

Es wurden nur DNA-Proben verwendet, die durch eine SSP-PCR-Low-Resolution-Reaktion nicht eindeutig typisiert werden konnten. Das bedeutet, daß das Ergebnis aus vorausgehenden Versuchen für die Wahl der Primer für die Voramplifizierung benutzt werden konnte. DNA wurde mit gruppenspezifischen Primern voramplifiziert, die die zu bestimmenden Allele auf jeden Fall amplifizierten, aber nach Möglichkeit die Auswahl schon einschränkten. Das Amplifikat wurde auf Reinheit überprüft, indem 5 µl mit der gleichen Menge an BromPhenolBlau (BPB, 1:3) gemischt, auf einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt wurden. War mittels Ethidiumbromid nur ein Amplikon zu erkennen, wurde der Rest des Amplifikats mit einer Ethanol-fällung aufgereinigt. Dafür wurde der verbleibende Teil der PCR-Amplifikation mit 80 µl H₂O, 10 µl NaAc pH 4,6 und 250 µl 100 % Ethanol (RT) versetzt, gemischt, 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert (Mikro 24-48R, Hettich) und danach der Überstand entfernt. Der Rückstand wurde mit 250 µl 70 % Ethanol (RT) gewaschen, 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgeschüttelt, eventuelle Reste mit einem Papiertuch aufgenommen und das Pellet 5 min in der Speed-Vac getrocknet. Die Sequenzierreaktion wurde mit entsprechenden spezifischen Primern angesetzt.

Es wurde ein Premix von ABI benutzt, der die 4 Nukleotide beinhaltet, die mit den 4 verschiedenen Dye-Terminatoren markiert sind. Dieses PCR-Produkt mußte ebenfalls aufgereinigt werden, um nicht eingebaute, markierte Nukleotide abzutrennen, die die Detektion stören könnten (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Diagnostics). Eine Kontrolle der Spezifität und der Aufreinigung fand wiederum mittels Agarose-Gel-Elektrophorese statt. In der Zwischenzeit wurden die Glasplatten mit 4 M KOH und anschließend mit Alkonox und dann mit Isopropanol geputzt. Dabei war zu beachten, daß keine Streifen oder Fusseln auf den Glasplatten zurückblieben, die die Detektion der Fluoreszenz-Strahlung hätten stören können. Die Platten wurden aufeinandergelegt, an den Seiten Spacer dazwischengeklemmt und das Ganze mit Klammern zusammengehalten. Dann wurden sie fast waagrecht, nach unten leicht schräg geneigt, abgelegt. Das 10 %ige SDS-Gel wurde angesetzt (21 g Harnstoff, 8,4 ml Acrylamid, 6 ml 10x TBE, 20 ml AquaBidest), mit der Wasserstrahlpumpe filtriert und 5 min lang entgast (2 l 10x TBE wurden mit 216 g Tris, 110 g Borsäure, 14,8 Na₂EDTA angesetzt). 25 µl TEMED, 250 µl APS (10 %) wurden zugegeben, kurz gemischt und möglichst ohne abzusetzen, blasenfrei gegossen. Das Wandern der Gelflüssigkeit konnte durch leichtes Klopfen gegen die Glasplatten unterstützt werden, bis es an der unteren Seite herauslief. Danach wurde das Ganze flach hingelegt und der Haifischzahnkamm mit der stumpfen

Seite eingeschoben. Nach etwa 1 h war das Gel auspolymerisiert, die Platten und der entfernte Kamm wurden nochmals mit Alkonox und Isopropanol geputzt. Der Kamm wurde nun mit den Zähnen soweit in das Gel geschoben, daß noch genügend Platz vorhanden war, um die Taschen beladen zu können. Das Gel wurde anschließend mit den Platten in das Meßgerät eingesetzt. Bei der Durchführung eines Plattenchecks durften keine Verschmutzungen erkennbar sein, ansonsten wurde der Putzvorgang wiederholt. Nach Einfüllen des Puffers wurde ein 1 stündiger Vorlauf (Pre-Run) durchgeführt, um etwaige mobile Reste aus dem Gel zu entfernen. Dann konnten die ersten Proben geladen werden. Zuerst wurden die Taschen mit Puffer gespült, dann mit ungerader Benennung (Spuren 1, 3, 5 etc.) beladen, die geraden blieben zunächst leer. Nachdem die Proben etwa 15 min eingelaufen waren, wurde nochmals gespült und die übrigen Taschen beladen (gerade Ziffern). Mit diesen wurde genauso verfahren. Nach einem letzten Spülschritt konnte der Lauf gestartet werden. Das Gerät speicherte die Daten und schaltete automatisch ab, sobald die eingestellte Zeit (für 300 Basen sind etwa 5 h ausreichend) abgelaufen war. Die Auswertung konnte mit dem Programm Matchmaker oder Matchtools durchgeführt werden. Oftmals war es nötig die Elektropherogramme zu überprüfen, da es je nach Parametereinstellung zu Interpretationsschwierigkeiten der Software kam (siehe Ergebnis-, Diskussionsteil).

6 Experimenteller Teil

6.1 Prinzip des TaqMan-Verfahrens

Die TaqMan-Methode zur HLA-Typisierung, die in dieser Arbeit beschrieben wird, basiert auf dem Verfahren der PCR. Sie funktioniert ähnlich wie die SSP-PCR, bei der die Amplifizierung durch 2 spezifisch bindende Primer initiiert wird. Für die Detektion wird jedoch eine Sonde benötigt, ein spezifisches, zusätzliches, an beiden Enden Fluoreszenz-markiertes Oligonukleotid, mit dessen Hilfe der Verlauf der PCR während der Reaktion beobachtet werden kann. Holland P. M. et al. (1991) beschrieben erstmals den 5'Nuclease Assay, der die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase zur Detektion ausnutzt. Diese Technik erforderte allerdings den Umgang mit Radioaktivität, da ^{32}P -markierte Sonden verwendet wurden, sowie ein aufwendiges Post-PCR-Processing, welches intakte Sonden und Sondenfragmente mittels Dünnschichtchromatographie voneinander unterscheiden konnte. Lee et al. (1993) ersetzte 1993 die radioaktiven Sonden durch fluorogene Sonden. Das senkte die Kosten, da das Arbeiten mit Radioaktivität entfiel, aber auch den Arbeitsaufwand, da der Abbau der Sonden ohne zusätzliche Post-PCR-Schritte detektiert werden kann. Die TaqMan-Methode besitzt im Vergleich zur SSP-PCR eine doppelte Spezifität, da nicht nur die Primer, sondern auch die fluorogene Sonde spezifisch binden müssen. Man wählt hierfür eine Schmelztemperatur, T_m , die 5-10 °C über der der Primer liegt, um zu gewährleisten, daß die Sonde auch effizient bindet. Wäre nur ein kleiner Anteil gebunden, wäre die Intensität der Fluoreszenzsignale zu gering. Nach dem Binden der Primer beginnt die Taq-Polymerase vom 3'-Ende der Primer zu amplifizieren (siehe Abbildung 5.1). Erreicht die Polymerase das 5'-Ende der ebenfalls an die DNA-Matrix gebundenen Sonde, verdrängt sie die ersten Basen der Sonde von der Matrizen-DNA. Es entsteht dabei eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert und die Sonde in Fragmente oder einzelne Basen zerschnitten wird. Dadurch wird die räumliche Nähe und damit auch der Förster-/ oder Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) zwischen Reporter (Farbstoff, der sich bei Licht von einer Wellenlänge von 488 nm anregen läßt) und Quencher (Farbstoff, der Energie von angeregten Reporter-Molekülen aufnimmt und bei einer deutlich anderen Wellenlänge als der Reporter abstrahlt) unterbrochen, wodurch das Fluoreszenz-Signal des Reporters proportional zur Amplifizierung ansteigt und das Quencher-Signal gleichzeitig leicht abfällt. Freie, ungebundene Sondenmoleküle werden dabei nicht geschnitten.

Probe

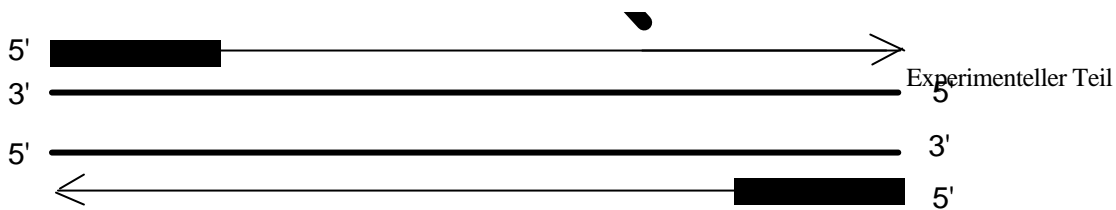


Abb. 5.1 zeigt das Prinzip des TaqMan-Verfahrens.

Prinzip:

- A) Primer und Sonde hybridisieren an die DNA-Stränge. Die Taq-Polymerase beginnt an den 3'-Enden der Primer zu amplifizieren. In der intakten Sonde sendet der Reporter-Farbstoff nur mit sehr geringer Intensität Lichtstrahlung aus, da die Anregungsenergie fast vollständig vom Quencher aufgenommen und bei höherer Wellenlänge abgestrahlt wird.
- B) Erreicht die Taq-Polymerase die Sonde, so verdrängt sie die ersten Basen. Die entstehende Y-Struktur (auch als Gabelstruktur bezeichnet) aktiviert die 5' Nuclease-Aktivität der Polymerase.
- C) Die einsetzende 5' Nuclease-Aktivität resultiert in einem Zerschneiden der Sonde in Fragmente oder gar einzelne Basen.
- D) Ist die Sonde fragmentiert, sind Reporter und Quencher räumlich weiter voneinander entfernt. Der Energietransfer zwischen den beiden Farbstoffmolekülen ist erschwert, was zu einem deutlichen Anstieg der Reporter-Fluoreszenz führt.

Mit dem ABI PRISM wird die PCR durchgehend verfolgt, d.h. die PCR-Reaktionsgefäße werden mit Hilfe eines Lasers bei 488 nm bestrahlt und die Emissionsintensität gemessen. Abb. 5.2 zeigt 2 Reaktionen: Die untere Kurve stellt eine Kontrollreaktion dar, bei der nur ein schwaches Reporter-Signal (FAM, 518 nm), und ein Quencher-Signal (TAMRA, 586 nm) gemessen wird. Im oberen Teil ist eine Reaktion dargestellt, bei der es zu einer spezifischen Amplifizierung kam. Das Reporter-Signal ist deutlich über das Quencher-Signal angestiegen.

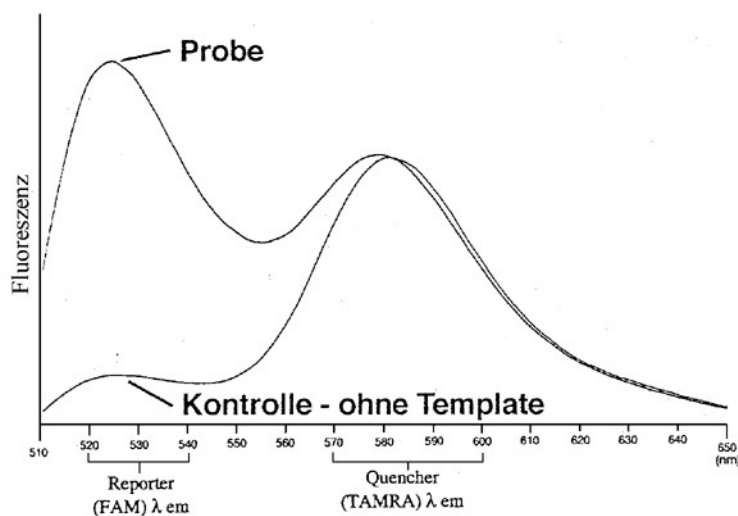


Abb. 5.2: Emissions-Intensitäten nach der PCR

6.1.1 Farbstoffe

Als Reporter-Farbstoffe werden gewöhnlich Fluorescein-Derivate eingesetzt. Substitution durch Halogene oder durch Alkoxy-Gruppen bewirken eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen (Rotverschiebung).

Rhodamine, wie TAMRA und ROX werden als Quencher eingesetzt. Sie emittieren bei deutlich höherer Wellenlänge und sind deshalb leicht von den Fluoresceinen unterscheidbar.

Farbstoff	Emissionswellenlänge in nm
FAM	518
TET	538
VIC	551
JOE	554
HEX	556
TAMRA	582
ROX	610

Tab. 5.1: Quencher und Reporter mit Anregungs- und Emissionswellenlängen.

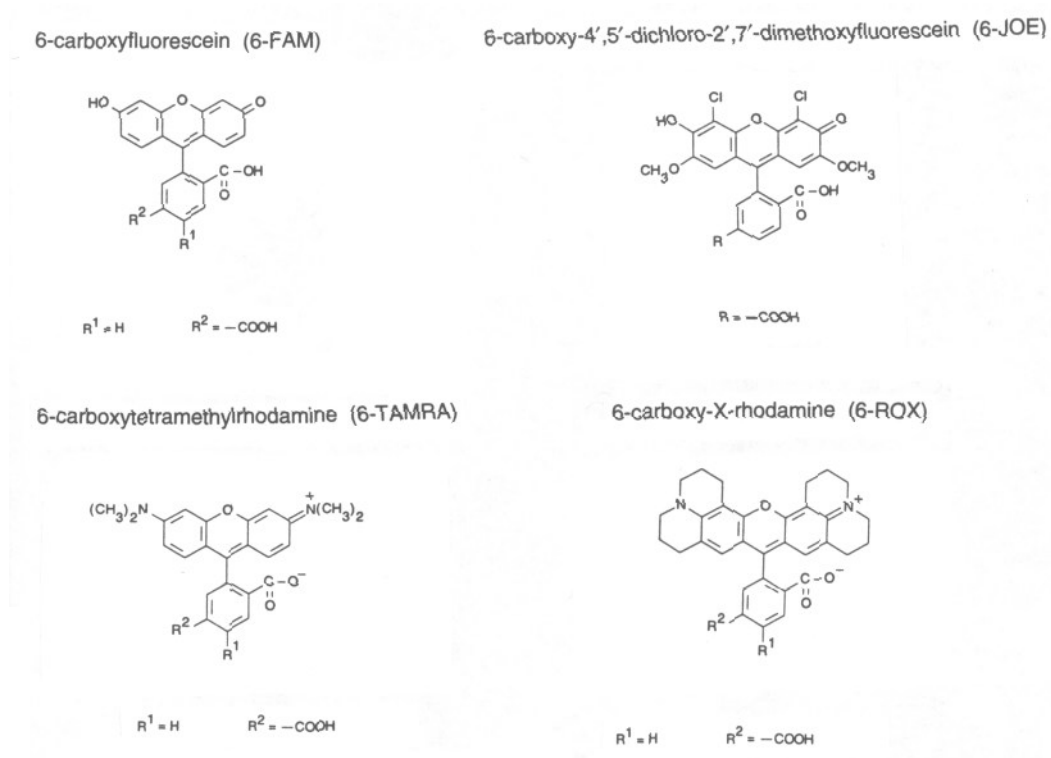


Abb. 5.3: Strukturformeln je zweier häufig verwendeter Fluoresceine und Rhodamine

So eignen sich beispielsweise FAM und HEX für eine sogenannte Multiplex-PCR. Bei einer Multiplex-PCR laufen 2 oder mehr Amplifikationen parallel in einem Reaktionsgefäß ab, die jedoch durch die unterschiedlichen Emissionswellenlängen der Farbstoffe unterscheidbar bleiben. Der Farbstoff HEX kann bei der Kopplung an das Oligonukleotid Schwierigkeiten bereiten, was die Synthese HEX-markierter Sonden stark erschwert und damit auch verteuert. Außerdem ist die

Strahlungsintensität solcher Sonden relativ schwach, so daß in der vorliegenden Arbeit zunächst auf die Kombination FAM und TET, später VIC zurückgegriffen wurde. Überlagerungen der beiden Kurven (siehe Abbildung 5.4) können nach der Eichung des Gerätes mit reinen Farbstoffen durch eine spezielle Funktion der Auswertungssoftware korrigiert werden. Bei dieser optionalen Additive ("spectral compensation") wird das erhaltene Meßspektrum mit den Spektren der reinen Farbstoffe ("pure dyes") verglichen, mit denen das Gerät vor Inbetriebnahme geeicht wurde, und für die Zuordnung der Signale zu den vor dem PCR-Lauf gewählten Farbstoffen verwendet. Werden Farbstoffe mit anderen Emissionsspektren verwendet, muß das Gerät neu geeicht werden. Dies war im Falle des neu entwickelten Farbstoffes VIC erforderlich, da es im Panel des ersten Kalibrierkits nicht vorhanden war. Dieser Farbstoff emittiert fast im gleichen Wellenlängenbereich wie HEX, läßt sich aber leichter chemisch koppeln (günstigere Verbrauchskosten) und besitzt eine deutlich höhere Strahlungsintensität (4X). Das Maximum des abgestrahlten Lichts liegt von FAM weiter entfernt als das bisher als Reaktionskontrolle genutzte TET. Da die Peaks sich weniger stark überlagern, sind die verschiedenen Signale besser unterscheidbar (gezielter den jeweiligen Farbstoffen zuzuordnen) und vermeiden Probleme bei der Auswertung durch die Software. Deshalb wurde im Low Resolution Assay eine VIC-gelabelte Sonde als Amplifikationskontrolle eingesetzt. Die Sequenz entspricht völlig der TET-gelabelten Version aus den Subtypisierungen und kann diese somit ersetzen, gewährleistet aber eine zuverlässigere Auswertung.

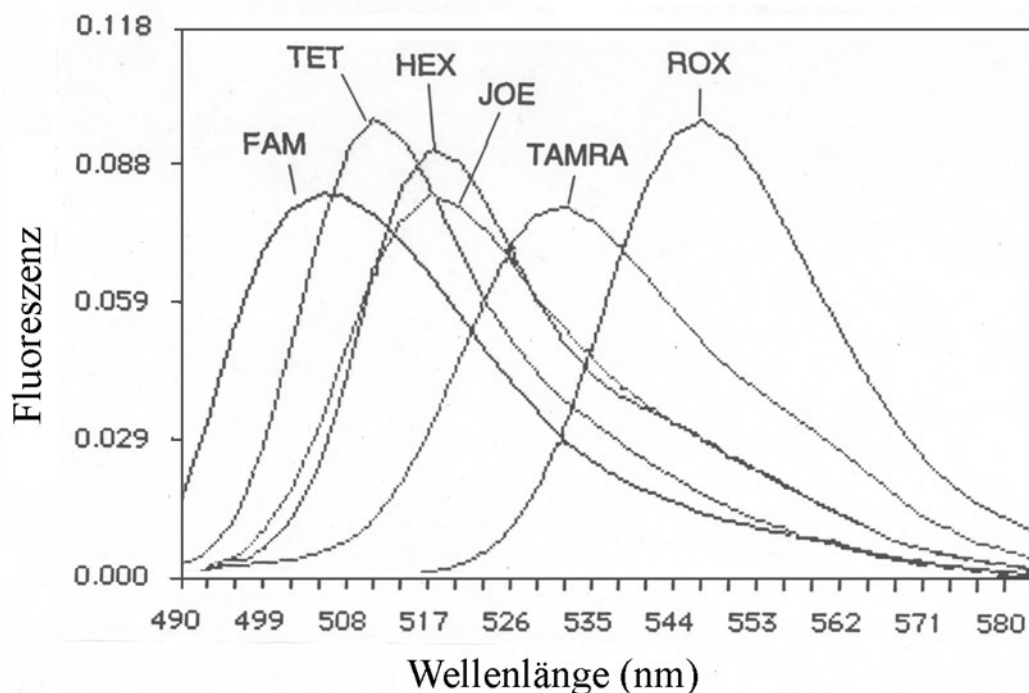


Abb. 5.4: Unterschiedlichen Emissionskurven der Farbstoffe.

Am 5'-Ende der Sonde befindet sich der Reporter-Farbstoff (meist FAM), der kovalent über eine Phosphatgruppe an die erste Base gebunden ist. Es folgt die spezifische Sequenz der Basen, die über das Phosphat-Zucker-Rückgrat miteinander verbunden sind, sowie am 3'-Ende der Quencher, der über ein Linker-Arm-modifiziertes Nukleotid (LAN, mit einem 6C-Linker Arm an die 4 β -Position des Thymin-Ringes gebunden ist) oder direkt an die letzte Base gebunden ist. Wird der Quencher über ein Thymin angefügt, ist es notwendig die Sonde am 3'-Ende noch chemisch zu phosphorylieren, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR und eine Zerstörung durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Proofreading) zu vermeiden. Die in der vorliegenden Arbeit von Applied Biosystems verwendeten Sonden waren auf diese Weise hergestellt.

Eine intakte FAM-TAMRA gelabelte Sonde besitzt fast keine FAM-, aber deutliche TAMRA-Intensität. Erst wenn eine Amplifizierung stattfindet, die Sonde geschnitten wird und damit der FRET zwischen den Farbstoffen gehemmt ist, steigt das FAM-Signal stark an und das TAMRA-Signal fällt ab.

ROX ist ebenfalls ein Quencher, der mit FAM an ein Oligonukleotid gekoppelt ist und als sogenannter interner Standard im PCR-Puffer enthalten ist. Unterschiede bei den ROX-Signalen der einzelnen Reaktionen zu Beginn der PCR weisen darauf hin, daß unterschiedliche Volumina pipettiert wurden.

Ein Verdampfen während der PCR, z.B. durch undichte Deckel, wird ebenfalls durch ein abnehmendes ROX-Signal angezeigt und kann durch geringeren Flüssigkeitsstand nach der PCR bestätigt werden. Da es sich hierbei um ein Oligonukleotid handelt, kann es sein, daß die Sequenz mit den untersuchten DNA-Abschnitten hybridisiert und zu einem geringen Teil geschnitten wird. Das ROX -Signal fällt deshalb kontinuierlich ab (Falling-ROX-Problem). Dieser unerwünschte Nebeneffekt ist aber nicht von einem Verlust des Reaktionsvolumen begleitet und deshalb davon unterscheidbar. Er sollte aber für die Generierung der Baseline in Betracht gezogen werden.

Es gibt grundsätzlich 2 Modi, in denen der ABI PRISM 7700 benutzt werden kann:

Im Real-Time Modus werden Fluoreszenzwerte in kurzen Abständen während der gesamten PCR gemessen und für die Generierung von Kurven verwendet (Abb. 5.2). Für eine solche PCR-begleitende Messung und Auswertung benötigt das Gerät knapp zwei Stunden. Für viele Anwendungen ist allerdings auch eine Endpunktbestimmung (End-Point Modus) ausreichend. In diesem Falle werden herkömmliche Thermocycler zur Amplifizierung benutzt und das Meßgerät nur zur Fluoreszenzdetektion der Fluoreszenzwerte nach der PCR (10 sec) und zur Auswertung der Daten (wenige Minuten) verwendet. Diese Kombination macht das Gerät für einen Hochdurchsatzeinsatz tauglich (5.1).

Insbesondere für die Auswertung nach dem End-Point Modus müssen 2 "dye-layer" ein "FAM-layer" für die spezifische (Abb. 5.5a) und ein "TET- oder VIC-layer" für die generische Detektion

(Abb. 5.5.b) definiert werden. Zu typisierende Reaktionen werden als UNKNOWN (UNKN) bezeichnet, als Negativ-und Kontaminationskontrolle werden NO Template Controls benutzt (NTC), d.h. statt DNA wird nur Wasser zu dem fertigen Mix pipettiert.

UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC
UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC
UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC
UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC
UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC
UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC
UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC
UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC
UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	NTC

Abb.5.5a: Spezifisches "FAM-layer"

Als generische Detektion wird ein TET-layer generiert, das als Amplifikationskontrolle dient. "UNKNOWNs" werden als IPC+ definiert, allerdings ist es nötig der Software negative Amplifikationskontrollen zu präsentieren (IPC-).

IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-

Abbildung 5.5b: Generisches "TET-layer" (Positivkontrolle)

Dafür müssen mindestens 8 Reaktionen integriert sein, die im TET-System negative Ergebnisse liefern. Läßt man bei diesen Reaktionen die Primer für die generische Kontrolle weg, fügt aber ansonsten alle Komponenten, auch die Sonde, hinzu, bekommt man die gleiche Hintergrund-Fluoreszenz, aber keine wirklich detektierbaren Signale für das TET-System.

Das normalisierte Reporter-Signal (R_n) entsteht durch das Fluoreszenzsignal des Reporters, dividiert durch das Signal der passiven Referenz (ROX). Der ΔR_n wird gebildet, indem man vom R_n -Wert den Fluoreszenzwert abzieht, der in der Regel zwischen den Zyklen 1 und 15 generiert wird. In dieser Arbeit werden nur ΔR_n -Werte verwendet.

Zusammengefaßt bedeutet das, daß es 3 Typen von Kontrollen gibt:

- Kontaminationskontrollen (NO TEMPLATE CONTROL, NTC), denen nur Wasser statt DNA zugegeben wird (mindestens 8 NTC's).
- Amplifikationskontrollen (IPC), die die Anwesenheit und Qualität von DNA und verwendeten Reagenzien prüft. "Normale" zu untersuchende Reaktionen werden als IPC+, spezielle Reaktionen, die keine Primer für das generische PCR-System enthalten, als IPC- definiert (mindestens 8 IPC-).
- Eine passive Referenz, bei der der Farbstoff ROX Volumenschwankungen detektiert und die als Normalisierung dient (in allen Reaktionen vorhanden).

6.1.2 Kontaminationsschutz

Auch wenn durch die Detektion im Reaktionsgefäß keine Gefahr droht, bei der Detektion PCR-Produkt eines anderen Reaktionsgefäßes nachzuweisen, bleibt ein Restrisiko durch beim PCR-Ansatz eventuell eingebrachtes Amplifikat. So dient Uracil-N-Glycosylase (UNG) als Schutz vor Kontaminationen. Benutzt man dUTP anstatt dTTP, können verschleppte Amplifikate durch einen UNG-Verdau vor der PCR zerstört werden.

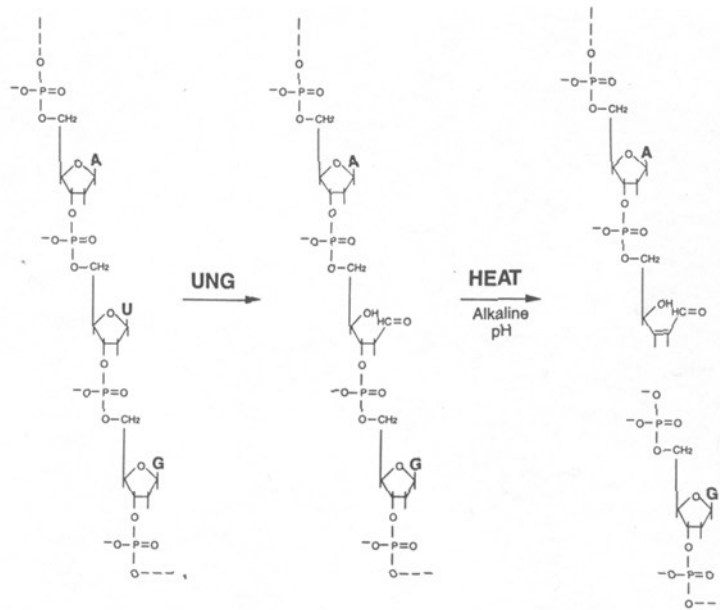


Abb. 5.6: Funktionsweise der Uracil-N-Glycosylase

Template-DNA enthält dTTP und wird nicht zerstört (Abb. 5.6). Weiterhin wird eine "Hot-Start-Polymerase" (AmpliTaQ Gold) verwendet, die im nativen Zustand inaktiv ist und erst durch einen ausgedehnten Denaturierungsschritt bei 95 °C ausreichend Aktivität erhält.

6.1.3 Sondendesign

Die Effizienz der Sonde ist einerseits von der Sequenz und der T_m , aber auch vom FET abhängig (Förster 1948). Der FET ist abhängig von der räumlichen Nähe von Reporter- und Quencher-Fluorophor untereinander und ist umgekehrt proportional zur 6. Potenz des Abstandes der beiden Farbstoffe untereinander. Deshalb wurde der Quencher zunächst möglichst nahe am Reporter (5'-Ende), d.h. nur wenige Basen vom 5'-Ende entfernt platziert (Lee et al., 1993), was jedoch das Hybridisieren der Sonde erschwerte. Weitere Untersuchungen von Livak et al. (1995) zeigten, daß es auch möglich ist, den Quencher direkt am 3'-Ende zu platzieren. Dieser Sondenaufbau besitzt mehrere Vorteile. Auch wenn die Sonde nur in 1 oder 2 große Fragmente geschnitten wird, werden die Farbstoffe auf jeden Fall voneinander getrennt und die Reaktion damit detektierbar. Weiterhin verbessert der 3'Quencher die Hybridisierungseffizienz der Sonde, da TAMRA die Basenpaarungseigenschaften weniger negativ beeinflusst, wenn es am Ende des Oligos über ein LAN gekoppelt wird.

Für das Sondendesign empfiehlt sich das Programm Primer Express. Man importiert die entsprechende Sequenz und läßt das Programm selbständig Primer und Sonde suchen (Sonde 1, 4). Allerdings ist man bei der HLA-Typisierung darauf angewiesen, genau eine Basenmutation zu detektieren. Das bedeutet, daß es bei Eingabe dieser Primer oder gewisser relevanter Sequenzabschnitte vorkommt, daß das Programm keine "optimalen" Oligos findet. In solchen Fällen

muß die Sonde "per Hand" gesucht werden (Sonde 2, 3). Um eine möglichst hohe Effizienz zu erreichen, ist es wichtig, daß die Sonde stabil an die Zielsequenz hybridisiert.

Für die Ermittlung der entsprechenden Sequenzen sind folgende Kriterien relevant:

- Der GC-Gehalt sollte etwa 50 % sein.
- Es dürfen nicht mehr als 3 gleiche Nukleotide in Folge auftreten.
- Eine Komplementarität zu den PCR-Primern sollte vermieden werden (Verhinderung von Primer-Dimer Bildung).
- Die T_m der Sonde sollte ≥ 10 °C über der der Primer liegen, um die höhere Stabilität der Primer-Template-Anbindung zu kompensieren, da das Sonden-Zielsequenz-Hybrid nicht wie das Primer-Zielsequenz-Hybrid zur Extension kommt und somit auch nicht von der AmpliTaq DNA-Polymerase stabilisiert wird (Bestimmung der T_m erfolgt nach der Nearest-Neighbour-Methode (Rychlik, W. et al.,1990).
- Für eine ausreichende Spezifität verwendet man meist Sonden mit einer Länge zwischen 20 und 30 Nukleotiden. Ist der G/C-Gehalt sehr hoch, kann eine Sondenlänge von 15 Nukleotiden ausreichen. Sonden mit mehr als 35 Basen Länge werden hingegen selten benutzt: Es gilt die Sonde grundsätzlich möglichst kurz zu wählen, da längere Sonden durch Ausbildung von Sekundärstrukturen Probleme bei der Hybridisierung verursachen, die Hybridisierungstemperatur durch die hohe T_m schwer zu wählen ist und die Herstellungskosten stark zunehmen.
- Prinzipiell läßt sich die Sonde überall innerhalb des Amplicons zwischen den beiden Primern plazieren. Die Sonde sollte aber auf dem Strang liegen, der mehr C's als G's enthält.
- Guaninbasen in direkter Nähe zu den Fluorophoren sollten vermieden werden, da sie ebenfalls als Quencher agieren und somit die Fluoreszenzwerte mindern können.
- Idealerweise ist das 5'-Ende der Sonde relativ nahe, d.h. weniger als 50-60 Basen vom 3'-Ende des PCR-Primers entfernt, um sicherzustellen, daß schon das erste Taq-Molekül bei der Primerextension auf die hybridisierte Sonde trifft und sie hydrolisiert.

6.2 Entwicklung der High Resolution DRB1*15/16 Typisierung mittels TaqMan

Soweit dies möglich war, sollte sich das zu etablierende System am bereits existierenden, konventionellen SSP-PCR High Resolution Panel orientieren und möglichst kompatibel zu diesem sein. Es wurden die Mixe 15.1/2/3/6 für Vorversuche ausgewählt, da die hiermit zu bestimmenden Spezifitäten DRB1*1501, DRB1*1502 und DRB1*1503 in ausreichender Menge als Testmaterial zur Verfügung standen. Es wurde eine Sonde gesucht, die für alle 4 Primerkombinationen verwendbar war. In einem ersten Versuch wurde die Spezifität der Primer und der Sonde

untersucht. Um die optimalen Bedingungen und Konzentrationen zu ermitteln, wurden Titrationsreaktionen angesetzt. Während bei der konventionellen PCR eine Mg^{2+} -Konzentration zwischen 1 und 2 mM eingesetzt wird und für eine möglichst hohe Effektivität, aber auch Spezifität sorgt, benötigt die TaqMan-PCR eine deutlich höhere Konzentration, da zusätzlich noch der Quenching-Effekt berücksichtigt werden muß. Den größten Einfluß auf das Quenching hat der Abstand der beiden Fluorophore. Je weiter Reporter und Quencher voneinander entfernt sind, desto schwächer ist der Quenching-Effekt. Aufgrund elektrostatischer Abstoßung der negativ geladenen Phosphatgruppen des Moleküls /Kohlenhydratrückgrats der Sonde scheint das Oligo eine gestreckte Form anzunehmen, was den Abstand zwischen den Fluorophoren vergrößert (Livak et al., 1995). Durch eine höhere Mg^{2+} -Konzentration (3,5-6 mM) können diese Abstoßungskräfte durch Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Mg^{2+} -Ion kompensiert werden, was zu einer Verdrillung der Sonde an der DNA führt und dadurch zu einem kürzeren Reporter-Quencher-Abstand. Das ermöglicht eine optimale Hybridisierung der Sonde.

Bei den oben genannten 4 Mixen (15.1, 15.2, 15.4 und 15.6) wurde die jeweils optimale Magnesiumkonzentration ermittelt, indem jeweils 4fach-Ansätze mit Magnesium-Konzentrationen zwischen 1,5 und 9 mM verwendet wurden. In drei Fällen ergab sich eine optimale Mg^{2+} -Konzentration von 5 mM, nur für ein Mix war eine Konzentration von 3.5 mM geringfügig besser. Für alle weiteren Versuche wurde eine 5 mM Mg^{2+} -Konzentration verwendet.

Als nächstes wurden die Primerkonzentrationen gegeneinander abgeglichen, das heißt, es wurde eine Matrix des 5'- und des 3'-Primers mit Primerkonzentrationen von 300, 600 und 900 nM angesetzt. Es zeigte sich, daß eine Primerkonzentration von 300 nM ausreichend ist. Ebenso wurde die Sonde von 100 nM in 50 nM-Schritten bis 300 nM untersucht. Eine Konzentration der Sonde von 200 nM stellte sich als optimal heraus.

Um sicherzustellen, daß negative Reaktionen nicht aufgrund fehlender oder fragmentierter DNA oder Taq-Polymerase zustande kommen, ist es notwendig eine Amplifikationskontrolle für jede PCR-Reaktion durchzuführen. Das bedeutet, daß man bei der PCR-SSP-Methode eine zweite PCR parallel in jedem Ansatz durchführen muß, die von der ersten eindeutig unterscheidbar ist. Unterscheidbar heißt, daß zwei verschieden lange Amplifikate produziert werden, die auf dem Agarosegel zwei deutlich voneinander unterscheidbare Banden ergeben. Für den TaqMan-Assay wurden ein zweites Primerpaar und eine Sonde gesucht, die mit einem anderen Fluorophor (TET, später VIC) als Reporter markiert sind. Der Vorteil gegenüber der PCR-SSP-Methode besteht darin, daß die Zuordnung zu den Signalen durch die Auswertungssoftware eindeutig ist und somit eine Vertauschung nicht möglich ist. Als Region wurde eine 60 Basenpaar-lange, nicht-polymorphe Region auf Exon II des HLA-DMA-Gens ausgewählt. Da die beiden PCR-Systeme miteinander um die vorhandenen Reagenzien konkurrieren, mußte die Konzentration der DMA-Primer so

eingestellt werden, daß die Amplifikationen gut detektierbar waren, aber die spezifische FAM-Reaktion möglichst wenig beeinflusst wurde. Eine Konzentration von 10 nM (30-fach geringer!!) an Primer und 150 nM an Sonde bremst die spezifische Amplifizierung und Detektion nur unbedeutend. Die Tabellen Nr 5.2, 5.3 zeigen die Primersequenzen sowie Details über die Sonden.

In Tabelle 5.2 sind die Daten für die verwendeten TaqMan-Sonden dargestellt. Für die interne Kontrolle wurde zuerst Sonde 4, später Sonde 5 verwendet, die sich nur aufgrund der Markierung mit verschiedenen Reporterfarbstoffen (TET, VIC) unterscheiden:

Sonde	Sequenz	Länge (Basen)	T _m (°C)	Lokalisierung	Fluoreszenzmarker
1	5'FAM TCC GTG CGC TTC GAC AGC GAC-TAMRA PO4 3'	21	70	Ex 2 109-129	FAM
2	5'FAM AAT GGG ACG GAG CGG GTG CGG T-TAMRA PO4 3'	22	74	Ex 2 55-76	FAM
3	5'FAM-CCA AGA GGA GTA CGC GCG CTA C-TAMRA PO4 3'	22	72	Ex 2 89-101	FAM
4	5'TET-TCG CCT GCC CGA ATT TGC TGA-TAMRA PO4 3'	21	66	Ex 2 162-182	TET
5	5'VIC-TCG CCT GCC CGA ATT TGC TGA-TAMRA PO4 3'	21	66	Ex 2 162-182	VIC

Tab. 5.3: Sequenzen der Primer für die interne Amplifikationskontrolle mit Schmelztemperatur und Lage auf dem HLA-DMA-Gen.

Primer (IPC)	Nukleotid Sequenz (5'-3')	Länge (Basen)	T _m (°C)	Lokalisierung
sense	TCCCAGAACACTCGGGTGC	19	62	Ex 2 142-160
antisense	TCCCTGTTCTGAGCCAGT	20	64	Ex 2 182-201

Das Prinzip der SSP-PCR beruht auf der Spezifität der beiden Primer am 3'-Ende (Grundlagenteil). Unterscheidet sich die Template-DNA nur in einer Base vom entsprechenden Primer, kommt es nicht zu einer Amplifizierung. Bei schwachen Unterschieden des Primers von der Zielsequenz nahe am 3'-Ende kann es in einzelnen Fällen dennoch zu einer schwachen Amplifizierung kommen, was sich in einer falsch-positiven Beurteilung äußert (Abb. 5.7 oben). Bei der Entwicklung des TaqMan-Assays kam es bei dem Mix 15.4 zu solchen Kreuzreaktionen. Eine Reduzierung der DNA-Menge von 100 ng auf 30 ng verhinderte dies ebensowenig wie die Veränderung des PCR-Programms zu stringenteren Bedingungen (anstatt 40 Zyklen bei 60 °C wurden 10 Zyklen bei 65 °C und dann 30 bei 60 °C vorgenommen).

Tab. 5.4: Verwendetes PCR-Programm

Zeit	Temperatur (°C)	Zyklen	Erklärung
2'	50		UNG-Verdau der amplifizierten DNA
10'	95		Zerstören der UNG, Aktivieren der AmpliTaqGold, Denaturierung der DNA
15'' und 1'	95 65	10	Denaturierung Kombinierter Annealing und Extension Schritt (stringente Bedingungen)
15'' und 1'	95 60	28	Denaturierung Kombinierter Annealing und Extension Schritt
2'	25		Kühlschritt für Lagerung der PCR-Produkte

Auch ein Verkürzen und damit eine Erniedrigung der T_m der Primer konnte nicht das unspezifische Annealing unterdrücken. Erst das Einführen einer zusätzlichen Basenfehlpaarung (mismatching) nach dem "amplification refractory mutation system" Prinzip (ARMS, Newton et al., 1989) bewirkte ein Verschwinden der Kreuzreaktivitäten im beobachteten Zeitfenster. Ein schwächeres und in späteren Zyklen zu detektierendes Signal wird dabei in Kauf genommen, um ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten.

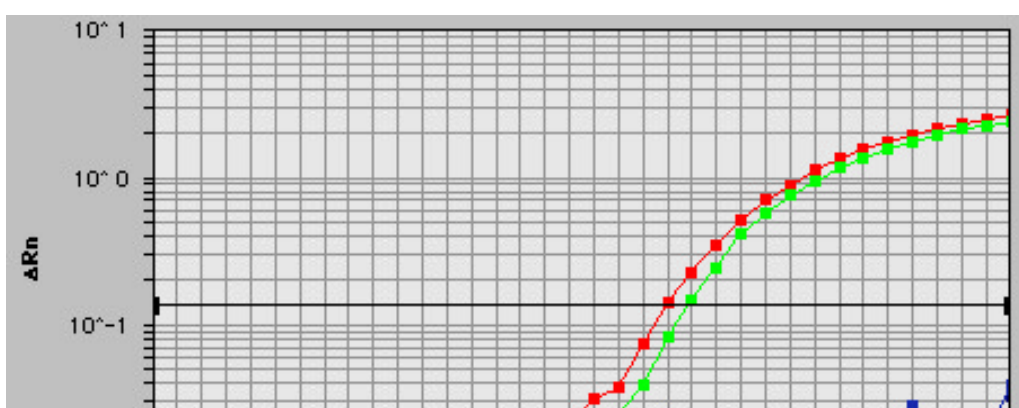
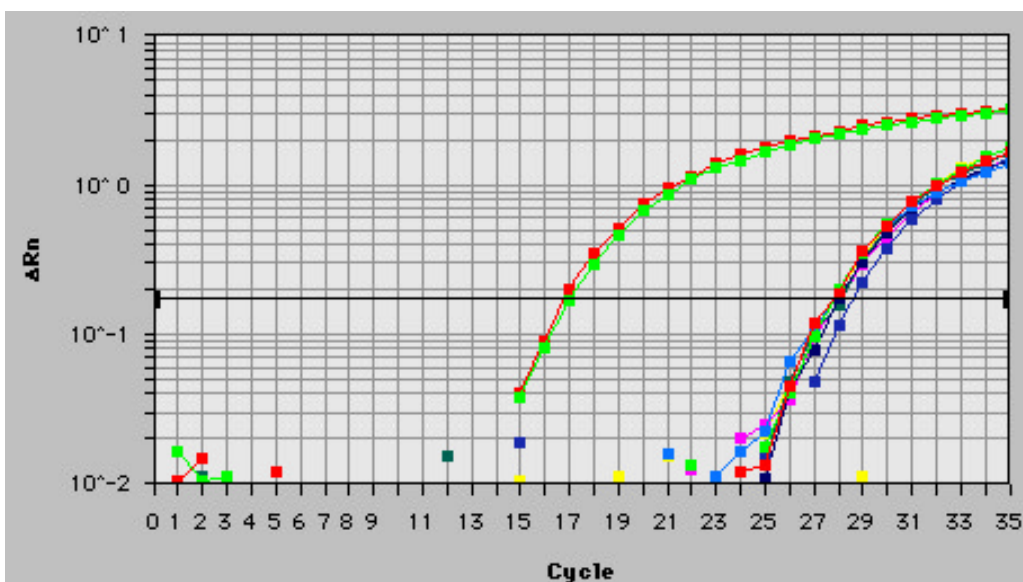


Abb. 5.7: Real-Time-Modus: Im obigen Teil der Abbildung sind Ergebnisse zu sehen, die mit herkömmlichen Primern erzielt wurden (richtig- und falsch-positive Signale). Im unteren Teil wurden nur ARMS-Primer verwendet (nur richtig-positive Signale).

Bisher wurden PCR-Reaktionen im 50 µl-Ansatz durchgeführt. Um Kosten zu sparen wurde schrittweise das Volumen auf 25, dann auf 10 µl reduziert, die Konzentrationen der einzelnen Komponenten jedoch beibehalten. Das Volumen der Reaktionsgefäße beträgt 200µl. Geht zuviel Wasser in die Dampfphase über, bzw. entweicht ein Teil davon durch nicht ganz dichte Gefäße, bewirkt das eine drastische Konzentrationsänderung, was sich auf die Signalintensität auswirkt oder die PCR inhibiert. Bei einem Beibehalten der optimierten Konzentrationen zeigte sich, daß die Fluoreszenzmeßwerte bei einem Gesamtvolumen von 10 µl zu schwach und zu wenig reproduzierbar waren, bei 15 µl dagegen zeigten sich noch deutliche und reproduzierbare Signale.

Probe 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
keine

DNA

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
16.1	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	?
		2.57	2.34	2.44	2.29	2.40	2.26	2.23	2.36	2.40	2.29	0.54	0.42
16.2	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	?
		0.51	0.47	0.48	0.48	0.50	0.53	0.46	0.59	0.49	0.49	2.09	0.39
16.3	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.43	0.41	0.44	0.39	0.42	0.35	0.42	0.43	0.43	0.41	0.47	0.47
16.4	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.47	0.46	0.47	0.41	0.47	0.45	0.45	0.46	0.41	0.45	0.48	0.44
16.5	E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
		2.52	1.33	2.09	2.37	2.22	2.28	2.25	2.40	2.46	2.29	2.33	0.51
16.6	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.39	0.30	0.37	0.31	0.35	0.29	0.20	0.43	0.34	0.35	0.35	0.40
16.7	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.30	0.27	0.27	0.38	0.37	0.38	0.37	0.26	0.31	0.30	0.47	0.50
16.1	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?
		2.70	2.67	2.82	2.80	2.86	2.62	2.77	2.79	2.71	2.68	0.65	0.57

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
	keine										DNA			
16.1	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IPC+	
		0.77	0.72	0.71	0.67	0.74	0.64	0.61	0.63	0.67	0.61	0.69	0.10	
16.2	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IPC+	
		0.72	0.67	0.66	0.60	0.73	0.62	0.64	0.63	0.60	0.66	0.56	0.13	
16.3	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IPC+	
		0.63	0.64	0.61	0.64	0.63	0.68	0.66	0.64	0.65	0.62	0.63	0.16	
16.4	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IPC+	
		0.65	0.60	0.67	0.68	0.66	0.69	0.66	0.64	0.65	0.65	0.61	0.15	
16.5	E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IPC+	
		0.50	0.66	0.57	0.56	0.60	0.61	0.56	0.59	0.47	0.52	0.59	0.13	
16.6	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IPC+	
		0.76	0.68	0.81	0.88	0.81	0.78	0.74	0.77	0.76	0.70	0.74	0.22	
16.7	G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IPC+	
		0.82	0.63	0.81	0.85	0.91	0.83	0.82	0.85	0.89	0.77	0.76	0.20	
16.1	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IPC-	
		0.15	0.10	0.11	0.15	0.12	0.07	0.10	0.16	0.08	0.04	0.17	0.11	

Abb. 5.8: Endpoint-Bestimmung: Der obere Teil der Abbildung zeigt das spezifische FAM-layer (Proben 1-10 sind DRB1*1601-positiv, Probe 11 DRB1*1602-positiv), während im unteren Teil die Amplifikationskontrolle dargestellt ist (TET-layer).

Für die Entwicklung des Assays war der "Real Time Modus" besonders wichtig, da bei diesem die Fluoreszenz während der gesamten PCR verfolgt wird. Hiermit können etwaige Störreaktionen oder Kreuzreaktionen sehr gut erkannt werden. Bei der Routine-Diagnostik, bei der ein höherer Durchsatz erwartet wird, ist die Durchführung der PCR im Real Time Modus jedoch ungünstig, da man sinnvollerweise mehrere PCR's gleichzeitig in mehreren Thermocyclern laufen lassen möchte. Um eine Auswertung der Fluoreszenz trotzdem zu gewährleisten, besteht die Möglichkeit einer Endpunkt (Endpoint)-Bestimmung (Abb. 5.8). Das bedeutet, die PCR kann in einem herkömmlichen Cycler stattfinden und wird nur anschließend im ABI PRISM 7700 vermessen (10 sec), analysiert und - mit einem "plus/minus score" versehen- ausgewertet.

Im Gegensatz zu den DRB1*Subtypen 1501, 1502 und 1503, die in ausreichender Zahl zur Verfügung standen, war die Spezifität DRB1*1504 nur einmal vorhanden und die Subtypen 1505-1508 überhaupt nicht. So wurden die Mixe 15.7 und 15.8 "kreuz"-getestet, d.h. mit einer anderen DNA-Spezifität und einem anderen zweiten Primer. Der Sequenzabschnitt, in welchem Primer 1505 auf Allel DRB1*1505 hybridisiert, ist identisch mit dem auf Allel DRB1*1602. So wurde für eine Kreuztestung der reverse Primer 1505 in Mix 15.7 mit dem DR15/16 gruppenspezifischen forward Primer 02 kombiniert und für die Detektion eine DNA mit der Spezifität DRB1*1602 als Beweis für

seine Tauglichkeit verwendet. Tabellen 5.5-5.8 geben einen Überblick über die entwickelten Primer und die Kombination zu den DR15- und DR16-Mixen:

Tabelle 5.5 zeigt die Sequenzen, die Länge, die Schmelztemperaturen T_m und die Lage der 3'-Primer:

Primer (Antisense)	Nukleotid Sequence (5'-3')	Länge (Basen)	T_m (°C)	Lokalisierung
1501	CTGCACTGTGAAGCTCTCCA	20	62	Ex2 257-276
15021	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	20	62	Ex2 257-276
15	CCACCGCGGCCCGCGC	16	62	Ex2 211-226
1504	CGCGCCTGCTCCAGGAA	17	58	Ex2 199-215
1505	CCCGCGCCTGCTCCAGA <u>A</u> G	19	68	Ex2 199-217
1506	CCGCCCCAGCTCCG <u>A</u> CG	17	62	Ex2 149-165
1601	CGCGCCTGTCTTCCAGGAA	19	62	Ex2 199-217
1602	GCGCCTGTCTTCCAGGAG	18	60	Ex2 199-216
1604	CTGCAGTAGGTGTCCACCAG	20	64	Ex2 220-239
1605	CGCGCCTGTCTTCCAGTAT	19	62	Ex2 199-217
1607	CCGCGGCGCGCCTGTCT	17	62	Ex2 207-223
16x	CTGGTTATAGAAGTATCTGT <u>A</u> CG	23	64	Ex2 80-102
1608	GTCGCTGTCTGAAGCGCACGTT	21	68	Ex2 109-129

Tabelle 5.6 zeigt die Sequenzen, die Länge, die Schmelztemperaturen (T_m), und die Lage der 5'-Primer. Unterstrichene Basen kennzeichnen einen Unterschied der Primersequenz zu der tatsächlichen Sequenz der jeweiligen Allele:

Primer (Sense)	Nukleotid Sequenz (5'-3')	Länge (Basen)	T_m (°C)	Lokalisierung
02	TCCTGTGGCAGCCTAAGAG	19	60	Ex2 20-38
1503	GTGCGGTTCTGGACA <u>A</u> AC	19	60	Ex2 70-88
AE3	GTGCGGTTCTGGACA <u>A</u> AT	19	58	Ex2 70-88

Tab.: 5.7 Kombination der Primer zu den entsprechenden Mixen

Primer Mix	Sense Primer	Antisense Primer	Sonde	Produktlänge (bp)	Detektierte HLA Allele DRB1*
15.1	02	1501	1	257	15, außer 1502, 1508
15.2	02	15021	1	257	1502, 1508, alle 16
15.4	1503	15	1	157	1503
15.5	02	1504	1	196	1504
15.6	AE3	15	1	157	15, außer 1503
15.7	02	1505	1	198	1505
15.8	02	1506	1	146	1506
16.1	02	1601	1	198	1601,1608 (1603,1604,1605)
16.2	02	1602	1	197	1602 (1605)

16.3	02	1604	1	220	1604
16.4	02	1605	1	198	1605,1607
16.5	02	1607	1	204	16, 16011,021,05,07,08 außer 1603
16.6	02	16x	2	83	1607
16.7	02	1608	2	110	1608

Im nächsten Schritt wurden die Mixe für die DRB1*16 Detektion getestet: Dabei waren DRB1*1601 und DRB1*1602 ausreichend vorhanden, von DRB1*1605 stand nur eine Probe in geringer Menge zur Verfügung. Das Allel DRB1*1606 wurde nicht berücksichtigt, da es auch aus der offiziellen HLA-Nomenklatur (EFI, ASHI) herausgenommen wurde. Die charakteristische Basenmutation, die zur Definition dieses Subtyps führte, beruhte auf einem Sequenzierfehler. DRB1*1603 besitzt exakt das gleiche Motiv, das für DRB1*1606 als nicht korrekt erklärt wurde. Da die Autoren kein Original-DNA-Material mehr zur Verfügung hatten und da keine weiteren Proben mit dieser Spezifität weltweit gefunden wurden, ist die Existenz dieses Allels sehr zweifelhaft und wurde auch in diesem Panel nicht berücksichtigt. Die bisher für die Mixe 15.1-16.5 verwendete Sonde 1 liegt aber außerhalb des Amplifikationsbereichs der beiden Mixe, die die Spezifitäten DRB1*1607 und DRB1*1608 detektieren. So mußte eine weitere TaqMan-Sonde gesucht werden: Sonde 2. Desweiteren mußten Mix 16.3 und 16.6 "kreuzgetestet" werden. Da die charakteristische Mutation des Allels 1608, die im Mix 16.7 durch den Primer 1608 detektiert wird, einmalig im HLA-Genom ist und keine solche DNA zur Verfügung stand, wurde der Primer entsprechend den Bedingungen für die anderen Primer, insbesondere T_m , synthetisiert. Da dieser jedoch Kreuzreaktionen zeigte, mußte er sooft um jeweils ein Nukleotid verkürzt werden, bis diese ausblieben.

6.3 Entwicklung der DRB1*04 Typisierung mittels TaqMan

Dieses Panel umfaßt 15 Mixe (Abb. 5.9).

Da es nicht möglich ist, mit so wenigen Mixen auch alle homozygoten DR4 Subtypen (siehe "nested PCR") zu unterscheiden, wurde der Schwerpunkt darauf gelegt, die unter Kaukasiern häufiger zu findenden Subtypen heterozygot eindeutig unterscheiden zu können. Ein Problem ist außerdem die ständig wachsende Zahl von neuen Subtypen, die allerdings auch mit sonstigen, herkömmlichen Methoden selten direkt ausgetestet werden können. So wurden die mittlerweile neu gefundenen Subtypen in die Auswertungstabellen mit aufgenommen. Mit den momentan verwendeten 15 Mixen

ist es jedoch nicht möglich alle seltenen Varianten zu unterscheiden (DRB1*0428, DRB1*29, DRB1*30).

Die Tabellen 5.8-5.10 zeigen den verwendeten DRB1*04-gruppenspezifischen 5'-Primer, die verwendeten 3'-Primer und ihre Kombinationen zu den 15 Mixen.

Tab. 5.8: Verwendeter 5'-Primer

Primer (Sense)	Nucleotid Sequenz (5'-3')	Länge (Basen)	T _m (°C)	Lokalisation
04X	GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA	22	62	Ex2 17-39

Tab. 5.9: 3'-Primer

Primer (Antisense)	Nucleotid Sequenz (5'-3')	Länge (Basen)	T _m (°C)	Lokalisation
01	TCCACCGCGGCCGGCTT	17	60	Ex2 211-227
02	CGCGGCCCGCTCGTCT	16	58	Ex2 207-222
03	TGCAGTAGGTGTCCACCT	18	56	Ex2 221-238
04	CTGCAGTAGGTGTCCACCG	19	62	Ex2 221-239
05	GCTGTTCCAGTACTCGGCGCT	21	68	Ex2 169-189
06	GTCGCTGTCGAAGCGCAAGG	20	66	Ex2 110-129
07	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	20	62	Ex2 257-276
08	CTGCACTGTGAAGCTCTCCA	20	62	Ex2 257-276
09	GTGTCCACCGCGGCTCGCC	19	68	Ex2 212-230
10	GCTGTTCCAGTACTCGGCATC	21	66	Ex2 169-189
11	TCTGGCTGTTCCAGTACTCCT	21	64	Ex2 173-193
12	CTTCTGGCTGTTCCAGTACTG	21	64	Ex2 175-195
13	AGTAGGTGTCCACCAG	16	50	Ex2 220-235
14	GCCGCTGCACTGTGAAT	17	54	Ex2 264-280
15	GCCGCTGCACTGTGAAG	17	56	Ex2 264-280

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
								keine			DNA

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4.1	A	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	?
		1.21	1.15	1.21	1.14	0.44	0.47	0.46	1.01	1.03	1.16	0.45	0.29
4.2	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.41	0.33	0.40	0.32	0.42	0.24	0.38	0.39	0.42	0.37	0.39	0.32
4.3	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	?
		0.17	0.20	0.29	0.17	1.89	2.00	0.27	0.30	0.23	0.31	1.91	0.27
4.4	D	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	?
		2.32	2.20	2.36	2.19	0.28	0.27	2.37	2.75	2.54	2.62	0.29	0.17
4.5	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.24	0.33	0.29	0.33	0.29	0.30	0.35	0.34	0.31	0.28	0.30	0.29
4.6	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.36	0.22	0.23	0.33	0.35	0.44	0.15	0.24	0.34	0.62	0.36	0.28
4.7	G	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	?
		1.17	1.14	1.37	1.42	0.36	1.41	0.39	1.29	1.15	1.60	1.32	0.47
4.15	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
		1.26	1.73	1.86	1.90	1.86	1.86	1.67	2.03	1.88	2.08	1.68	0.51

Probe		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
													keine DNA
4.8	A	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	?
		0.54	0.51	0.49	0.49	1.44	0.50	1.34	1.40	1.27	0.42	0.43	0.40
4.9	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	?
		0.48	0.40	0.43	0.33	1.24	1.14	1.29	1.40	1.37	1.54	1.30	0.32
4.10	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
		3.42	3.07	3.12	2.98	3.12	2.46	2.80	3.19	3.06	3.44	2.19	0.56
4.11	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.31	0.30	0.29	0.26	0.28	0.26	0.29	0.32	0.19	0.32	0.26	0.23
4.12	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.31	0.36	0.31	0.40	0.33	0.32	0.31	0.37	0.36	0.39	0.27	0.27
4.13	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.33	0.20	0.30	0.25	0.23	0.28	0.14	0.27	0.25	0.34	0.31	0.28
4.14	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
		0.18	0.13	0.12	0.31	0.26	0.33	0.33	0.23	0.27	0.30	0.36	0.40
4.15	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
		1.87	1.90	1.84	1.94	1.87	1.79	1.72	2.01	1.80	2.12	1.78	0.58

Abb. 5.9: Die beiden FAM-layer der Mixe 4.1-4.15 der DRB1*04-Subtypisierung. In den Reihen 1-4 wird die Spezifität DRB1*0401, in Reihe 5 03, in Reihe 6 07 und in Reihe 7 04 getestet. Reihen 8 und 9 zeigen 2 Proben, die DRB1*0401 und 0404 positiv sind, Reihe 10 eine 0401, 0408 positive und Reihe 11 eine 0407 positive Probe.

Tab. 5.10: Kombination der verwendeten DRB4-spezifischen Primer und Zuordnung zu detektierten Allelen.

Primer Mix	Sense Primer	Antisense Primer	Sonde	Produktgröße (bp)	Detektierte HLA Allele DRB1*
4.1	1	04X	1	211	0401,09,13,16,21,26,(22)
4.2	2	04X	1	206	0402,14(12,18,25)
4.3	3	04X	2	221	0403,06,07,11,17,20,27, (1410)
4.4	4	04X	2	222	0401,02,04,05,08-10,13-16,19,21,23,24,26,29-30,32,(1122)
4.5	5	04X	2	173	0405,09-12,17,24,28-30
4.6	6	04X	2	113	0406,19-21
4.7	7	04X	1	260	0401,05,07-09,14,16,17,19-21,24,26,28-31,(1122)
4.8	8	04X	1	260	0402-04,06,10-13,15,18,22,23,25,27,32,(1410)
4.9	9	04X	1	214	0403-08,10-12,15,17-20,23-25,27-32,(1122,1410)
4.10	10	04X	2	173	0401-04,06-08,13,14,16,18-23,25-27,31,32
4.11	11	04X	2	177	0415,(1122)
4.12	12	04X	2	179	0416
4.13	13	04X	2	219	0412,18,25,31
4.14	14	04X	2	264	0423
4.15	15	04X	1	264	04,außer 23

Das Allel DRB1*0434 besitzt eine Mutation im Bereich des 5'-Primers, was ein schwaches Signal erwarten läßt. Diese Mutation ist im Genom einmalig und kann somit nicht direkt ausgetestet werden. Da es sich um eine Mutation im DR4-gruppenspezifischen Motiv handelt, ist es nicht ganz klar, ob es sich hier um eine erwünschte Selektion handelt oder nur um eine zufällige Rekombination. Falls das Allel häufiger gefunden werden sollte und es sich nicht um einen Sequenzierfehler handelt, wie bei DRB1*1603, könnte man entweder einen neuen Mix kreieren oder einen weiteren 5'-Primer zufügen.

Bei Personen, die DR4-homozygot sind, ist es mittels nested PCR möglich, beide Subtypen zu bestimmen. Unter einer nested PCR versteht man eine verschachtelte Amplifizierung. Zunächst wird mit sogenannten äußeren Primern amplifiziert. Dadurch wird eine Vorauswahl getroffen, um die Anzahl der Allele in etwa zu halbieren. So eignet sich beispielsweise die Mutation CG bzw AT in Codon 86 dafür. Eine zweite PCR mit einem Teil des Amplifikats aus der ersten PCR wird mit innerhalb des Amplikons liegenden Primern erneut durchgeführt. Der Vorteil der Methode besteht in der einschränkenden Voramplifizierung. Durch diese doppelt spezifische PCR wird die Auflösungsstärke verbessert. In dieser Studie wurde allerdings keine nested PCR im ABI PRISM 7700 durchgeführt bzw. etabliert.

Obwohl die Sonden 1 und 2 meist einen "Mismatch" für DRB1*04 Subtypen besitzen, sind sie in der Lage genügend stabil zu hybridisieren und sind ausreichend für eine Detektion der Amplifizierung.

Die Subtypen DRB1*0401- DRB1*0410 standen für die Austestung von Mixen zur Verfügung. Primer, die für weitere Spezifitäten spezifisch waren, mußten mit anderen DNA's und einem anderen zweiten Primer "Kreuz"-getestet werden.

Für den Mix 4.6, der die Subtypen DRB1*0406, 19, 20, 21 detektiert, lag die Sonde 1, wie bei den Mixen 16.6 und 16.7, die die beiden Allele DRB1*1607 und DRB1*1608 detektieren, außerhalb des Amplifikationsbereichs. Deshalb wurde für diesen Mix schon von vornherein die Sonde 2 verwendet. Bei der Austestung der Mixe 4.3, 4.4, 4.5 und 4.10-14 zeigten sich Schwierigkeiten: Die Sonde 1 schien mit den in den jeweiligen Mixen verwendeten Primern zu hybridisieren, da es zu relativ schwachen richtig-positiven und auch falsch-positiven Signalen kam. Mittels Sonde 2 konnten diese Mängel beseitigt werden.

6.4 DR-Low Resolution

Die Entwicklung des High Resolution Panels für DRB1*04 und DRB1*15/16 (serologisch 4 und 2), der beiden in der deutschen Bevölkerung am weitesten verbreiteten Allele, zeigte, daß die TaqMan-Methode eine mindestens genauso hohe Auflösung erreicht, wie die konventionelle SSP-PCR. Das nächste Ziel war die Entwicklung eines Low Resolution Panels mittels der TaqMan-Methode, wie sie durch die SSP für die Routine-Diagnostik benutzt wird. Damit sollte eine Erleichterung für die Notfall/Nachttypisierung erreicht werden. Die Erleichterung besteht darin, daß eine direkte Detektion im Reaktionsgefäß mit nachfolgender Auswertung am Rechner durchgeführt werden kann, wodurch die Gelddetektion im Anschluß an die SSP-PCR entfällt und sowohl Zeit als auch Arbeit gespart wird (Grundlagen: Methoden der HLA-Entwicklung). Für ein Low-Resolution-Kit ist es in erster Linie von Bedeutung, möglichst alle bekannten Allele mit sämtlichen Subtypen erfassen zu können.

Mix 1.1 detektiert alle DRB1*Subtypen außer DRB1*0103, welcher von Mix 1.2 erfaßt wird, Mix 15 alle DRB1*15 und Mix 16 DRB1*16 Allele. Im Falle von Mix 16 sind 4 Primer notwendig, um alle Subtypen zu erfassen. Mix 17 und 18 detektieren beide DRB1*03 Spezifitäten, aufgesplittet nach den serologischen Spezifitäten DR17 und DR18. Dagegen detektiert Mix 3 DRB1*03 außer dem Allel DRB1*0304 auch einige seltene DRB1*13 und DRB1*14 Allele (Tabelle 5.11). Die Mixe 04, 07, 08, 09, 10, 11 und 12 erfassen jeweils alle Subtypen des entsprechenden Allels. Deshalb bestehen manche Mixe aus bis zu 5 Primern (Tab. 5.10-12).

Tab. 5.10: Kombinationen der verwendeten Primer zu HLA-DRB spezifischen Primer-Mixen
(Zahlen in Klammern stehen für eine schwache Detektion)

Primer-Mix	Sense Primer	Antisense Primer	Sonde	Produktgröße (bp)	Amplifizierte HLA Allele DRB1*
1	14gAA	67gAg	1	201	0101,0102,0104-06
2	14gAA	367gAT	1	203	0103
3	13Agg	71CgC	1	221	15011-1509
4	13Agg	69TCT/69 TCT/74C Ag	1	222/205/202	16011-1608
5	37AGA	74CCg	1	173	03011-0310,(0311),0312,DRB3*0206
6	26gTA	86CCA	1	113	03011-012, 0304,0306, 0308, 0310-13, 0315, 1327
7	37AgA	86CAC	1	260	03021-022,0305,0309,0314,03161109, 1120,(1128),1302,1305,1326/29/31/34, 1402/03/09/13/1924/27/30,1608,DRB3* 0206
8	13ACA	86CCA/86 CAC	1	260	0401-0433,(0423weak),1122,1410
9	14ATA	353CCT	1	214	07011,03,04,(07012)
10	16gTT	57gCT/74 CAg	1	166/218	0801-0821(0820),1415
11	13TTT	78CAC	1	177	09012
12	31gCg	72gCA	2	179	1001
13	13gTC/16gTC /13gTC2/13A CA2	58CCT	1	171/180/182/1 86	1101-1137 (1131,33,35),0308,0415, 1204,1411
14	16gTT	72gCg	1	264	1201-1206
15	13gTC	67gAT2	1	185	1301,02,15,16,27,28,31,32,34,35,36, 391116,1120
16	13gTC	57gCT	1	175	13031,32,04,12,13,21,30,32,33,380312, 1413
17	37AgA	367gAA	1	137	1305,18,(26)1109,(1128),1427,1608
18	13gTC	67gAT2/67 gAT3/67g AT4	1	202/203/204	1301-1304,06,08,09,10,12,13,15-16,19, 27,28,31-39,1102,1114,1116,1118-21, 1131,1416,1424
19	13gTC/16gTT	58C(gA)g	1	171/180	0301-07,09,1112,14,0801-07,0809-14, 0816-21,13, außer 13072,1326,1402,03, 05,06,09,12-15,17-21,23,24,27,29,30, 33,(1201-1206)
20	13gTC/16gTT	74CCT/57 CAg	1	166/175/219/2 28	1401,4-8,10-11,14,16,18,22,25-26,28, 31,32(33),35,36,0310,0808,1117
21	37AgA	71gCC/74c ag	1	148/160	1305,06,18,1402,03,06,09,12,13,17,27, 29,301109,(1128)
22	13gTA	57gCg	1	155	DRB5* 010011-01010N,0202-1204
23	13gTC3/13gT C4	57CgA/57 CAT	1	175/176	DRB3* 01011-0107(0102,04,013),0201- 0211,0208 nicht,(0207,12) 01-0303

24	18TCC	86CCA	2	246	DRB4*01011-0105,0201N,0301N
----	-------	-------	---	-----	------------------------------------

Erst in zweiter Linie wird die Unterscheidung in Subtypen berücksichtigt, nämlich für die Allele DRB1*03 (siehe oben), 13 und 14 (Serologie DR5), deren hohe Übereinstimmung in den Sequenzen Kreuzreaktionen begünstigt und deren große Zahl an Subtypen die Zuordnung erschwert. DRB1*03 wird mit 3, DRB1*13 mit 5 und DRB1*14 mit 2 Mixen berücksichtigt. Aus diesem Grunde müßte man ein solches Panel streng genommen als "Intermediate Resolution Panel" bezeichnen.

Von den insgesamt 24 Mixen detektieren 21 DRB1*Allele, die restlichen 3 decken die Loci DRB3*, DRB4*, DRB*5 (serologische Spezifitäten DR51, 52, 53) ab, da diese stets mit bestimmten DRB1-Allelen assoziiert sind (Kap. 3). Durch diese Mixe wird also eine zusätzliche Absicherung der Typisierung erreicht.

Für die spezifische Detektion konnte in 22 Mixen die Sonde 1 verwendet werden, obwohl diese Sonde mit einigen Allelen Mismatches besitzt. Allerdings konnte Sonde1 für die Mixe, die die Spezifität DRB1*1001 und DRB5*0101-0202 detektieren und zu diesen Allelen 3 Basenfehlpaarungen besitzt, nicht verwendet werden, da die Signale entweder unspezifisch oder zu schwach wurden. Deshalb wurde eine neue Sonde entwickelt, Sonde 3, die aber in 20 % geringerer Konzentration als Sonde 1 eingesetzt werden mußte, da sie sowohl einen höheren Background zu Beginn der PCR besitzt, als auch nach der PCR stärkere Signale liefert.

Um eine hohe Spezifität auch im TaqMan-Panel zu garantieren, mußten zahlreiche Primer, die aus dem konventionellen PCR-SSP-Primersatz stammten, verkürzt werden oder als ARMS-Primer umgebaut werden (Mix für DR17). Weiterhin mußten neue Primerpositionen gesucht und die neuen Primer ausgetestet werden, da die bisher benutzten Sonden außerhalb des Amplifikationsbereiches lagen (Mix für DRB1*12). Bei der Berücksichtigung neuer Subtypen (DRB1*0704) wurde angestrebt, neue "gruppenspezifische" Primer zu wählen, anstatt Mixe durch die Neusynthese zusätzlicher Primer, die gar nur ein Allel zu detektieren vermögen, zu ergänzen, um insgesamt möglichst wenige Primer in einem Mix zu verwenden (Mix für DRB1*09 und DRB1*07). Diese Primerkombinationen haben mittlerweile auch im konventionellen PCR-SSP-Kit Verwendung gefunden, was auch dort die Zuverlässigkeit und Übersichtlichkeit erhöht. In dem Mix für DRB1*10 wurde durch das Einführen eines 5'-Primers mit einer einmaligen Mutation die Detektionssicherheit ebenfalls erhöht. Zumindest durch "Kreuz"-Testungen ließen sich alle Primer austesten, da nicht alle Spezifitäten vorhanden waren (Abb 5.12). Die Tabellen 5.12 und 5.13 zeigen die eingesetzten 5'-Primer und 3'-Primer, die verwendeten Sonden sind in Tabelle 5.4 dargestellt.

Tab. 5.12-5.13: 5'- und 3'-Primer des Low-Resolution-Panel

Primer (Sense)	Nucleotid Sequenz (5'-3')	Länge (Basen)	T _m (°C)	Lokalisation
14gAA	GTTTCTTGTGGCAGCTTAAGTTTGAA	26	72	Ex2 17-42
13Agg	TCCTGTGGCAGCCTAAGAGG	20	64	Ex2 20-39
37AgA	GACAGATACTTCCATAACCAGGAGGAGA	28	82	Ex2 82-109
26GTA	CGGAGCGGGTGC GGTA	16	56	Ex2 62-77
13ACA	GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACACA	24	68	Ex2 15-38
13ACA2	ACGTTTCTTGGAGCAGGTTAAA	22	62	Ex2 17-38
14ATA	CACGTTTCCTGTGGCAGGGTAAGTATA	27	80	Ex2 14-40
16gTT	GGAGTACTCTACGGGTGAGTGTT	23	70	Ex2 24-46
16gTT2	GAGTACTCTACGGGTGAGTGTT	22	66	Ex2 25-46
13TTT	CCACGTTTCTTGAAGCAGGATAAGTTT	27	76	Ex2 13-39
31gCg	CGGTTGCTGGAAAGACGCG	19	62	Ex2 73-92
13GTC	ACGTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	24	70	Ex2 15-38
13gTC2	CCACGTTTCTTGGAGCTGCTTAAGTC	26	78	Ex2 13-38
16gTC	GGAGTACTCTACGGGTGAGTGTC	23	72	Ex2 24-46
13gTA	CA(CT)GTTTCTTGCAGCAGGATAAGTA	25	70/72	Ex2 14-38
13gTC3	CACGTTTCTTGGAGCTG(CT)GTAAGTC	25	74/76	Ex2 14-38
13gTC4	CACGTTTCTTGGAGCTGCTTAAGTC	25	74	Ex2 14-38
18TCC	AGGCTAAGTGTGAGTGTCATTTC	24	78	Ex2 29-52

Primer (Antisense)	Nucleotid Sequenz (5'-3')	Länge (Basen)	T _m (°C)	Lokalisation
67gAg	CCCGCCTCTGCTCCAGGAG	19	66	Ex2 199-217
67gAT	GGCCCGCTCGTCTTCCAGGAT	21	70	Ex2 199-219
71CgC	CCACCGGCGGCCCGCGC	16	62	Ex2 211-226
69TCT	CACCGCGGC(GC)CGCCTGTCT	19	68	Ex2 207-225
69TCT2	CACCGCGGCGGCCCTGTCT	19	68	Ex2 207-225
74CAg	GTCTGCAGTAGGTGTCCACCAG	22	70	Ex2 220-241
74CCg	TCTGCAGTAGTTGTCCACCCG	21	66	Ex2 220-240
86CCA	CTGCACTGTGAAGCTCTCCA	20	62	Ex2 257-276
86CAC	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	20	62	Ex2 257-276
53CCT	TCGGCGACAGGCCGCCCT	18	64	Ex2 159-176
57gCT	GCTGTTCCAGTACTCGGCGCT	21	68	Ex2 169-189
78CAC	AACCCCGTAGTTGTGTCTGCACAC	24	74	Ex2 232-255
72gCA	AGGTGTCCACCGCGGCA	17	58	Ex2 212-232
58CCT	TTCTGGCTGTTCCAGTACTCCT	22	66	Ex2 173-194
72GCG	AGGTGTCCACCGCGGCG	17	60	Ex2 216-232
67gAA	GCCCGCCTGTCTTCCAGGAA	20	66	Ex2 199-218
67gAT2	GGCCCGCT(CT)GTCTTCCAGGAT	21	68/70	Ex2 199-219
67gAT3	GGCCCGCCTGTCTTCCAGGAT	20	70	Ex2 199-218
67gAT4	CCCGCGCCTGCTCCAGGAT	19	66	Ex2 199-217
58C(gA)g	TTCTGGCTGTTCCAGTACTC(GA)G	22	66/68	Ex2 173-194
74CCT	TGTCTGCAATAGGTGTCTACCT	22	64	Ex2 221-242

57CAg	GCTGTTCCAGTGCTCCGCAG	20	66	Ex2 170-189
71gCC	TGTCCACCGCGGCCCGCC	18	66	Ex2 212-229
57gCg	CTGGCTGGTCCAGTACTCAGCG	22	72	Ex2 171-192
57CgA	CTGTTCCAGGACTCGGCGA	19	62	Ex2 170-188
57CAT	GCTGTTCCAGTACTCGGCAT	20	62	Ex2 170-189

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	- 0.63	- 0.56	- 0.57	- 0.55	- 0.56	- 0.56	- 0.61	- 0.55	- 0.55	+1.34	- 0.61	+2.17
B	- 0.57	- 0.56	- 0.77	- 0.51	- 0.51	- 0.50	+2.20	- 0.50	- 0.50	- 0.58	- 0.59	- 0.56
C	- 0.49	- 0.46	- 0.51	- 0.46	- 0.54	- 0.67	- 0.67	- 0.49	- 0.51	- 0.58	- 0.53	+2.26
D	- 0.50	- 0.43	+3.63	- 0.49	- 0.50	+2.82	+2.21	- 0.54	- 0.54	- 0.69	+3.86	- 0.55
E	- 0.41	- 0.51	+2.86	- 0.51	- 0.51	- 0.50	- 0.50	- 0.61	+2.75	- 0.54	- 0.52	- 0.34
F	- 0.46	- 0.49	- 0.63	- 0.50	- 0.47	- 0.49	- 0.52	- 0.50	- 0.53	+2.44	- 0.61	+3.43
G	+2.51	+2.52	+2.49	+2.61	+2.57	+2.68	+2.66	+2.56	+2.60	+2.64	+2.83	+2.86
H	+2.66	+2.53	+2.55	+2.65	- 0.73	- 0.79	- 0.75	- 0.78	- 0.73	- 0.75	- 0.82	- 0.82

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+0.93	+0.83	+0.84	+0.74	+0.79	+0.82	+0.86	+0.78	+0.80	+0.76	+0.85	+0.76
B	+0.75	+0.78	+0.82	+0.73	+0.72	+0.70	+0.62	+0.68	+0.68	+0.72	+0.73	+0.72
C	+0.70	+0.68	+0.73	+0.73	+0.71	+0.72	+0.73	+0.71	+0.74	+0.74	+0.73	+0.68
D	+0.69	+0.70	+0.43	+0.71	+0.75	+0.51	+0.58	+0.67	+0.70	+0.71	+0.46	+0.77
E	+0.60	+0.68	+0.52	+0.67	+0.68	+0.68	+0.69	+0.69	+0.53	+0.71	+0.72	+0.75
F	+0.64	+0.76	+0.71	+0.72	+0.70	+0.72	+0.72	+0.71	+0.72	+0.65	+0.75	+0.62
G	- 0.15	- 0.05	- 0.16	- 0.17	- 0.14	- 0.20	- 0.16	- 0.16	- 0.17	- 0.19	- 0.18	- 0.20
H	- 0.17	- 0.16	- 0.18	- 0.18	- 0.13	- 0.22	- 0.16	- 0.20	- 0.13	- 0.20	- 0.22	- 0.15

Abb. 5.10: Typisierung von 3 DNA-Proben nach dem Pipettierschema in Abb. 5.11: Im oberen Teil der Abbildung ist das spezifische FAM-layer dargestellt: In den Reihen A-B wurde eine DNA mit der Spezifität 08 und 10 typisiert, in den Reihen C-D 10 und 1301 und in E-F 15 und 07. Im unteren Teil ist das VIC-layer zu sehen. Die Positionen G1-H4 stellen negative Amplifikationskontrollen

(IPC-) des Kontrollsystems dar, die Reaktionen in den Positionen G5-G12 sind Kontaminationskontrollen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y
n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
n	n	n	n	22	22	22	22	22	22	22	22
n	n	n	n	y	y	y	y	y	y	y	y








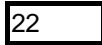
				
DNA Probe 1	DNA Probe 2	DNA Probe 3	Kontroll DNA	Keine DNA
				
Primer für interne Kontrolle enthalten	Keine Primer für interne Kontrolle enthalten	Benennung des Primer- Mixes		

Abb. 5.11: Typisches Pippettierschema: Es können pro PCR-Platte 3 DNA´s typisiert werden. Die restlichen beiden Reihen werden als Kontaminations- (No Template) und Amplifikations- (IPC-) Kontrollen benutzt.

7 Ergebnisse

Im vorangehenden Kapitel wurde die Entwicklung der DRB1*-TaqMan-Typisierungen ausführlich beschrieben. Mit Hilfe der angegebenen Oligonukleotide und den Kombinationen zu den entsprechenden Mixen wurden Auswertungstabellen erstellt, die die Typisierungen erleichtern.

Bei der Entwicklung der Subtypisierungen kam es meist nur zu Kreuzreaktionen unter den einzelnen Subtypen, die durch den Einbau zusätzlicher Mismatches ausgeglichen werden konnten. Auf Allelebene (Low-Resolution-Kit) gab es zahlreiche Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Allelen, da beispielsweise DRB1*03 und *13 ähnliche Gruppenmotive besitzen (siehe auch Verwandtschaft in der Serologie, CREG, Kap. Grundlagen). Ferner gibt es eine Vielzahl von seltenen Subtypen, die sich auch in den allelspezifischen bzw. für die Detektion genutzten Motiven von den restlichen Subtypen unterscheiden und deshalb schwer in die bewährten Systeme einzuordnen sind. Im Gegensatz zu den recht übersichtlichen High Resolution Assays, werden einige Reaktionen beim Low Resolution Assay von Subtypen eines anderen Allels durch das gleiche charakteristische Motiv verursacht. So erreichte man durch das Einführen von ARMS-Primern in einem solchen Falle sowohl eine Schwächung der

Tab. 6.1: 21 Primermixe detektieren die Allele des DRB1* Locus, 3 weitere Mixe DRB5*, DRB*3 und DRB*4. Der Übersichtlichkeit halber sind hier nicht alle Allele aufgeführt, siehe dafür Tabelle 5.6.

Mix		DRB1*																			
Nr.	Na-me	01, ex 01 03	010 3	15	16	0301	0302	0304	04	07	08	09	10	11	12	1301	1302	1303, 1304	1305	1401, 1404	1402, 1403
1	1.1	+																			
2	1.2		+																		
3	15			+																	
4	16				+																
5	03					+	+														
6	17					+		+													
7	18						+									+			+		+
8	04								+												
9	07									+											
10	08										+										
11	09											+									
12	10												+								
13	11													+							
14	12														+						
15	13.1															+	+				
16	13.2																	+			
17	13.3																		+		
18	13.4													(+)		+	+	+			
19	13.5					+	+	+			+				(+)	+	+	+	+		+
20	14.1																			+	
21	14.2																		+		+

22	51	(+)		+	+															
23	52					+	+	+					+	+	+	+	+	+	+	+
24	53								+	+		+								

richtig- als auch der falsch-positiven Signale und dadurch keinen Vorteil. Oft war kein anderes charakteristisches Motiv für die Primerpositionierung vorhanden, so daß man die Detektion dieser einem anderen Allel zugehörigen Subtypen in Kauf nahm.

Bei der konventionellen SSP-PCR-Methode wird ermittelt, ob der jeweilige PCR-Mix positiv ist. Er ist es dann, wenn auf dem Agarose-Gel eine spezifische Bande mit der richtigen Basengröße zu erkennen ist. Das entstehende Muster aus Banden wird mit der entsprechenden Tabelle verglichen, um die Typisierung einer DNA durchführen zu können.

Bei der TaqMan-Methode berechnet eine Auswertungssoftware anhand der vorgegebenen Negativkontrollen, ob die Reaktion als positiv, oder durch eine positive Amplifikationskontrolle verlässlich als negativ gilt. Das Ergebnis läßt sich als Tabelle (Experiment Report) oder als Abbildung der PCR-Platte darstellen. Bei beiden Möglichkeiten wird das Resultat zusätzlich mit einem "+", einem "-" oder mit einem "?" versehen. Das Fragezeichen wird dann angezeigt, wenn die spezifische Reaktion und die Positivkontrolle negativ bleiben, das heißt auch bei den NTC, bei denen Wasser statt DNA pipettiert wurde.

Tab. 6.2 zeigt mögliche Kombinationen der spezifischen Reaktion und der Amplifikationskontrolle, sowie deren Bedeutung für die Interpretation der PCR.

Spezifische Reaktion	Amplifikationskontrolle	Resultat
+	+	+, richtig positive Reaktion
+	-	+, negative Amplifikationskontrolle wird ignoriert
-	+	-, richtig negative Reaktion
-	-	?, ist bei NTC's richtig, da keine DNA vorhanden ist, ansonsten muß der Versuch wiederholt werden, da die negative Amplifikationskontrolle für einen Ausfall der PCR-Komponenten steht

Es wurden 100 Proben pro Assay mittels der TaqMan-Assays untersucht und deren Ergebnisse mit denen von konventionellen Methoden verglichen. Bei den Subtypisierungen gab es zunächst in 6 Fällen Diskrepanzen mit den Ergebnissen der SSP-PCR. Nach Retypisierungen mit den konventionellen SSP-PCR-Kits zeigte sich jedoch volle Übereinstimmung. Das bedeutet, daß diese 6 Proben mit konventionellen Methoden zunächst nicht korrekt typisiert worden waren.

Bei dem Low-Resolution-Assay kam es in 50 Fällen zu einer exakten Übereinstimmung mit den serologischen Ergebnissen und in 40 weiteren Fällen wurde eine höhere Auflösung als in der Serologie erreicht, sodaß insgesamt in 90 Fällen kein Widerspruch zur Serologie zu beobachten war. Bei 8 zur

Serologie unterschiedlichen Typisierungsergebnissen konnte das Ergebnis der TaqMan-PCR mit den Ergebnissen der SSP-PCR und der RFLP bestätigt werden. Bei 2 Proben (Appendix) war das Ergebnis mit der TaqMan-Typisierung nicht sofort ersichtlich, bzw. im Widerspruch sowohl zum RFLP- als auch zum serologischen Ergebnis. Es wurden nämlich mehr Signale detektiert als bei einem normalen, nicht chimären Individuum zu erwarten sind. Bei einer Retypisierung mit SSP-PCR waren zu den bisher mit SSP-PCR erhaltenen Signalen zusätzliche, sehr schwache Banden im Agarosegel zu erkennen. Dies lag vermutlich an Verunreinigungen durch Amplifikate oder durch genomische DNA eines anderen Individuums, die in das Probenaufbewahrungsgefäß gelangt ist. Diese auf dem Agarosegel, je nach Qualität der Dokumentation, nicht oder nur schwach erscheinenden Banden, können die automatische Auswertung des TaqMan-Systems stören. Es empfiehlt sich daher in solchen Fällen nur die stärksten Fluoreszenzwerte für die Auswertung zu berücksichtigen.

Die letzten 3 Mixe bieten noch eine zusätzliche Information. Erhält man auch nicht mit Hilfe der Assoziationen zu den Loci DRB3, 4, 5 "realistische" Ergebnisse, sollte die Testung wiederholt bzw. mit anderen Methoden, wie Serologie, RFLP, SSP-PCR oder gar einer Sequenzierung verglichen werden. Obwohl die Auswertungssoftware nur bedingt über die Einstellungen des Konfidenzintervalls zu beeinflussen und kein "Cut-off" einzustellen ist, ist es dennoch möglich, selbst ein Auswertungsschema zu konzipieren. Hierfür kann man ein Excel-Sheet definieren. Die Rohdaten können problemlos exportiert und in Excel importiert werden.

Es kann ein Makro verwendet werden, mit Hilfe dessen Fluoreszenzwerte mit einem Wert größer als 1 als positiv und solche mit einem Wert kleiner als 1 als negativ interpretiert werden. Der Grenzwert von 1 hat sich in den bisherigen Versuchen bewährt, sollte er sich jedoch bei nachfolgenden Experimenten als ungünstig erweisen, kann er leicht durch eine Umeditierung des Makros verändert werden.

Nach Entwicklung des Assays wurden zur Austestung der 100 DNA-Proben die Mixe, mit Ausnahme der Enzyme Taq und UNG und ohne DNA, mittels einer Pipettierhilfe (Hydra, Robbins Scientific) in Platten pipettiert, mit einer Plastikfolie verschlossen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Für größere Mengen als 10 Platten ist die „Hydra“ wegen ihrer 96 Pipettierkapillaren und größerer Aufnahmemenge wesentlich besser geeignet. Am Tag danach wurden die Platten unter Vakuum in Plastikbeutel eingeschweißt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Platten konnten auf diese Weise auch nach 3 Monaten noch verwendet werden, während Versuche, bei denen Primer und Sonden in den PCR-Platten getrocknet und dann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden nicht befriedigend ausfielen. Dabei traten bei den spezifischen Reaktionen Mängel auf und die generischen Reaktionen fielen fast vollständig aus.

Die beiden Subtypisierungsassays für DR15/16 und DR4 sind wesentlich übersichtlicher als der Low Resolution Assay. Kreuzreaktionen tauchen in erster Linie unter manchen Subtypen auf, ganz selten

aber bei anderen Allelen (siehe Tabellen). Diese Kreuzreaktionen ließen sich durch das Design entsprechender ARMS-Primer sehr gut in den Griff bekommen.

Tab. 6.3 : Reaktionen der 15/16 Spezifitäten. Vollständige Spezifitäten sind in Tab. 5.2, Kap. Entwicklung dargestellt, hier der besseren Übersicht wegen weggelassen worden.

DRB1- Allele	DRB1* 15/16-Mixe													
	15.1	15.2	15.4	15.5	15.6	15.7	15.8	16.1	16.2	16.3	16.4	16.5	16.6	16.7
15011	+				+									
15012	+				+									
15021		+			+									
15022		+			+									
15023		+			+									
1503	+		+											
1504	+			+	+									
1505	+				+	+								
1506	+				+		+							
1507	+				+									
1508		+			+									
1509	+				+									
16011		+						+				+		
16012		+						+				(+)		
16021		+							+			+		
16022		+							+			(+)		
1603		+						(+)						
1604		+						(+)		+				
1605		+						(+)	(+)		+	+		
1606		+												
1607		+							(+)		+	+	+	
1608		+						+				+		+
1309					+									
1424					(+)									

Bei den Subtypisierungen DR1*15/16 und DRB1*04 handelt es sich um 14 bzw. 15 verschiedene Primerkombinationen, bei der Low-Resolution-Typisierung sogar um 24 Mixe, die auf der gleichen Platte laufen und mit vergleichbarer Stärke detektieren sollen. Teilweise enthalten sie bis zu 5 spezifische und 2 generische Primer und die beiden Sonden, zusammen bis zu 9 Oligonukleotide, die untereinander nicht hybridisieren dürfen. Tabellen 6.1-6.4 zeigen welche Mixe die entsprechenden Subtypen detektieren. Die Selektivität wurde bei diesem Assay weniger über die eingesetzte DNA-Menge als vielmehr durch das Primer-Design erreicht. Es wurden 60 DRB1*15-positive, 40 DRB1*16-positive und 100 DRB1*04-positive DNA's getestet. Das System wurde für eine DNA-Menge von 30 ng optimiert, funktioniert aber in einem Bereich von 10-50 ng. Liegt die eingesetzte DNA-Menge darunter oder darüber, kann es bei der Endpunktbestimmung zu Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zwischen positiv und negativ kommen. Es ist also von Bedeutung, die optimale Menge

an Template einzusetzen. Außerdem ist die Qualität der eingesetzten DNA wichtig, da sowohl Salze als auch Proteine die Effizienz der PCR stören können (Kap. 4 Material und Methoden).

Zudem darf die DNA sowohl für SSP-PCR als auch für TaqMan Assay nicht zu stark degradiert sein. Degradierete DNA läßt sich bei der Gelelektrophorese durch ein Überlagern vieler Fragmente als sog. "smearing" detektieren.

Tab. 6.4: Reaktionen der DRB1*04 Spezifitäten. Vollständige Spezifitäten sind in Tab 5.6, Kap. Entwicklung dargestellt, hier aber der Übersichtlichkeit halber weggelassen worden.

DRB1- Allele	DRB1* 04-Mixe														
	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9	4.10	4.11	4.12	4.13	4.14	4.15
0401	+			+			+			+					+
02		+		+				+		+					+
03			+					+	+	+					+
04				+				+	+	+					+
05				+	+		+		+						+
06			+			+		+	+	+					+
07			+				+		+	+					+
08				+			+		+	+					+
09	+			+	+		+	+							+
10				+	+			+	+						+
11			+		+			+	+						+
12					+			+	(+)				+		+
13	+			+				+		+					+
14		+		+			+			+					+
15				+				+	+		+				+
16	+			+			+			(+)		+			+
17			+		+		+		+						+
18								+	+	+			+		+
19				+		+	+		+	+					+
20			+			+	+		+	+					+
21	+			+		+	+			+					+
22	(+)							+		+					+
23				+				+	+	+				+	
24				+	+		+		+	+					+
25		+						+		+			+		+
26	+						+			(+)					+
27			+					+		+					+
28					+		+								+
29					+		+								+
30					+		+								+
31							+			+			+		+
32								+		+					+
33	+						+			+					+
34	(+)						(+)			(+)					(+)
1122				*			*		*		*				+
1410			*					*	*						+

Um die Auslastung des ABI PRISM 7700 zu erhöhen, ist es prinzipiell möglich die einzelnen PCR-Läufe in anderen Thermocyclern durchzuführen und nach der Amplifizierung die PCR-Platten darin zu vermessen. Dieser Schritt dauert etwa 10 sec, danach können die Meßergebnisse analysiert werden. Dies wurde mit Thermocyclern des Typs PE 9600, welcher im ABI PRISM 7700 integriert ist, und in PTC's 100 von MJ Research ausgetestet. Zunächst wurde das gleiche PCR-Programm benutzt. Der PE 9600 erreichte gute Ergebnisse, während Austestungen mit dem PTC deutlich schlechter verliefen. So waren einige spezifische Reaktionen schwächer und auch ein Großteil der generischen Signale eher schwach und im "Plate Read" Modus als negativ eingestuft worden, was die automatische Interpretation erheblich störte oder gar unmöglich machte.

Die für die Subtypisierungen nötigen 8 Mixe konnten im Gegensatz zu den 24 Mixen des Low Resolution Panels mit dem Biomek 2000 von Beckman abgefüllt werden. Für dieses Gerät läßt sich für die individuell benötigte Anwendung das passende Programm sehr leicht schreiben. Bis zu 10 Platten sind automatisch und sehr zuverlässig abzufüllen. Werden die Platten nur einige Tage bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, können sogar die beiden Enzyme UNG und AmpliTaq Gold mit abgefüllt werden, ohne eine Einschränkung bei der Austestung befürchten zu müssen.

Außerdem wurden verschiedene Taq-Polymerasen getestet: Bei dem so sensitiven TaqMan-System macht es nur Sinn Hot-Start-Polymerasen zu verwenden, die in nativer Form inaktiv sind und erst durch eine 5-10-minütige Inkubationszeit bei $90-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ aktiviert werden (Tab 6.5). Konventionelle TaqPolymerasen, die nativ schon Aktivität besitzen, können eine falsche Voramplifizierung verursachen und die Auswertung durch zusätzliche Signale stören. Es zeigte sich, daß die Platinum Taq von der Firma Life Technologies mindestens so starke richtig-positive Signale liefert wie die AmpliTaq Gold von PE, aber weniger falsch-positive Signale verursacht, während die Taq Gold von AGS bei fast jeder Reaktion einer PCR-Platte schwache Signale generiert und damit für diesen Assay unbrauchbar ist.

8 Diskussion

Die Daten der CTS-Studie (Einleitung) zeigen, daß Unterschiede beim HLA-Matching einen großen Einfluß auf die Transplantatakzeptanz ausüben. Darüber hinaus steigt das Transplantatüberleben von Nieren bei molekularer Typisierung gegenüber dem bei serologischer Typisierung. Transplantationspaare, bei denen serologisch keine Inkompatibilität festgestellt wurde und für die sich die volle Kompatibilität auf DNA-Ebene bestätigte, wiesen ein besseres Transplantatüberleben auf, als Paare, bei denen sich die Kompatibilität auf DNA-Ebene nicht bestätigen ließ (Mytilineos, 1994). Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß eine Subtypisierung zu Verbesserungen im Transplantatüberleben bei sensitisierten Nierenempfängern führt (DGI-Aktuell, 2/2000).

Die Kompatibilität auf dem HLA-DRB1*-Genort besitzt in der Transplantation große Relevanz. Im Hinblick auf die allogene Nierentransplantation (Opelz et al., 1991) ist das DR-Matching einer der wichtigsten Faktoren für ein langes Transplantatüberleben.

Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit eine auf molekularbiologischer Technik basierende Methode ausgewählt (TaqMan-Prinzip), mit der Gene des HLA-DRB1* -Locus untersucht wurden. Zunächst wurde getestet, inwieweit die TaqMan-Methode, die neben einem geringeren Zeitbedarf auch einfacher zu interpretierende Ergebnisse liefert, in der Lage ist, mit den vorhandenen, konventionellen SSP-PCR-Systemen zu konkurrieren. So wurden zuerst High-Resolution-Assays entwickelt, um zu sehen, ob die Methode bis auf den Subtypisierungslevel zuverlässig arbeitet (Tremmel et al., 1999). Erst dann wurde der Low Resolution Assay etabliert, der genauer als die Serologie arbeitet und dem Auflösungsgrad des momentan für die Routine verwendeten SSP-PCR-Kits entspricht. Es wurden zur Evaluierung der 3 Typisierungsverfahren insgesamt 300 DNA-Proben getestet. Im Laufe der Austestungen zeigte sich, daß die Subtypisierungskits für HLA-DRB1*04 und HLA-DRB1*15/16 mittels des TaqMan-Verfahrens in der Lage waren, genauso zuverlässig und präzise die entsprechenden Subtypen zu detektieren, wie konventionelle SSP-PCR-Kits. Nach anfänglicher Diskrepanz bei 6 Proben konnte nach einer Wiederholung mit der herkömmlichen SSP-PCR in allen Fällen völlige Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Assays gezeigt werden. Das DRB1*-Low-Resolution-Verfahren ergab nur in der Hälfte der 100 getesteten Proben völlige Übereinstimmung zu serologischen Befunden. In 40 Fällen war das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren höher auflösend als die Serologie. In 8 Fällen war eine deutliche Diskrepanz zu den Serologieergebnissen zu beobachten. Diskrepanzen zwischen serologisch und molekularbiologisch bestimmten Ergebnissen wurden schon früher beschrieben (Mytilineos, 1994). Bis auf 2 Proben waren die Ergebnisse zwischen TaqMan- und SSP-PCR/RFLP-Verfahren konkordant. Bei diesen beiden DNA-Proben wurden bei der TaqMan-

Untersuchung mehr Signale detektiert als für die Bestimmung von 2 HLA-DRB1*-Merkmalen nötig war. Bei einer Wiederholung dieser beiden Typisierungen mittels konventioneller SSP-PCR waren allerdings im Agarosegel ebenfalls, wenn auch nur sehr schwach, zusätzliche Banden zu erkennen, die womöglich von einer Verunreinigung der DNA-Proben verursacht wurden (siehe Ergebnisteil). In diesen beiden Fällen war die Zuordnung zu den beiden HLA-DRB1-Typen mittels des TaqMan-Verfahrens schwieriger, weil der Nachweis der durch Verunreinigung entstandenen PCR-Amplifikate stärker als in der SSP-PCR wiedergegeben wurde.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Focus auf die Etablierung des DRB1-Locus (High und Low Resolution) gelegt, während die Gruppe um Blasczyk zunächst eine andere Strategie verfolgte: die Entwicklung von Low-Resolution-Assays für die Loci A, B, C und DRB1.

Die Arbeiten von Blasczyk durchliefen parallel eine ähnliche Entwicklung: So waren die ersten Assays (Luedeck et al., 1997, Slateva et al., 1998, Albis-Camps et al.; 1999), wie die Subtypisierungen der vorliegenden Arbeit, mit einem TET-markierten System als Amplifikationskontrolle ausgestattet. Ebenso wurde in den weiteren Arbeiten mit einem VIC-gelabelten Kontrollsystem gearbeitet. Da die Emissionsmaxima von FAM und VIC weiter voneinander entfernt sind als die von FAM und TET, würde man dadurch eine bessere Auftrennung und sicherere Zuordnung der jeweiligen Emissionssignale erwarten. Experimentell ist der Unterschied jedoch gering und man bleibt weiterhin auf spezielle Funktionen der Interpretationssoftware (spectral compensation for real time/endpoint) angewiesen. Bei der vorliegenden Arbeit gelang es jedoch die jeweiligen Parameter soweit einzustellen, daß es nicht nötig war ein spezielles Auswerteschema zu entwickeln. Es konnte direkt mit der mitgelieferten Betriebssoftware der Experiment Report (Tabellenform) erstellt werden, bzw. die PCR-Platte auch bildlich mit einer plus/minus-Kennzeichnung eingesehen werden. Eine Auswertung mittels Excel ist selbstverständlich auch möglich. Blasczyk und Mitarbeiter verwendeten allerdings das Gerät ABI PRISM 7200, das im Gegensatz zum Modell 7700 nicht mit einem Laser sondern nur mit einer UV-Lampe ausgestattet ist. Dies reduziert zwar den Anschaffungspreis, es ist aber keine Real-Time-Bestimmung möglich. Die Real-Time-Option war für die Entwicklung der hier vorgestellten Assays sehr hilfreich.

Der Gruppe um Blasczyk war es möglich die Low-Resolution-Detektion mit nur einer Sonde durchzuführen, was den Assay grundsätzlich vereinfacht. Die einzige Region auf dem DRB1-Locus, die aufgrund eines geringen Polymorphismus dafür in Frage kommt, ist allerdings sehr A/T-reich. Da die beiden Basen Adenin und Thymin relativ schwache Wechselwirkungen ausbilden, besteht die Gefahr, daß die Sonde durch die wenigen G's und C's gerade am 5'- und 3'-Ende nur unzureichend hybridisiert. Ist dies der Fall, wird die Sonde nur in unzureichendem Maße geschnitten und die zu messende Fluoreszenz-Intensität liegt nur wenig über dem Hintergrundsignal. Außerdem

muß die Sonde aus mehr als 30 Nukleotiden bestehen, um überhaupt die nötige T_m zu erreichen und nicht beim ersten Annealing wieder abgelöst zu werden. Bei solch langen Sonden ist die Gefahr von Selbst-Komplementarität oder unspezifischer Hybridisierung mit Primern oder anderen DNA-Bereichen relativ groß (siehe Kap. 5.1.3, Sondendesign). Aus diesen Gründen und auch weil schon eine sehr gut funktionierende Sonde mit einer Länge von nur 21 Nukleotiden aus den Subtypisierungsassays (Sonde 1) vorhanden war, setzten wir diese weiter ein. Tatsächlich wird diese Sonde effektiv geschnitten, wenn bis zu 3 Mismatches vorhanden sind (Sonde 1). Die Allele DRB1*1001 und DRB4*01-02 besitzen allerdings zu viele Basenfehlpaarungen, so daß für die beiden Mixe 12 und 24 eine neue Sonde entwickelt werden mußte (Sonde 3).

Aus Kostengründen und der Übersichtlichkeit halber ist es nicht ratsam, sofort eine Low-Resolution durch eine High-Resolution-Typisierung für alle DRB1 Allele zu ersetzen. Diese würde mehr Reaktionen erfordern, als in einem PCR-Versuch durchgeführt werden können. Für die Nierentransplantation könnte sich eine hochauflösende Typisierung durchsetzen, da es sich gezeigt hat, daß für das Überleben einer Spenderniere eine präzise, höher auflösende Typisierung (Subtypisierung) im Anschluß an eine einschränkende Low-Resolution-Typisierung von Vorteil sein kann. In der Knochenmarktransplantation ist eine hochauflösende Bestimmung der HLA-Klasse-II-Merkmale nicht verwandter Spender/Empfänger-Paare zwingend erforderlich. Da eine solche Transplantation meist nicht sofort durchgeführt werden muß, bleibt mehr Zeit als bei einer Nierentransplantation. Es kommen hierfür daher auch weitere, zeitaufwendigere, jedoch genauere Verfahren in Frage, wie z.B. die Sequenzierung. Prinzipiell könnte die in dieser Arbeit vorgestellte Methode im Rahmen der Knochenmarktransplantation als Routineverfahren verwendet werden.

Viele HLA-Allele sind mit bestimmten Krankheiten assoziiert, d.h. deren Präsenz bzw. Fehlen steht in kausalem Zusammenhang mit der Entstehung von bestimmten Krankheiten. Daher bietet sich die TaqMan-Methode auch als Verfahren bei der HLA-Testung im Rahmen von Krankheitsassoziationsuntersuchungen an. So ist beispielsweise DRB1*04 (DRB1*0401, 0404, 0405, 0408, Thorsby 1997 und 1995) mit rheumatoider Arthritis assoziiert. Desweiteren ist der Subtyp DRB1*0405 oft mit einem chronischen Verlauf einer HCV-Infektion verknüpft (Aikawa et al., 1996, Thio et al., 2000).

Es besteht eine Vielzahl von Methoden, die für die Routinediagnostik, bzw. für die Spendertypisierung eingesetzt werden können (siehe Grundlagen). Fast alle jedoch besitzen gewisse Nachteile: Wegen Unzuverlässigkeit und geringer Auflösung sind zelluläre oder serologische Methoden durch molekularbiologische Methoden zunehmend verdrängt worden. Allerdings ist die RFLP-Methode für die Notfalltypisierung wegen des beträchtlichen experimentellen Zeit- und Arbeitsaufwandes nicht einsetzbar. Auch die PCR-SSO-Methode ist sehr zeit- und

arbeitsaufwendig und lohnt nur im hohen Durchsatz (Kap. 3 Grundlagen). Eine Methode, die sich im Moment im Focus der HLA-Typsierung befindet ist die RSCA. Sie ist deutlich schneller durchzuführen und einfacher zu handhaben, jedoch gibt es Schwierigkeiten auf allen Loci eine hohe Auflösung zu erreichen.

Eine Sequenzierung erfordert nach wie vor einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand. Bei den in der Abteilung durchgeführten Sequenzierungen läßt sich der Zeitbedarf reduzieren, indem man für die Aufreinigung der Amplifikate und des Produktes des Cycle Sequencing (Entfernung unspezifischer Produkte bzw. der ungebundenen Farbstoffe (Dyes)) nicht wie bisher aufwendige Umkristallisationsschritte nutzt, sondern andere Verfahren, wie z.B. die von Qiagen oder Millipore, verwendet. Eine solche Aufreinigung mit Hilfe einer Membran geeigneter Porengröße oder durch Binden an Sepharose und nachfolgende Zentrifugations- und Elutionschritte ergibt einen beträchtlichen Zeitgewinn (ca. 2-3 Stunden). Der Arbeitsaufwand wird zwar auch dadurch geringer, daß man Geräte einsetzt, bei denen die Auftrennung mittels Polyacrylamidgel durch ein Kapillarsystem ersetzt wird und bei denen eine Programmierung ein nahezu pausenloses Abarbeiten der Aufträge ermöglicht (ABI 373), er bleibt aber dennoch relativ hoch. Außerdem stellt der HLA-Bereich durch seinen starken Polymorphismus und die damit verbundenen Sequenzanalogien eine große Herausforderung an das Personal dar: Durch die Analogie und durch die Tatsache, daß jedes Individuum 2 HLA-Merkmale auf jedem Genort besitzt, kommt es zu Überlappungen und damit verbunden zu schwer zu interpretierenden Ergebnissen. Es bedarf großer Erfahrung entscheiden zu können, ob eine solche mehrdeutige Position nur durch einen Background-Effekt verursacht wird oder ob es sich tatsächlich um eine heterozygote Position handelt bzw. auf Allelebene eine Homozygotie vorliegt. Das Ergebnis einer Low Resolution-Vortypisierung kann dann sehr hilfreich bei der Primerauswahl sein: Finden sich bei ihr schon undefinierte Allele, sollte man auf eine Locus-spezifische Sequenzierung mit Intron-Primern verzichten und stattdessen die Möglichkeiten mit gruppen- oder allelspezifischen Primern einschränken. Reicht dies nicht aus, sollte man sich auf die Subtypisierungsebene vortasten. Da es für die ersten beiden Basen in Codon 86 (GT) nur eine Mutation (TG) gibt, (außer für die Subtypen DR1*08042 und DRB1*08043 (TT)), halbiert ein für diese Mutation spezifischer Primer die Möglichkeiten bereits, was oft schon ausreicht. Die zum ABI 377 zugehörige Software hat außerdem Schwierigkeiten, das Signal vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Hinzu kommt, daß für die Auswertesoftware keine Aktualisierung der Sequenzen stattfindet, was in unserer Abteilung bei der schnellen Erweiterung der HLA-Sequenzdatenbank (2 neue Allele pro Woche) nach etwa 2 Jahren zu einer völligen Veralterung des Systems führte. Andere Anbieter von Interpretationssoftware sind auch nicht in der Lage "Ambiguities" zu vermeiden. So ist für die Interpretation der Signale eine gewisse Erfahrung nötig, die nur geschultes Personal haben kann. Der hohe Zeit- und Arbeitsaufwand erhöht die Kosten zusätzlich.

Aus diesen Gründen sind gegenwärtig die SSP- und die SSO-Methode weit verbreitet. Die SSO-Methode, der "klassische" Blot, ist besser für den hohen Durchsatz geeignet ist, während der Reverse Blot wegen des geringeren Zeitbedarfs auch für niedrige Probenaufkommen oder für die Notfalltypisierung genutzt werden kann.

Die SSP-Methode zeichnet sich durch ihre einfache Anwendbarkeit und den zu anderen Methoden relativ geringen Zeitbedarf aus. Ferner ist diesem System keine technische Grenze zur Erweiterung gesetzt. Kritikpunkte bleiben jedoch die relativ hohe DNA- und Enzym-Menge, die benötigt wird, sowie der trotzdem noch recht hohe Zeitaufwand, was ungünstig für die Notfalltypisierung ist. Ein höherer Automatisationsgrad, der auch Fehlerquellen, wie Verschleppungskontaminationen oder Vertauschen von Gefäßen, Platten- oder Gelpositionen vermindern sollte, wäre günstig.

Die TaqMan-Methode hat sich im Laufe der bisherigen Entwicklung und Austestung als eine sehr gute Alternative zu den bisher üblichen Methoden (Serologie, SSP-PCR, SBT) erwiesen. Sie besitzt viele Vorteile. Ihr größter Vorteil liegt in der Zeitersparnis, die durch die Detektion mittels Fluoreszenzmessung erreicht wird. Auf diese Weise braucht keine Agarosegelelektrophorese durchgeführt zu werden. Außerdem entfallen der Umgang mit dem DNA-Interkalator Ethidiumbromid, der stark cancerogen ist, sowie die Entsorgung der damit kontaminierten Gele und des Elektrophoresepuffers. Die Methode ist analog zur SSP-PCR ausbaufähig, das bedeutet, sie kann entsprechend der wachsenden Zahl von HLA-Allelen mit neuen PCR-Mixen erweitert und den erforderlichen Bedürfnissen angepaßt werden. Durch das "one-tube"-Prinzip dieses Verfahrens können nach Ansetzen der PCR und Verschließen der Reaktionsgefäße weder Amplifikate oder genomische DNA aus der Umgebung (Raumluft, Werkbank) die Detektion stören, noch können die bei dem Versuch entstehenden Amplifikate andere Experimente beeinflussen, da ein Öffnen der Reaktionsgefäße zur Detektion nicht nötig ist. Aufwendige Dekontaminationen sind somit nicht erforderlich. Außerdem benötigt der hier entwickelte Assay nur ein Zehntel der DNA-Menge (30 ng) pro Reaktion, die bei der konventionellen PCR (SSP-PCR) gebraucht wird. Das Verfahren besitzt zudem eine hohe Reproduzierbarkeit. 10 im Doppelansatz getestete Samples zeigten einen durchschnittlichen FAM-Wert von 2,7870 \pm 0,255 und einen TET-Wert von 1,38 \pm 0,078. Als Nachteil erweist sich der hohe Anschaffungspreis des Gerätes. Wie hier gezeigt wurde, ist es aber möglich, nach Entwicklung von Typisierungskits im Real-Time-Modus, die PCR-Reaktionen in herkömmlichen Thermocyclern durchzuführen und den 7700 nur als Meß- und Interpretationsstation zu verwenden. Es ist außerdem möglich, mit diesem Gerät eine quantitative PCR durchzuführen. Dadurch kann es in vielfältiger Weise eingesetzt werden, beispielsweise für Genexpressionsanalysen. So gibt es im Transplantationsbereich eine Menge von Markern, insbesondere Zytokine, die diesbezüglich untersucht werden könnten (EFI-Meeting 2000, Montpellier). Ein weiterer Nachteil ist, daß, zumindest in der Entwicklung, die Synthese von Doppel-

Fluoreszenz-markierten Sonden nicht ganz billig ist. Bei einem höheren Durchsatz und damit verbundenem größeren Verbrauch, kann man allerdings bessere Konditionen aushandeln. Zudem gibt es günstigere Anbieter als Perkin-Elmer, die Sonden in ähnlicher Qualität liefern. Die hier getestete, deutlich günstigere Sonde von Eurogentec mußte allerdings in etwas höherer Konzentration eingesetzt werden als die PE-Sonde. Sie besaß auch eine höhere Grundfluoreszenz, die offenbar durch weniger effiziente Aufreinigung (Verunreinigung durch nicht gebundene Fluoreszenzfarbstoffe) oder durch beschädigte Sonden, die bei thermischer Belastung zerfallen, verursacht wird. Die Kosten für Sonden sollten aber bei größerem Bedarf deutlich sinken, da auch die Kosten für Patente individuell ausgehandelt werden können.

Perkin-Elmer bot als erste Firma ein Real-Time-PCR-System an. Mittlerweile ist der LightCycler von Roche auf dem Markt. Mit diesem Gerät kann man ebenfalls nach dem sogenannten TaqMan Prinzip mittels Doppelfluoreszenz-markierter Sonden oder mittels zweier Sonden, die jeweils einfach markiert sind, arbeiten. Die beiden Sonden müssen ebenfalls spezifisch hybridisieren, aber in definiertem Abstand (1-5 Basen), so daß FRET zwischen Reporter- und Quencher-markierter Sonde stattfinden kann. Der Vorteil ist die günstigere Synthese dieser einfach-markierten Oligos, der Nachteil, daß beim Design die Sequenz eines weiteren Oligos beachtet werden muß (Selbstkomplementarität, Primer-Dimer-Bildung etc.). Eine weitere Alternative ist die Schmelzpunktbestimmung mittels SYBR Green. Dieser Farbstoff interkaliert nur in doppelsträngige DNA, was bedeutet, daß spätestens beim Denaturierungsschritt das Fluoreszenz-Signal verschwindet, bei kurzkettiger DNA, je nach T_m also früher. Damit ist es möglich, zwischen verschiedenen Amplifikationen (wenigstens 2) zu unterscheiden, sofern ihre Amplifikate bzw. deren T_m sich genügend unterscheiden. Dieses Gerät ist preislich günstiger und eine Amplifizierung (etwa 30 min) ist schneller durchzuführen, da sie in Glaskapillaren stattfindet, die schneller aufgeheizt und wieder heruntergekühlt werden können. Allerdings sind diese dünnen Glasgefäße nur mit einem Aufsatz zu beschicken und das Karussell ist mit maximal 32 dieser Gefäße zu beladen, sodaß für 96 Reaktionen mit einer reinen Laufzeit von 90 min zu rechnen ist, beladen und detektieren nicht mitgerechnet. Diese Methodik ist zwar automatisiert, aber bei mehr als 32 Reaktionen bleibt nicht viel Zeit für andere Tätigkeiten. Der durch den höheren Automatisationsgrad erreichte Zeitgewinn gegenüber der konventionellen PCR kann deshalb nicht vollständig für andere Tätigkeiten genutzt werden, ohne zuviel Leerlauf zu riskieren.

Biorad entwickelt derzeit den iCycler, ein ebenfalls auf dem Prinzip der Fluoreszenz-PCR basierendes Gerät, das allerdings noch nicht erhältlich ist.

Anstatt lineare Sonden zu benutzen (TaqMan-Sonden, HybProbes), gibt es auch Molecular Beacons. Diese bestehen aus einem Loop (ringförmige DNA), dessen Sequenz spezifisch zur jeweiligen zu detektierenden DNA bindet. Die Enden dieses Loops sind aber linear und ihre

Sequenzen sind komplementär, so daß sie im intakten Zustand hybridisieren. Am 5'- und am 3'-Ende sind sie mit einem Reporter und Quencher substituiert, so daß es im nativen Zustand zu einem FRET kommt und nur der Quencher Lichtquanten abstrahlt. Für dieses System sind deutlich geringere Lizenzgebühren zu entrichten. Der zu messende Fluoreszenzunterschied ist jedoch auch deutlich geringer als bei TaqMan-Sonden und deshalb für die hier vorgestellte Anwendung weniger gut geeignet.

Die IntergenCorporation bietet das Amplifluor System an, das sich bisher jedoch wegen des ebenfalls relativ geringen Fluoreszenzunterschieds nicht etablieren konnte. Es setzt sich aus einem spezifischen Primerpaar und dem Uni-Primer Energy Transfer-labeled Primer zusammen, der universell für jedes PCR-System eingesetzt werden kann. Er besteht aus einer linearen Sequenz Z, deren komplementäre Sequenz Z' ebenfalls an einen Primer des individuellen Systems angeknüpft wird, sowie aus einem „Hairpin“, an dessen Enden, ähnlich wie bei Molecular Beacons, je ein Reporter- und ein Quencher-Molekül gebunden sind. Im intakten Zustand besitzen sie einen definierten Abstand und können miteinander wechselwirken, so daß es nur zur Detektion des Quencher-Signals kommt. Im ersten PCR-Schritt werden die spezifischen Primer des jeweiligen Systems eingebaut. Doch schon im 2. Schritt kann der Uni-Primer mit seiner Z-Sequenz an die komplementäre Z'-Sequenz binden, die durch den ersten PCR-Schritt eingebaut wurde. Bei der Inkorporation des Uni-Primers wird der „Hairpin“ aufgefaltet und der Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren unterbrochen. Damit steigt die Fluoreszenzintensität des Reporters an (Nazarenko,1997, Uehara,1999).

Momentan gibt es einen deutlichen Trend hin zu High-throughput-Systemen: Durch DNA-Chips (Mikroarrays) z.B. ist es möglich mehrere tausend Mutationen mit einem Versuch zu untersuchen. Es gibt Systeme, bei denen DNA-Abschnitte nur hybridisieren, andere, bei denen ein Oligonukleotidaufbau direkt auf dem Chip stattfindet (Firma Genescan). Detektiert wird fast immer durch den Einbau von Fluoreszenz-Markern. Ein Problem stellt die Auflösung dar, doch es gibt heute schon Meßgeräte, die in der Lage sind halb-quantitativ zu arbeiten, d.h. sie können zumindest ein homozygotes Individuum von einem heterozygoten unterscheiden. In dieser Technologie steckt ein enormes Potential für Behandlung und Diagnostik, auch wenn dies von Kritikern als der Weg zum „gläsernen Patienten“ bezeichnet wird.

Obwohl in den letzten Jahren zunehmend auch Risikopatienten (Diabetiker, Herz-Kreislauf-erkrankte) transplantiert wurden, konnten die Ergebnisse der Nierentransplantationen ständig verbessert werden. Dies ist einerseits auf die bessere Einstellung mit Medikamenten, andererseits auf eine verbesserte HLA-Typisierung zurückzuführen. Die Entwicklung neuer Immunsuppressiva und die Kombination mehrerer Präparate, die eine Abstoßung stärker unterdrücken bzw. weniger Nebenwirkungen haben, erhöhen das Transplantatüberleben und die Lebensqualität des Patienten.

Dennoch bleibt die Tumorinzidenz von immunsupprimierten Patienten erheblich größer als bei nicht immunsupprimierten Kontrollpersonen und ist abhängig von der Dosis der Immunsuppressiva (non-Hodkin's Lymphoma (NHL), Opelz, 1993). Bei einer guten HLA-Kompatibilität wird die Dosis der Immunsuppressiva schneller reduziert, bzw. die Immunsuppression sogar beendet, sodaß eine geringere Tumorrage zu erwarten ist.

Nach wie vor besteht ein großer Bedarf an passenden Spenderorganen. Einen Ausweg könnten die raschen Fortschritte in der Gentechnik und damit die Möglichkeit der Transplantation von Tierorganen darstellen. Die Xenotransplantation könnte den Mangel an Organen lösen. Doch bestehen viele Barrieren, die bisher die klinische Anwendung verhindern: Eine komplexe Art der Abstoßung, anatomische Verhältnisse, sowie Unterschiede in Metabolismus und Physiologie. Zudem stellt die mögliche Übertragung von Mikroorganismen ein erhebliches Risiko dar (Denner, 1998). Es könnten bislang ungefährliche endogene Retroviren von Mensch und Schwein miteinander rekombinieren und eine neue Klasse von Erregern bilden. Aus diesen Gründen verzichtete man bisher auf eine klinische Anwendung der Xenotransplantation.

Bis genügend Information in Bezug auf die Gefahren der Xenotransplantation zur Verfügung stehen und die Weiterentwicklung von Technologien wie beispielsweise von „DNA-Chips“ für den täglichen Einsatz abgeschlossen ist, könnte der getestete TaqMan-Assay ein in der Routinediagnostik sehr brauchbares System zum HLA-Matching darstellen. Um letztendlich zu klären, ob der hier vorgestellte Assay die herkömmlichen Methoden ersetzen kann, besonders in der Notfalltypisierung, sollte er auf jeden Fall noch von weiteren Laboratorien eingesetzt und geprüft werden, damit die Variabilität und Reproduzierbarkeit des Tests festgestellt werden kann.

9 Zusammenfassung

In Anlehnung an die konventionelle SSP-PCR-Methode wurde ein Low-Resolution-Panel mittels des TaqMan-Prinzips entwickelt und es wurde exemplarisch für DR4 und DR15/16 gezeigt, daß die auf dem 5'-Nuklease-Assay beruhende Methode fähig ist, auch einzelne Punktmutationen voneinander zu unterscheiden.

Das Grundprinzip dieser Methode basiert ähnlich dem der PCR-SSP auf dem Verfahren der PCR und auf dem Ausnutzen genetischer Unterschiede. So kommt es nur zu einer Amplifizierung wenn beide Primer spezifisch binden. Die Detektion einer erfolgreichen Amplifizierung erfolgt bei der TaqMan-Methode über eine Fluoreszenzmessung im gleichen Reaktionsgefäß. So entfallen jegliche Post-PCR-Schritte, d.h. es müssen weder weitere Pipettierschritte noch Gelelektrophorese eingesetzt werden. Das automatisch generierte Datenfile muß nur am Rechner ausgewertet werden. Mit Hilfe einer optimierten Schnell-DNA-Isolierungsmethode, die auf dem Binden an ein Säulenmaterial und Verdau etwaiger Proteine beruht, läßt sich eine DRB1-Typisierung nunmehr in etwas mehr als 2 Stunden durchführen, im Gegensatz zu den bisher 3-3.5 Stunden bei der konventionellen SSP-PCR. Durch den höheren Automatisierungsgrad, werden nicht nur Zeit und Arbeitsaufwand minimiert, sondern auch die potentiellen Fehlerquellen eingeschränkt, wie z.B. Kontaminationen durch PCR-Produkte, fehlerhaftes Auftragen der PCR-Produkte auf das Gel und die falsche Zuordnung von Banden. Bei Validierungsuntersuchungen dieses Tests ergab sich eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit der konventionellen SSP-Typisierung und mit anderen molekularbiologischen Methoden wie RFLP.

Die TaqMan-Methode stellt eine sehr nützliche Alternative zu herkömmlichen Typisierungsverfahren dar. Sie kann sowohl für Einzel- und Notfalltypisierungen, als auch für eine größere Zahl gleichzeitig durchzuführender Tests eingesetzt werden. Sie ist sehr zuverlässig, weniger zeit- und arbeitsintensiv als andere Methoden (SSP, SSO), besitzt ein höheres Automatisierungspotential und einen höheren Durchsatz. Sie ist erweiterbar für die Detektion neuer Allele und Subtypen. Die Technik ist in ihren Einsatzmöglichkeiten nicht begrenzt, im Gegensatz zu RFLP oder RSCA, die durch Enzyme bzw. ihre Schnittstellen limitiert sind. TaqMan-Assays sind weniger aufwendig und die Interpretation übersichtlicher als z.B. die einer Sequenzierung. Eine Ausdehnung der HLA-Typisierung mittels TaqMan-Verfahren auf andere HLA-Loci ist durchaus sinnvoll.

10 Anhang: Getestete DNA-Proben

DNANr	Spezifität Serologie	SSP-PCR	TaqMan	Übereinstimmung aller Methoden	Übereinstimmung mit SSP-PCR
S32092	1,13	1,1302	1,1302	+	+
S32095	1,4	1,4	1,4	+	+
S32096	5,9	9,11	9,11	-	+
S32099	11,14	11,14.1	11,14.1	+	+
S32100	7,9	7,9	7,9	+	+
S32106	4,11	4,11	4,11	+	+
S32107	3,13	3,1301	17,1301	+	+
S32108	15,-	15,16	15,16	-	+
S32109	1,11	1,1,11	1,1,11	+	+
S32111	4,11	4,11	4,11	+	+
S32113	7,17	7,17	7,17	+	+
S32114	4,12	4,12	4,12	+	+
S32115	13,14	1302,1401	1302,1401	+	+
S32116	1,4	1.1,4	1.1,4	+	+
S32117	11,17	3,11	3,11	+	+
S32119	7,17	7,17	7,17	+	+
S32120	7,13	7,1301	7,1301	+	+
S32121	11,15	11,15	15,11	+	+
S32122	13,15	1301,15	15,1301	+	+
S32123	4,7	4,7	4,7	+	+
S32125	3,13	3,1301	3,1301	+	+
S32126	4,13	4,1301	4,1301	+	+
S32127	4,8	4,8	4,8	+	+
S32130	13,15	15,1301	15,1301	+	+
S32131	5,8	8,12	8,12	+	+
S32133	3,13	3,1301	3,1301	+	+
S32134	2,-	15,-	15	+	+
S32136	7,14	7,1401	7,1401	+	+
S32137	7,13	7,1301	7,1301	+	+
S32139	7,13	7,1301	7,1301	+	+
S32140	8,11	8,11	8,11	+	+
S32142	8,16	8,1401	8,1401	-	+
S32141	7,8	7,8,(11)	7,8,11	-	(+)
S32149	4,15	15,4	15,4	+	+
S32151	7,13	7,1301	7,1301	+	+
S32154	3,6	3,1302	3,1302	+	+
S32156	13,-	1302	1302	+	+
S32157	4,11	4,11	4,11	+	+
S32158	7,14	7,1401	7,1401	+	+
S32160	4,7	4,7	4,7	+	+
S32162	4,8	4,12	4,12	-	+
S32163	4,7	4,7	4,7	+	+
S32164	11,13	11,13	11,13	+	+
S32165	8,16	8,16	8,16	+	+
S32167	3,4	3,4	3,4	+	+
S32168	1,15	1.1,15	1.1,15	+	+
S32171	13,15	15,1301	15,1301	+	+
S32173	7,15	15,7	15,7	+	+
S32175	4,13	4,1302	4,1302	+	+

S32176	3,13	3,1302	3,1302	+	+
--------	------	--------	--------	---	---

DNANr	Spezifität Serologie	SSP-PCR	TaqMan	Übereinstimmung aller Methoden	Übereinstimmung mit SSP-PCR
S32178	13,-	1301	1301	+	+
S32179	4,8	4,8	4,8	+	+
S32182	15,7	15,7	15,7	+	+
S32183	4,15	15,4	15,4	+	+
S32185	8,11	8,11	8,11	+	+
S32187	2,12	16,12	16,12	+	+
S32190	1,7	1.1,7	1.1,7	+	+
S32191	15,-	15,1301	15,1301	-	+
S32192	1,17	1.2,3	1.2,3	-	+
S32193	3,7	3,7	17,7	+	+
S32194	11,-	11,1302	11,1302	-	+
S32195	13,-	13.2,- (7)	13.2,7	-	(+)
S32197	7,14	7,1401	7, 1401	+	+
S32198	4,7	4,7	4,7	+	+
S32061	13,15	1302,15	15,1302,	+	+
S32062	3,5	3,11	3,11	+	+
S32063	8,11	8,11	8,11,	+	+
S32064	4,13	4,1301	4,1301	+	+
S32065	4,11	4,11	4,11	+	+
S32068	11,12	11,12	11,12	+	+
S32069	3,9	3,9	3,9	+	+
S32071	15,17	15,3	15,3	+	+
S32072	7,15	15,7	15,7	+	+
S32073	3,7	3,7	3,7	+	+
S32074	2,8	15,8	15,8	+	+
S32075	13,-	3,1301	3,1301	+	+
S32076	14,15	15,1401	15,1401	+	+
S32077	8,13	8,1301	8,1301	+	+
S32078	1,2	1.1,15	1.1,15	+	+
S32080	4,16	16,4	16,4	+	+
S32081	14,17	3,1401	3,1401	+	+
S32082	7,16	16,7	16,7	+	+
S32083	3,11	3,11	3,11	+	+
S32085	4,6	4,1301	4,1301	+	+
S32087	5,-	11,1303	11,1303	+	+
S38306	1,-	1.1,-	1.1	+	+
S38307	1,3	1.1,3	1.1,3	+	+
S38308	15,-	15	15	+	+
S38309	1,11	1.1,11	1.1,11	+	+
S38312	4,13	4,1301	4,1301	+	+
S38314	7,11	7,11	7,11	+	+
S38325	1,14	1.1,1401	1.1,1401	+	+
S38326	7,15	15,7	15,7	+	+
S38329	1,8	1.1,7	1.1,7	-	+
S38337	4,15	15,4	15,4	+	+
S38339	1,7	1.1,7	1.1,7	+	+
S38340	4,7	4,7	4,7	+	+
S38344	1,13	1.1,1301	1.1,1301	+	+
S38345	7,13	7,1302	7,1302	+	+

DNA-Nr	HLA-DRB1*15/16- Ergebnis nach SSP-PCR	Ergebnis TaqMan	Bemerkung
1283	1501	1501	
2394	1501	1501	
3031	1501	1501	
3616	1501	1501	
4885	1501	1501	
5028	1501	1501	
7390	1504	1504	
9808	1503	1503	
9827	1501	1501	
9828	1501	1501	
9829	1501	1501	
9838	1501	1501	
9896	1601	1601	
9914	1501	1501	
9956	1601	1601	
9971	1501	1502	Wdh mit SSP:1502
9973	1501	1501	
10005	1601	1601	
10021	1501	1501	
10078	1501	1501	
10079	1601	1601	
10103	1502	1502	
10144	1501	1501	
10159	1501	1501	
10185	1501	1501	
10222	1501	1501	
10228	1601	1601	
10240	1501	1501	
10308	1501	1501	
10369	1501	1501	
10372	1501	1501	
10379	1501	1501	
10457	1601	1601	
10484	1501	1501	
10532	1601	1601	
10550	1501	1501	
10558	1502,1503	1503	Wdh mit SSP:1503
10590	1601	1601	
10625	1601	1601	
10681	1601	1601	
10684	1501,1601	1501,1602	Wdh mit SSP:1501, 1602
10732	1601	1601	
10752	1601	1601	
10829	1601	1601	
10772	1501	1501	
10796	1601	1601	
10926	1601	1601	
11021	1601	1601	
11033	1601	1601	
11169	1601	1601	
11237	1502	1502	
11296	1601	1601	

11320	1502	1502	
-------	------	------	--

DNA-Nr	HLA-DRB1*15/16- Ergebnis nach SSP-PCR	Ergebnis TaqMan	Bemerkung
11429	1601	1601	
11544	1601	1601	
11586	1601	1601	
11632	1601	1601	
11658	1601	1601	
11752	1501	1501	
11758	1501	1501	
11760	1601	1601	
11833	1601	1601	
11860	1601	1601	
11870	1601	1601	
11977	1602	1602	
12031	1601	1601	
12130	1501	1501	
12166	1501	1501	
12182	1501	1501	
12183	1501	1501	
12184	1501	1501	
12213	1501	1501	
12214	1502	1502	
12496	1602	1602	
12290	1601	1601	
12298	1601	1601	
12304	1601	1601	
12306	1601	1601	
12339	1601	1601	
12536	1601	1601	
12635	1601	1601	
12663	1601	1601	
12735	1503	1503	
12745	1601	1601	
12767	1601	1601	
12882	1601	1601	
12902	1601	1601	
12992	1601	1601	
13138	1601	1601	
13155	1601	1601	
13156	1601	1601	
13186	1601	1601	
13233	1601	1601	
13671	1601	1601	
13785	1501	1501	
28057	1501	1501	
28099	1501	1501	

DNA-Nr	HLA-DRB1*04-Ergebnis nach SSP-PCR	Ergebnis TaqMan	Bemerkung
1270	06	06	
1584	1,4	1,3	Wdh. mit SSP-PCR: 01,03
2767	04	04	
3114	02	02	
3155	07	07	
5373	08	08	
11860	02	02	
17641	02,13	02	Wdh mit SSP-PCR: 02
18645	03,05	03,05	
20568	08	08	
20873	04	04	
21127	01,07	01,07	
21159	01,02	01,02	
21541	04,05	04,05	
22572	04,07	04,07	
23369	04	04	
26602	03	03	
26660	07	07	
26643	01	01	
26775	01	01	
26807	01,03	01,03	
26814	04,07	04,07	
26881	04	04	
26882	01,01	01,01	
26891	04	04	
26898	01	01	
26958	01	01	
26960	04	04	
26967	01,01	01,01	
26970	04	04	
26984	01	01	
26998	01,08	01,08	
27035	01	01	
27020	08	08	
27035	01	01	
27040	04	04	
27092	08	08	
27121	01	01	
27123	01	01	
27273	03,06	03,06	
27401	05	05	
27404	05,05	05,05	
27405	09	09	
27429	04	04	
27433	01	01	
27435	04	04	
27454	01	01	
27463	01	01	
27607	04	04	
27617	04	04	
27664	01,01	01,01	
27724	01	01	

27746	01	01	
-------	----	----	--

DNA-Nr	HLA-DRB1*04-Ergebnis nach SSP-PCR	Ergebnis TaqMan	Bemerkung
27747	04,07	04,07	
27814	01	01	
27821	01	01	
27824	04	04	
27910	04	07	nach Wdh. mit SSP-PCR:07
27927	04	04	
27940	07	07	
27961	05	05	
27969	03	03	
27998	10	10	
28031	01,02	01,02	
28038	02	02	
28039	01	01	
28056	01	01	
28098	01	01	
28099	01	01	
28120	05	05	
28127	01	01	
28132	01	01	
28133	01,07	01,07	
28136	05	05	
28166	01	01	
28195	02	02	
28259	04	04	
28261	01	01	
28264	04	04	
28268	01	01	
28269	07	07	
28390	03,08	03,08	
28314	01	01	
28244	03	03	
28345	03	03	
28349	05	05	
28353	02	02	
28365	03	03	
28388	04	04	
28437	04	04	
28482	01,04	01,04	
28388	04	04	
28490	01	01	
28492	01	01	
28504	01	01	
28507	01	01	
28710	01	01	
28775	01	01	
28792	01,04	01,04	
28793	01	01	
28795	01	01	
28919	08	08	
R32200	01	01	

11 Literatur

Aikawa T, Kojima M, Onishi H et al. HLA DRB1 and DQB1 alleles and haplotypes influencing the progression of hepatitis C. *J Med Virol* 1996; **49** (4): 274-278.

Albis-Camps M, Blasczyk R. Fluorotyping of HLA-DRB by sequence-specific priming and fluorogenic probing. *Tissue Antigens* 1999; **53**: 301-307.

Andrus A, McCollum C. Evaluating and isolating synthetic oligonucleotides, 38X User Bulletin No.13: 1992 revised version.

Allan J S. Xenotransplantation at a crossroads: Prevention versus progress. 1996 *Nature Med* 2 (1)

Argüello J R, Little A-M, Bohan E et al. A high resolution HLA class I and class II matching method for bone marrow donor selection. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 527-534.

Baxter-Lowe L A. Molecular techniques for typing unrelated marrow donors: potential impact of molecular typing disparity on donor selection: *Bone Marrow Transplant* 1994; **14 Suppl 4**: 42-50.

Bein G, Gläser R, Kirchner H. Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification. *Tissue Antigens*. 1992; **39**: 68-73.

Bidwell J. DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. *Immunol Today* 1988; **9**: 1-6.

Blasczyk R, Hahn U, Wehling J, Huhn D, Salama A. Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis. *Tissue Antigens* 1995; **46**: 86-95.

Buyse I, Decorte R, Baens M, Cuppens H, Semana G, Emonds M-P, Marynen P, Cassiman J-J. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens* 1993; **41**: 1-14.

Chapman L E, Folks T M, Salomon D R, Patterson A P, Eggerman T E, Noguchi P D: Sounding Board. Xenotransplantation and xenogenic infections. *N Engl J Med* 1995; **333**: 1498-1501.

Cohan B, Persijn G, DeMeester J: Annual Report 1998, Eurotransplant International Foundation.

Denner J. Immunosuppression by Retroviruses: Implications for Xenotransplantation. Reprinted from Xenotransplantation: Scientific Frontiers and Public Policy, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; **862**, 75-86.

Erlich H, Bugawan T, Begovich A B, Scharf S, Griffith R, Saiki R, Higuchi R, Walsh P S. HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. *Eur J Immunogenet* 1991; **18**: 33-35.

Faas S J, Menon R, Braun E R, Rudert W A, and Trucco M. Sequence-specific priming and exonuclease-released fluorescence detection of HLA-DQB1 alleles. *Tissue Antigens* 1996; **48**: 97-112.

Förster VT. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* (Leipzig) 1948; **2**: 55-75.

Forssmann U, Mytilineos J, Scherer S, Opelz G. A method for HLA-DQA typing by PCR-SSP technique. *Transplant Int* 1994; **7**: 515-8.

Graham DE. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. *Annal Biochem* 1978; **85**: 609-13.

Hammer C. Potentielle Barrieren der xenogenen Organtransplantation. *Schweiz Med Wochenschr* 1998; **128**: 931-4.

Holland PA, Abramson RD, Watson R and Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5-3 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 1991; **88**: 7276-7280.

Janeway C A, Travers P. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford. 1997 Kap 1,4,12.

Jordan F, McWhinnie AJ, Turner S et al. Comparison of HLA-DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR-SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. *Tissue Antigens* 1995; **45**(2): 103-10.

Kimura A, Sasazuki T. Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique, 1992, **1**: 397-419 in: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg): HLA 1991-Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.

Kotsch K, Wehling J, Köhler S, Blasczyk R. Sequencing of HLA class I genes based on the conserved diversity of the non-coding regions: sequencing based typing of the HLA-A gene. *Tissue Antigens* 1997; **50**: 178-191.

Lee LG, Conell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* 1993; **21**: 3761-3.

Lempert M. Typisierung der HLA-Klasse-I-Genorte (HLA-A, -B, -Cw) durch PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP). Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Heidelberg, 1998.

Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications* 1995; **4**: 357-62.

Luedeck H, Blasczyk R. Fluorotyping of HLA-C: differential detection of amplicons by sequence-specific priming and fluorogenic probing. *Tissue Antigens* 1997; **50**: 627-638.

Lyamichev V, Brow MAD, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 1993; **260**: 778-83.

Marsh SGE. HLA class II region sequences, 1998. *Tissue Antigens* 1998; **51**: 467-507.

Mertes G, Schäfer T, Schild T A, Schmidt G, Schuster D, vom Stein J. Automatische genetische Analytik. Weinheim VCH 1997.

Mullis K B, Faloona F A. Specific sythesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzes chain reaction. In:Wu R. *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, New York, Berkeley 1987:**155**: 335-350.

Mytilineos J, Scherer S, Dunckley H, Chapman J, Middleton D, Opelz G. Comparison of serological and DNA HLA-DR typing results for transplantation in Western Europe, Eastern Europe, North America and South America. *Transpl Int Suppl* 1994; **7**: 519-521.

Mytilineos J. HLA testing: The state of the art of genomic methods in 1996. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; **11**: 2129-2134.

Mytilineos J, Amirzargar A-A, Mersch G et al. Subtyping for HLA DR15 and DR16 by the PCR-SSP method. Comparison of the INNO-LIPA HLA-DR2 subtyping kit. *Hum Immunol* 1996; **47**: 48.

Nazarenko, I.A., S.K. Bhatnagar, and R.J.Hohmann. A closed tube format doe amplification and detection of DNA based on energy transfer.*Nucleic Acids Res* 1997 **25**: 2516-2521.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE et al. Analysis of any point mutation in DMA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; **19**: 2503-16.

Olerup O, Zetterquist H HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; **39**: 225-35.

Opelz G, Henderson H. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet* 1993; **342**: 1514-1516.

Opelz G. Effect of the maintenance immunosuppressive drug regimen of kidney transplant outcome. *Transplantation* 1994; **58**: 443-446.

Opelz G, Scherer S, Mytilineos J. Analysis of HLA-DR Split-Specificity matching in cadaver kidney transplantation. *Transplantation* 1997; **63**: 57-9.

Opelz G, Wujjak T, Döhler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. *Reviews in Immunogenetics* 1999; **1**: 334-342.

Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 6409-6412.

Slateva K, Albis Camps M, Blasczyk R. Fluorotyping of HLA-A by sequence-specific priming and fluorogenic probing. *Tissue Antigens* 1998; **52**: 462-472.

Smit H, Sasse R, Molzahn M, Schulin B. Organspende und Transplantation in Deutschland, 1998, Deutsche Stiftung Organtransplantation.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; **98**: 503-517.

Stoye J P, Coffin J M: The dangers of xenotransplantation. *Nature Med* 1995 (**11**): 1100.

Terasaki P I, McClelland J D. Microdotlet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; **204**: 998-1000.

Thein S L, Wallace R B. The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders 1986: 33-50. In *Human genetic diseases: a practical approach* (Hrsg. K.E Davis) IRL Press Herdon, Virginia.

Thio C L, Thomas L T and Carrington M. Chronic Viral Hepatitis and the Human Genome. *Hepatology* 2000; **31**: 819-827.

Thorsby E. HLA Associated Diseases. *Human Immunology* 1997. **53**: 1-11.

Thorsby E. HLA-associated disease susceptibility. Which genes are primarily involved? *Immunologist* 1995; **51**: 3.

Tremmel M, Opelz G and Mytilineos J. High-resolution typing for HLA-DRB1*15 and -DRB1*16 by fluorescence-marked sequence-specific priming (TaqMan assay): *Tissues Antigens* 1999; **54**: 508-516.

Turner S, Ellexson-Turner M, Bennett T et al: Resolution of Ambiguous Class I Types using Reference Strand Conformational Analysis. Pei-Freez Clinical Systems, Brown Deer, Wi, 2000.

Uehara, H., G. Nardone, I.Nazarenko and R.J. Hohman. Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers:Comparison with gel-and ELISA-based detection. *Biotechniques* 1999: **26**: 552-558.

Voorter CE, Kik MC, van den Berg-Loonen EM. High- resolution HLA typing for the DQB1 gene by sequence-based typing. *Tissue Antigens* 1998: **51(1)**: 80-7.

Waßmuth R. Einführung in das HLA-System. Sonderdruck aus: Baenkler, Medizinische Immunologie, ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, Landsberg 1995.

Williams F, Mawhinney H, Middleton D. Application of an HLA-B PCR-SSOP typing method to a bone marrow donor registry. *Bone Marrow Transplant* 1997: **19(3)**: 205-8.

Lebenslauf

Personalien:

Name und Vorname: Tremmel, Matthias
Geburtsdatum: 02.10.68
Geburtsort: Speyer
Familienstand: ledig
Vater: Herbert Tremmel
Mutter: Ursula Tremmel, geb. Ullrich

Schulausbildung:

1975-1979 Siedlungsschule in Speyer
1979-1988 Gymnasium am Kaiserdom Speyer

Grundwehrdienst: 07/88-09/89

Studium:

10/89: Beginn des Chemiestudiums an der Universität Kaiserslautern
01/93: Vordiplom Chemie
04/1996-02/1997: Diplomarbeit am DKFZ Heidelberg in der Arbeitsgruppe
Biochemie der gewebsspezifischen Regulation: Effekte von
Ceramid und Lipopolysaccharid (LPS) auf die Proliferation und
NO-Synthase-Expression von Keratinozyten
05/1997-05/2000: Promotion am Institut für Immunologie der Universität
Heidelberg, Abteilung für Transplantationsimmunologie:
Typisierung von HLA-Klasse-II-Merkmalen mittels des
TaqMan-Verfahrens

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer danke ich für die Betreuung der Dissertation an der Universität Kaiserslautern, sein Interesse an dieser Arbeit, sowie seine stete Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med Gerhard Opelz, für die Überlassung des Themas, sowie den gewährten Freiraum bei der Gestaltung der Arbeit. Ferner die wohlwollende Unterstützung bei der Teilnahme nationaler wie internationaler Konferenzen, bei denen ich Teile meiner Dissertation vorstellen konnte, sowie weitere wichtige Anregungen sammeln konnte.

Herrn Dr. med Joannis Mytilineos danke ich für die freundschaftliche Betreuung, die fortwährende Gesprächsbereitschaft und wertvolle Anregungen für die vorliegende Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des DNA-Labors, insbesondere Herrn Uli Christ für viele Ratschläge PCR-technischer Art und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Transplantationsimmunologie für die freundliche Aufnahme und Frau Dr. Andrea Watzlik und den Herren Christian Kleist und Dr. med Christoph Dufter für ihre Hilfsbereitschaft und vielseitige Unterstützung danken.