Aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universität Ulm

(Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Hubert Schrezenmeier)

Hochauflösende Typisierung von HLA-DQB mittels Sequenzanalyse

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der

Universität Ulm

vorgelegt von

Karl Christian König

geboren in Schwabach

Ulm 2014

Amtierender Dekan: Herr Professor Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Herr Professor Dr. Hubert Schrezenmeier

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. Marion Schneider

Tag der Promotion: 15.01.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Die Humanen Leukozytenantigene (HLA) 1

1.2 Gewebetypisierung 10

1.3 Problemstellung und klinische Relevanz des HLA-DQ-Genorts 17

2 Material und Methodik 19

2.1 Material 19

2.2 Methodik 22

3 Ergebnisse 36

3.1 Sequenzierung von HLA-DQB1 36

3.2 Primermixe für die Amplifikation 36

3.3 Sequenzierprimer 40

3.4 Vorversuche zur entwickelten HLA-DQB-Nachweisreaktion mittels Sequence-Base-Typing 44

3.5 Validierungen des Sequenzieransatzes 50

4 Diskussion 60

4.1 Molekularbiologische Nachweismethoden im Vergleich 60

4.2 Sequenzanalyse 61

4.3 Validierung 65

4.4 Klinische Relevanz 66

4.5 Ausblick - Next Generation Sequencing (NGS) 67

5 Zusammenfassung 70

6 Literaturverzeichnis 71

Anhang 75

Danksagung 83

Lebenslauf 84

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
C	Cytosin
Da	Dalton, nicht SI-konforme Masseeinheit
dATP	Desoxy-Adenin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin- Triphosphat
ddATP	Didesoxy-Adenosin- Triphosphat
ddCTP	Didesoxy-Cytosin- Triphosphat
ddGTP	Didesoxy-Guanosin- Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-Triphosphat
ddTTP	Didesoxy-Thymin- Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanin- Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphophat
dTTP	Desoxy-Thymin- Triphosphat
G	Guanin
g	Beschleunigung, 1g entspricht 9,81m/s²
GVHD	Graft versus host disease
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Interferon
M	molar(Adjektiv zu Molarität = Stoffmengenkonzentration in mol/L)

$MgCl_2$	MagnsiumChlorid
MHC	Major histocompatibility complex
MLC	gemischte Leukozytenkultur
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-SSO	PCR-Sequence Specific Oligonucleotides
PCR-SSP	PCR-Sequence Specific Primers
SBT	Sequence Based Typing
SDS	Sodium Dodecylsulfat
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
Tm	Schmelztemperatur
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Die Humanen Leukozytenantigene (HLA)

1.1.1 Allgemein

Die humanen Leukozyten Antigene sind wichtige Oberflächenmarker menschlicher Zellen im Rahmen immunologischer Körperfunktionen, deren Gene zum sogenannten Major Histocompatibility Complex (MHC) gehören, einer Gruppe von hochpolymorphen Genen auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nummer 6 [33]. Im Rahmen von Transplantationen haben diese Oberflächenmarker besondere Bedeutung erhalten, da sie entscheidend sind für Transplantatüberleben, Abstoßungsreaktionen und mögliche Graft versus Host Erkrankungen [11,14,19,23,24,25,26,30,32,33]. Daher hat die genaue Typisierung der HLA-Antigene von Spender und Empfänger, speziell bei Knochenmark- und Stammzelltransplantationen entscheidende Bedeutung für den Erfolg der Transplantation erlangt. Hierbei haben die HLA-Antigene, welche man generell in zwei Klassen einteilt, eine unterschiedliche Wichtigkeit was mögliche klinische Konsequenzen nach einer Transplantation angeht. So spielen insbesondere die HLA-Klasse II Merkmale, vor allem bei Knochenmarktransplantationen, eine sehr wichtige Rolle [5,11,24,25]. Infolge dessen bedarf es einen besonders präzisen Nachweis der HLA-Klasse II Merkmale vor einer möglichen Knochenmarktransplantation. Allgemein gibt es unterschiedliche Nachweismethoden mit jeweils unterschiedlicher Genauigkeit und Präzision. Zu den genauesten Nachweisverfahren gehört mittlerweile der direkte Gen-Nachweis mittels Sequenzanalyse, welcher bereits fester Bestandteil in der Routinediagnostik geworden ist [33].

1.1.2 Funktion der HLA

Die humanen Leukozyten Antigene dienen der Antigenpräsentation und der Unterscheidung von eigenem und nicht eigenem Gewebe. Sie spielen damit eine entscheidende funktionelle Rolle vor allem im Bereich der spezifischen und zellvermittelten Immunität. Dabei präsentiert HLA Klasse I auf der Oberfläche von allen kernhaltigen Körperzellen endogene bzw. intrazelluläre Proteine CD8+ T-Zellen, den sogenannten T-Killerzellen. HLA Klasse II präsentieren überwiegend exogene bzw. extrazelluläre Proteine CD4+

T-Zellen, den sogenannten T-Helferzellen. Sie werden von verschiedenen Zellen, die hauptsächlich an der Immunabwehr beteiligt sind, wie B-Lymphozyten, dendritische Zellen, epidermale Langerhanszellen, vaskuläre Endothelzellen u.a., exprimiert. Dies ist nötig, da T-Lymphozyten nicht in der Lage sind, freies gelöstes Antigen zu erkennen.

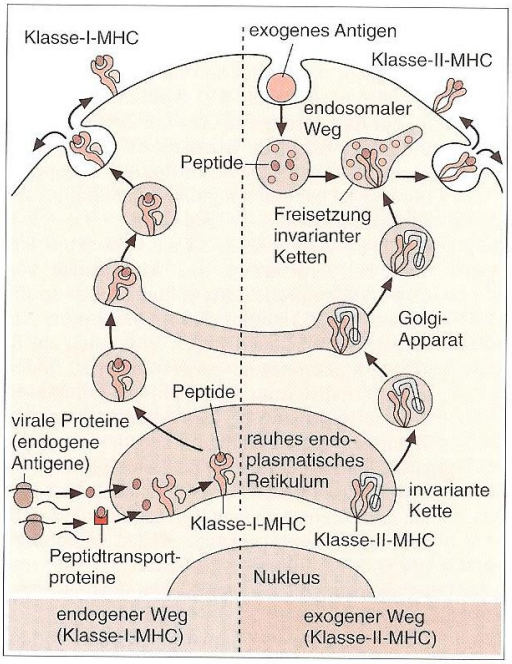


Abbildung 1: Expression und Antigenprozessierung von humanen Leukozyten Antigen Molekülen der Klasse 1 und 2

MHC = Major Histability Complex; Links ist der endogene Weg der Antigenprozessierung und Expression über Klasse-I-Major Histability Complex Antigene dargestellt. Hier binden intrazellular hergestellte, endogene, virale Antigene im rauen endoplasmati-schen Retikulum mit Humanen Leukozyten Antigenen der Klasse I, welche anschließend zur Zelloberfläche transportiert und exprimiert werden. Rechts ist der exogene Weg der Expression und Antigenprozessierung mit Humanen Leukozyten Antigenen der Klasse II dargestellt. Exogene Antigene werden in die Zelle aufgenommen, prozessiert und binden mit Humanen Leukozyten Antigenen der Klasse II. Diese werden dann an der Zelloberfläche exprimiert; aus Gemsa, Kalden, Resch, Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis, Thieme 4. Auflage 1997, S.37

1.1.3 Nomenklatur und Polymorphismus des HLA-Systems

Derzeit sind etwa 11846 HLA-Allele der diversen HLA-Gene bekannt (IMGT/HLA Database 2014, WHO Nomenclature Committee)[16]. Allele sind Varianten eines bestimmten Gens, die durch eine Punktmutation entstanden sind, die zu einer funktionsfähigen Veränderung im Phänotyp führt. Das Phänomen der Punktmutationen, die zu neuen Allelen eines

Gens führen, bezeichnet man als Polymorphismus. Speziell für die HLA-DQ-Gene sind 52 HLA-DQA1 und 664 HLA-DQB1 Allele bekannt [17]. Zur korrekten Bezeichnung eines Allels wird zuerst sein Genort, z.B. HLA-DQB1, angegeben. Anschließend wird eine zweistellige Zahl für die Allel-Hauptgruppe angeschlossen, z.B. 03, welche nach molekularbiologischem Nachweis durch ein *-Zeichen von der Genortbezeichnung getrennt wird, also z.B. HLA-DQB*03. Bei der Bezeichnung durch serologischen Nachweis erfolgt keine Trennung von Genort und Allel-Hauptgruppe durch ein *-Zeichen, z.B. HLA-DQ3. Es können noch weitere Ziffern angehängt werden für nachgewiesene Untergruppen. Die Gruppen und Untergruppen werden gemäß dem WHO Nomenclature Comittee seit 2011 jeweils durch einen Doppelpunkt getrennt, z.B. HLA-DQB*03:01 [16].

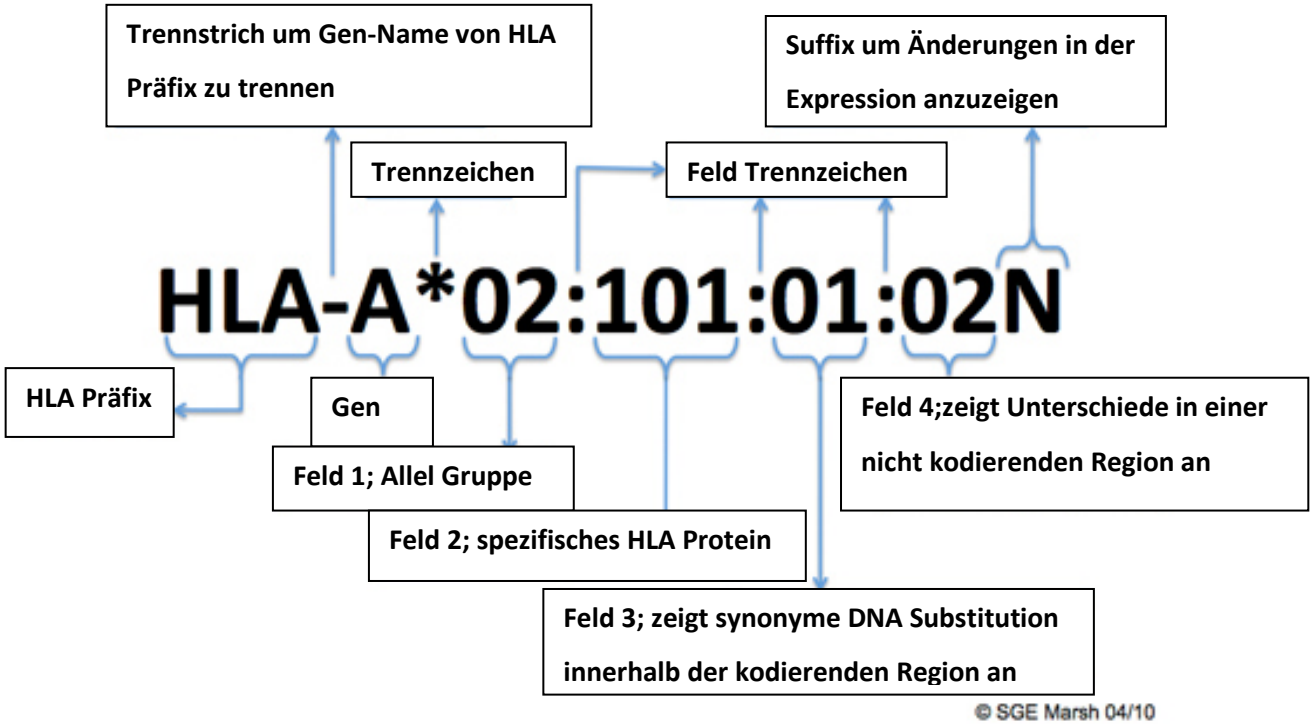


Abbildung 2: Darstellung der humanen Leukozyten Antigen-Nomenklatur

HLA = Humane Leukozyten Antigene; IMGT/HLA-Database 2014: HLA Nomenclature, Nomenclature for Factors of the HLA System; Vorne steht ein Humane Leukozyten Antigen Präfix welches durch einen Trennstrich von der Genbezeichnung getrennt wird, welche wiederrum durch ein sternförmiges Trennzeichen von Feld 1 für die Allelgruppenbezeichnung getrennt ist. Dieses ist seinerseits durch ein Feldtrennzeichen von Feld 2 getrennt, welches für das spezifische Humane Leukozyten Antigen Protein steht. Feld 3 zeigt synonyme DNA Substitutionen innerhalb einer kodierenden Region an und schließt sich nach einem weiteren Feld Trennzeichen an Feld 2 an. Feld 4 wird nach dem gleichen System an Feld 3 angeschlossen und zeigt Unterschiede in einer nicht kodierenden Region an. Am Ende schließt sich direkt ohne Trennzeichen ein Suffix an, um Änderungen in der Expression anzuzeigen.

1.1.4 Molekulare Struktur der Humanen Leukozyten Antigene

Die molekulare Struktur der HLA Klasse I Antigene besteht aus einem Glykoprotein-Heterodimer. Dieses wird aus einer schweren α-Kette mit einem Gewicht von etwa 45 kDa und einer leichten Kette, dem β 2 Mikroglobulin, welches auf Chromosom Nummer 15 kodiert ist, gebildet. Die schwere α-Kette ist aus drei extrazellulären Domänen (α 1-3), zu je ungefähr 90 Aminosäuren, einer transmembranösen Domäne und einer zytosolischen Region aufgebaut. Die α1 und α2 Domänen bilden die Antigenbindungsstelle. Sie formen dabei einen Boden aus einer 8 strängigen β- Faltblattstruktur die von zwei α-Helices umrandet wird. Die so gebildete Grube birgt Raum für ein etwa 9-11 Aminosäuren großes Peptid. Vier Stränge der β-Faltblattstruktur sowie eine α-Helix wird jeweils von einer Domäne, α1 oder α2, gebildet. Die Genabschnitte die diesen Bereich kodieren sind hochpolymorph, was die Bindungsmöglichkeit möglichst vieler verschiedener Antigene erhöht[1,33].

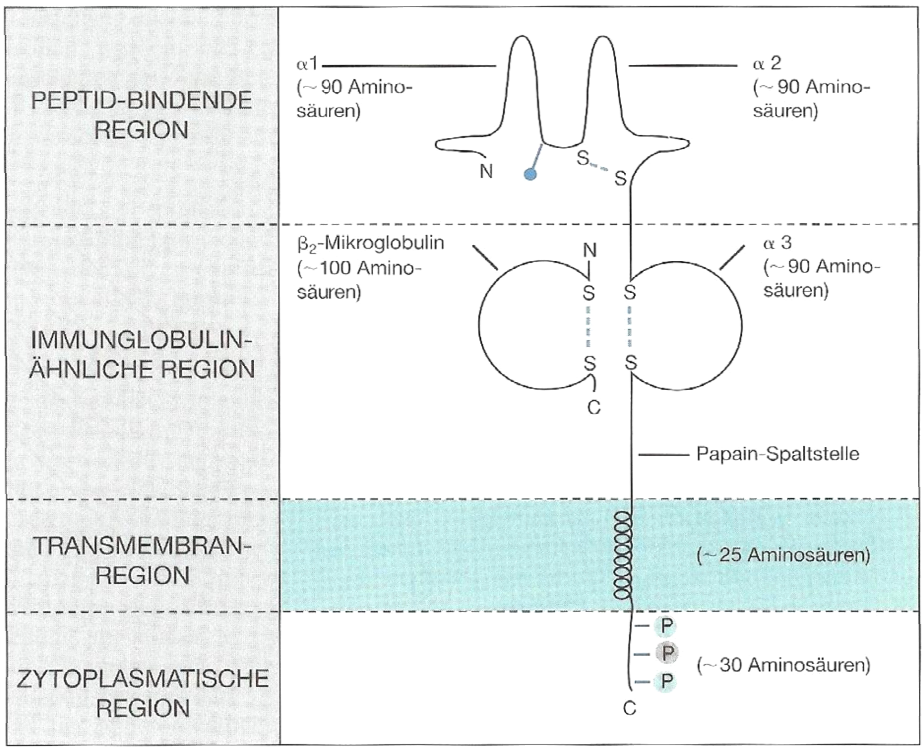


Abbildung 3: Molekulare Struktur der humanen Leukozyten Antigene der Klasse I

α1-3 = Aminosäureketten, N = Aminoterminles Ende , C = Carboxy-Ende der Polypeptidketten, S--S = Disulfidbrücken, -P = Phosphorylierungsstellen; aus Abbas, Lichtman, Pober , Immunologie, Hans Huber Verlag 1996, S.131

Die HLA Klasse II Merkmale bestehen ebenso aus einem Glykoprotein Heterodimer mit einer schweren α–Kette, mit etwa 33-35 kDa, und einer leichteren β-Kette mit etwa 26-29 kDa, die aber beide auf Chromosom Nummer 6 kodiert sind. Sie bestehen beide jeweils aus zwei extrazellulären Domänen, α1/2 und β1/2, sowie jeweils aus einer transmembranösen Domäne und einer zytosolischen Region [1,33].

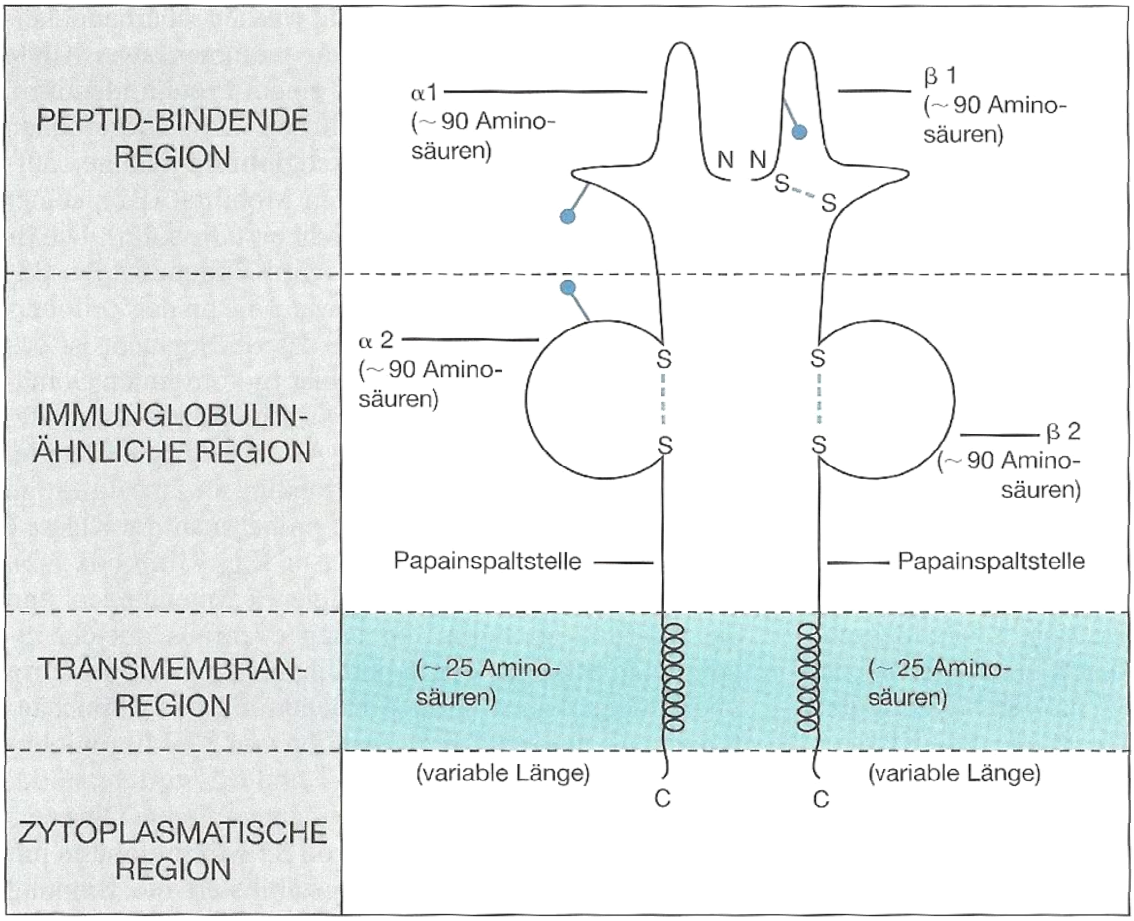


Abbildung 4: Molekulare Struktur humanen Leukozyten Antigene der Klasse II

α1-2 und β1-2 = Aminosäureketten, N = Aminoterminles Ende , C = Carboxy-Ende der Polypeptidketten, S--S = Disulfidbrücken, -P = Phosphorylierungsstellen; aus Abbas, Lichtman, Pober , Immunologie, Hans Huber Verlag 1996, S.134

Die Antigenbindungsstelle ist sehr ähnlich aufgebaut, wie die des HLA Klasse I Moleküls. Sie wird aus den extrazellulären Domänen α1 und β1 gebildet. Diese Regionen sind analog zu der von HLA Klasse I hochpolymorph. Die Bindungstelle wird auch aus einer acht strän-

gigen β-Faltblattstruktur als Boden und zwei α-Helices als Umrandung gebildet. Die jeweilige Aufteilung durch die α1 und β1 Domäne ist vergleichbar mit dem HLA Klasse I Molekül. Anders als bei diesem Molekül sind jedoch hier die α-Helices nicht geschlossen, was die Aufnahme größerer Peptide von etwa 15-24 Aminosäuren erlaubt [1,33].

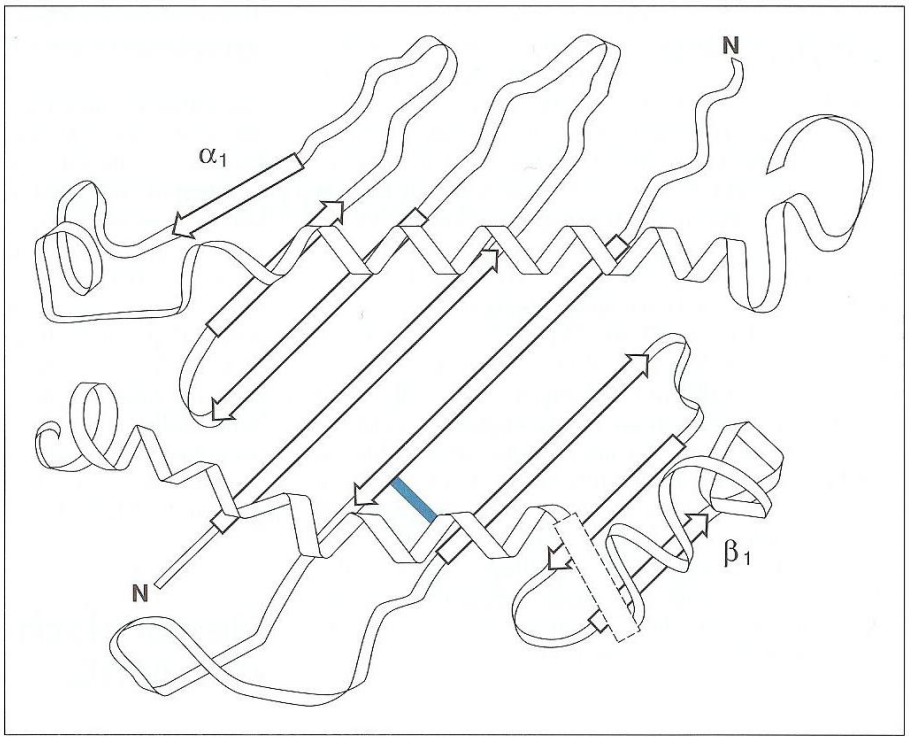


Abbildung 5: Faltblattstruktur der Antigenbindungsstelle der humanen Leukozyten Antigene der Klasse II

Weiße Pfeile entsprechen Polypeptidketten mit ß-Faltblattstruktur, weiße Spiralen entsprechen Polypeptidketten mit α-Helix Struktur, blauer Balken entspricht Disulfidbrücke; aus Abbas, Lichtman, Pober, Immunologie, Hans Huber Verlag 1996, S.135

1.1.5 Genetik des MHC

1.1.5.1 genomische Organisation des MHC

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) besteht aus drei Gengruppen, die als HLA-Klasse I-III bezeichnet werden. Sie liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nummer

6, wobei der Komplex etwa 3500 kBasen lang ist. Die Gene, die für HLA-Klasse I Antigene kodieren, liegen dabei am weitesten telomerwärts. Sie setzen sich aus den Genen HLA-A, -B und –C, welche für die antigenpräsentierenden Oberflächenproteine kodieren, zusammen. Alle drei werden auf menschlichen Zelloberflächen kodominant exprimiert , was bedeutet, dass für jedes Gen (A,B oder C),in jedem Individuum zwei verschiedene Allele vorliegen , eins jeweils von der Mutter und eins vom Vater vererbt. Es gibt noch weitere HLA-Klasse I Gene, von denen HLA-E, -F und -G auch funktionell aktiv sind. HLA-E unterscheidet sich deutlich von HLA-A,-B und -C Genen, wird auf der Zelloberfläche fast jeder Körperzelle exprimiert, ist am wenigsten polymorph und dient als Ligand für Rezeptoren von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. HLA-G wird auf extravillösen Trophoblastenzellen exprimiert und spielt eine Rolle in der mütterlichen Toleranz des Semi-allogenen Embryo/Fetus während der Schwangerschaft. Weitere gefundene Gene im Bereich der Klasse I Antigene scheinen sogenannte Pseudogene zu sein, denen noch kein Genprodukt zugewiesen werden konnte.

Die HLA Klasse II Gene liegen am weitesten zentromerwärts. Zwischen ihnen und den Klasse I Genen liegen die sogenannten Klasse III Gene, eine Gruppe von Genen die unterschiedliche Proteine kodieren, u.a. Komplementfaktoren und Hitzeschockproteine. Die HLA-Klasse II Gene setzen sich aus mehreren Subregionen zusammen. Generell werden sie mit HLA-D bezeichnet wobei sich ein Buchstabe für die Subregion anschließt, im einzelnen HLA-DR, -DQ, -DP sowie -DM und -DO. Ein weiterer Buchstabe schließt sich für die jeweils kodierte Kette an. Dabei steht ein A für die α-Kette und ein B für die β-Kette aus denen sich das Molekül zusammensetzt, z.B. DRA und DRB bzw. DQA und DQB. Der HLA-DR Genkomplex besteht aus einem wenig polymorphen Gen für die α-Kette (-DRA) und mehreren hochpolymorphen Genen für die β-Kette (-DRB1-9), wobei nur die Gene HLA-DRB1,-DRB3,-DRB4 und -DRB5 exprimiert werden. Die anderen sind Pseudogene.

Der HLA-DQ Genkomplex besteht aus jeweils zwei α und β Kettengenen, DQA1 und DQB1, sowie DQA2 und DQB2. Bei DQA2 und DQB2 handelt es sich um Pseudogene mit niedrigem Polymorphismus. Die eigentlichen Gene DQA1 und DQB1 sind hochpolymorph.

Der HLA-DP Genkomplex hat einen mit der HLA-DQ Region vergleichbaren Aufbau. Die Genprodukte von HLA-DM und -DO bilden ebenfalls ein Heterodimer aus einer α- und

einer β-Kette und sind an der Peptidantigenbeladung der vorher erwähnten Klasse II Antigene beteiligt.

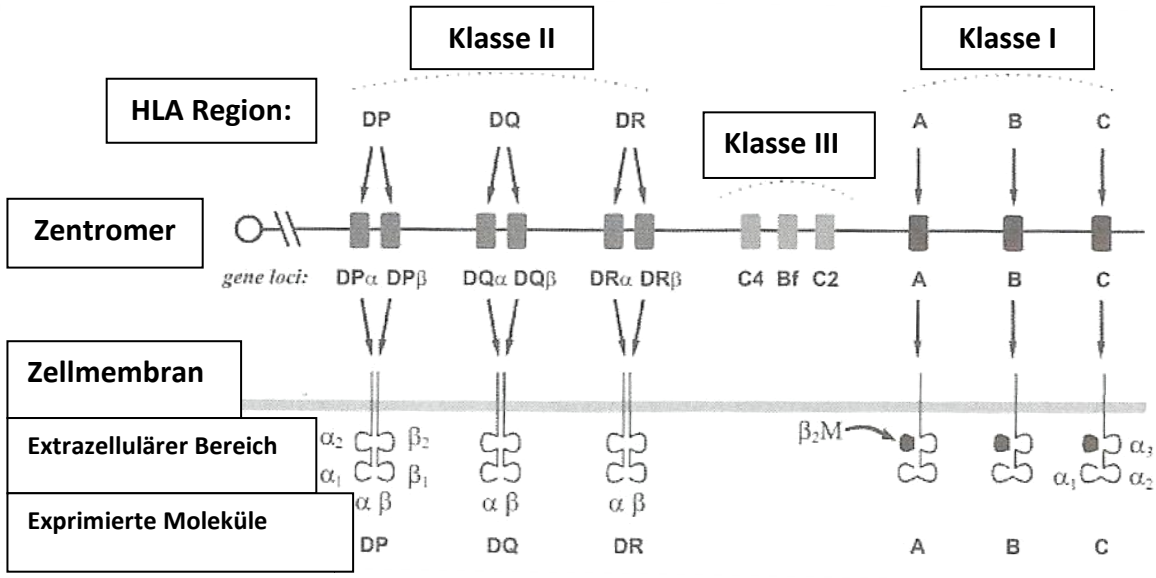


Abbildung 6: Struktur des Major Histocompatibility Complex auf Chromosom Nr. 6

Oben Aufbau Chromosom Nr.6, unten zu den Genen korrespondierende Oberflächenantigene, α1-3 und β1-2 = Aminosäureketten, HLA-Region = Region der humanen Leukozyten Antigene ; aus Wassmuth ,Primer on the HLA-System, Basic Concepts - Medical Relevance-Laboratory Methods-Quality Management, Ecomed Medizin 2010, S.11

1.1.5.2 genomische Organisation einzelner HLA Gene

Die Exon-Intron-Organisation, also der Aufbau des Gens, der einzelnen Klasse I und II Gene ist sehr ähnlich. HLA Klasse I Gene bestehen durchschnittlich aus 3500 Basenpaaren mit acht kodierenden Regionen für die α-Kette, den sogenannten Exons , die jeweils durch nichtkodierende Sequenzen, den Introns, voneinander getrennt sind [33]. Dabei kodiert das Exon 1 immer für ein Signalpeptid in der Aminosäurenkette, welches das entstandene Protein zum endoplasmatischen Retikulum führen soll. Dieses Signalpeptid ist im Reifen Protein nicht mehr enthalten. Die extrazellulären Domänen der α-Kette der Klasse I (α1, α2, α3), der α-Kette der Klasse II (α 1 und α 2) und der β-Kette der Klasse II (β1 und β2) Moleküle werden jeweils von einem eigenen Exon kodiert. Dabei werden die α1 und α2 Domäne der α-Kette der Klasse I und II Moleküle von Exon 2 und 3 des entsprechenden Gens kodiert. Die Antigenbindungstelle wird im HLA-Klasse I Antigen von den α1

und 2 Domänen der α-Kette gebildet, im HLA-Klasse II Antigen von der α1 Domäne der α-Kette und der β1 Domäne der β-Kette. Da im Bereich der Antigenbindungsstelle der höchste Polymorphismus vorliegt, liegen die Polymorphismen der HLA-Klasse I Gene für die α-Kette hauptsächlich im Bereich von Exon 2 und 3 und bei HLA Klasse II Genen hauptsächlich im Exon 2. Deswegen ist zur Analyse eines Gens und seiner Allele speziell die Untersuchung dieser Bereiche wichtig. Die anschließenden transmembranösen und intrazytoplasmatischen Domänen werden ebenfalls von einem oder mehreren Exons kodiert.

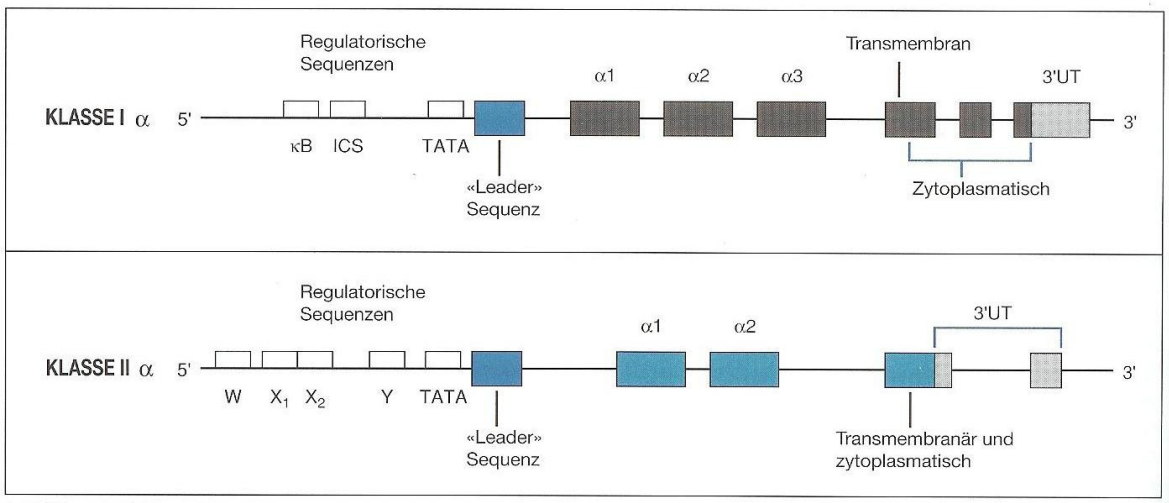


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Exon-Intron Struktur der humanen Leukozyten Antigene der Klasse I und II

Oben ist das Gen der α-Kette des Humanen Leukozyten Antigens der Klasse I, unten dass des Humanen Leukozyten Antigens der Klasse II schematisch dargestellt. Rechtecke zeigen kodierende Regionen an. Dazwischen liegen nichtkodierende, sogenannte Intron-Regionen. „TATA" entspricht der TATA Box, einer Sequenz, als Teil der Promoter Region eines Gens an der Transkriptionsfaktoren Binden. „Leader Sequence" ist eine wichtige regulatorische Region im Rahmen von Translation und Transkription, α1-3 sind kodierende Exon-Regionen der Humanen Leukozyten Antigen Gene, welche für die jeweiligen α-Ketten der entsprechenden Antigene kodieren; aus Abbas, Lichtman, Pober , Immunologie, Hans Huber Verlag 1996,S.138

1.1.6 HLA Expression

Wie bereits oben besprochen, werden die unterschiedlichen HLA Merkmale auf verschiedenen Zellen exprimiert. Dabei hängt die Regulation der Expression zum einen von der zell- oder gewebespezifischen Art der Differenzierung ab, zum anderen wird die HLA-Ex-

pression durch exogene Immun- oder Entzündungsstimuli reguliert. Es sind vier Eigenschaften der Expression von Bedeutung:

1. Die konstitutive Expression der Klasse I und II Antigene ist unterschiedlich. Klasse I Antigene werden auf fast allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert, wogegen HLA Klasse II nur auf bestimmten Zellen, wie B-Lymphozyten, Langerhanszellen, u.a. exprimiert werden [1].
2. Die Transkriptionsrate entscheidet über die MHC Expression [1].
3. Transkription und Expression der verschiedenen HLA werden koordiniert reguliert. So wird das β2-Mikroglobulin auf Chromosom 15 gemeinsam mit der HLA-Klasse I α-Kette auf Chromosom 6 reguliert [1].
4. Zytokine regulieren die HLA Expression. Interferone wie IF-α, -β und -γ, sowie TNF-α u.a. verstärken die HLA-Klasse I Expression über Transkriptionsfaktoren. Dagegen wird die HLA Klasse II Expression allgemein durch IF-γ getriggert und durch Interleukin 10 herunter reguliert. Im Einzelnen reagieren vaskuläre Endothelzellen und epidermale Langerhanszellen, wie beschrieben, auf IF-γ mit verstärkter Expression von HLA Klasse II. Dendritische Zellen sind konstitutiv HLA Klasse II positiv und reagieren kaum auf Zytokine. B-Lymphozyten sind auch konstitutiv HLA II positiv, reagieren jedoch auf Zytokine durch eine entsprechend gesteigerte Expression [1].

1.2 Gewebetypisierung

Zum Nachweis von HLA gibt es verschiedene Verfahren mit unterschiedlicher Genauigkeit. Die heute gängigen Nachweismethoden sind der serologische-, der Antigen- und der molekularbiologische DNA Nachweis.

1.2.1 Serologischer Nachweis

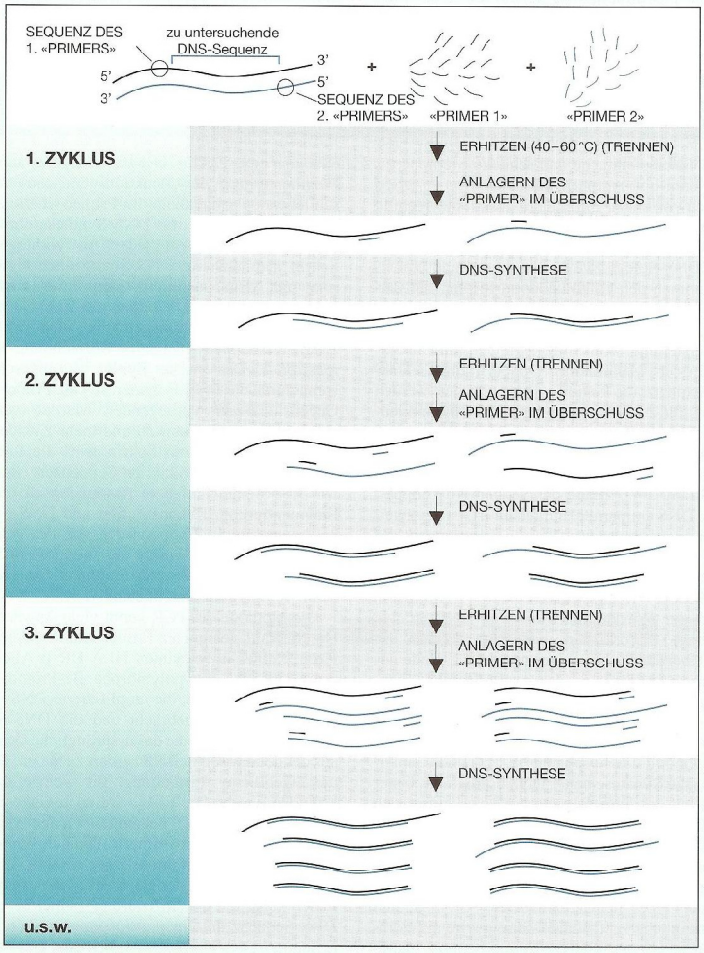
Der serologische Nachweis basiert auf dem Prinzip der Komplement vermittelten Zelllyse. Hierbei werden zu testende, vorher isolierte, Lymphozyten mit speziellen Anti HLA antikörperhaltigen Seren inkubiert. Anschließend wird Komplement hinzu gegeben, was bei vorheriger Antikörperbindung auf den Lymphozyten im positiven Falle zur Lyse der Zellen

führt. Daraufhin können die lysierten Zellen mittels Eosinfärbung spezifisch dargestellt werden. Dabei hat dieses Nachweisverfahren entscheidende Mängel. Es ist abhängig von einer genügenden Expression von HLA auf der Zelloberfläche, was bei Patienten mit hämatoonkologischen Erkrankungen oder unter immunsuppressiver Therapie nicht gewährleistet sein kann, da es hier oft zu einer verminderten Expression von HLA kommt [33,34]. Desweiteren führt eine Chemotherapie oft zu Zytopenie, wodurch die Gewinnung der zu testenden Zellen erschwert wird [3,33]. Bei Patienten mit terminaler Nierenerkrankung ist die Qualität der Lymphozyten deutlich vermindert, was die Testbedingungen ebenfalls erschwert [29,33]. Zuletzt ist die Auflösung dieses Testverfahrens recht gering. Das bedeutet, dass manche durch molekularbiologische Verfahren nachgewiesene Allele mit einem serologischen Test nicht nachzuweisen sind.

1.2.2 Molekularbiologische Nachweismethoden

Die molekularbiologischen Nachweismethoden gehören zu den neuesten und genauesten Nachweisverfahren und unterscheiden sich von der serologischen Analysemethode durch die Tatsache, dass jetzt nicht mehr der Phänotyp bzw. das Genprodukt nachgewiesen wird, sondern der Genotyp, also das Gen selbst. Den Durchbruch in der Genanalyse brachte die Einführung der Polymerase Ketten Reaktion (PCR). Auf dem Grundprinzip der PCR bauen heutzutage mehrere molekularbiologische Nachweismethoden auf. Allgemein ist die PCR eine enzymatische Methode um bestimmte Gene zu kopieren, damit diese in anschließenden Nachweisreaktionen dargestellt werden können. Das Grundprinzip beruht also auf einer möglichst hohen Vervielfältigung des Ziel-Gens. Dabei wird initial die Proben-DNA durch Denaturierung bei ca. 92-94°C in ihre Einzelstränge zerlegt, damit sich anschließend sequenzspezifische Primer an eine komplementäre Stelle der Einzelstrang-DNA anlagern können. Dieses sogenannte Annealing findet etwa bei 50-60°C statt. Das erfolgreiche Anlagern der Primer an die gewünschte Zielsequenz ermöglicht in der Folge die Anlagerung der DNA-Polymerase, die die gewünschte Sequenz vervielfältigen kann. Das dabei verwendete Enzym, die sogenannte Taq-DNA-Polymerase, ist ein thermostabiles Enzym, welches aus dem thermophilen Organismus Thermus aquaticus stammt. Die Verlängerung des DNA-Stranges, oder die Primerextension, durch die Taq-Polymerase

wird bei ca. 72°c durchgeführt. Bei diesem ersten Zyklus entstehen somit zwei neue DNA-Stränge. Mit jedem weiteren Zyklus verdoppelt sich diese Zahl, so dass die Menge an amplifizierter DNA exponentiell mit den durchgeführten Zyklen steigt. Bei einer PCR werden üblicherweise 20-30 solcher Zyklen durchgeführt. Der Erfolg dieser Methode beruht auf der Auswahl der richtigen Gen- oder Allel spezifischen Primer, der Menge und Qualität der Proben-DNA, der Menge an Magnesium, welches von der Taq-Polymerase als Co-Enzym benötigt wird, und den gewählten Temperaturen des PCR-Programmes. Je höher die Menge der amplifizierten Ziel-DNA ist, desto niedriger ist die Gefahr das andere Sequenz-homologe DNA Abschnitte, die nicht nachgewiesen werden sollen, zu Hintergrund Störsignalen beim Nachweis führen. Mittlerweile haben sich unter Anderem drei wichtige PCR basierte HLA-Nachweismethoden entwickelt, die PCR-SSO, die PCR-SSP und die PCR-SBT.



Links graphische Darstellung der Polymerase-Ketten-Reaktion

Oben zu untersuchende DNA Sequenz dargestellt mit den potentiellen Ansatzstellen des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers, Primer 1 und 2. Die Einzelnen Stränge der DNA sind in Abhängigkeit von ihrer Orientierung schwarz und grau dargestellt. Die jeweiligen Primer sind daneben dargestellt. Im ersten Zyklus wird die DNA erhitzt und dadurch aufgetrennt. Anschließend kommt es zum Anlagern der Primer an die DNA-Einzelstränge. Danach kommt es zur DNA-Synthese und somit zur Bildung neuer Doppelstrang-DNA, welche im nächsten Zyklus erneut aufgetrennt wird. Durch die Wiederholung der Zyklen wird die Proben-DNA vervielfältigt.

Abbildung 8: Prinzip der Polymerase Ketten Reaktion

Aus Abbas, Lichtman, Pober , Immunologie, Hans Huber Verlag 1996, S.140

PCR-SSO

Bei der PCR-SSO Methode wird ein nachzuweisendes Gen mittels Gen spezifischer Primer amplifiziert. Um die verschiedenen Allele des untersuchten Gens zu analysieren, kommen anschließend sequenzspezifische Oligonukleotidsonden (SSO) zum Einsatz, welche, sofern das gesuchte Allel vorhanden ist, mit dem komplementären Teil des entsprechenden Amplifikates hybridisieren. Nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Sonden werden über mehrere Waschgänge wieder entfernt. Die positiven Hybridisierungen werden durch ein nichtradioaktives Verfahren farblich dargestellt. In den letzten Jahren hat sich die Bead Array-SSO Variante unter anderem auch zur Analyse von HLA-DQB durchgesetzt [4,18]. Hier sind die sequenzspezifischen Sonden, sogenannte Oligos, an Mikrokügelchen (Beads) gekoppelt, welche nach Hybridisierung mit dem gelabelten PCR-Produkt durch zwei Fluoreszenzfarbstoffe im Luminex-Durchflusszytometer nachgewiesen werden können. Nachteile dieses Verfahrens sind unter anderem, dass nur Allele nachgewiesen werden können, für die entsprechende Gensonden existieren. So ist es mit diesem Verfahren nicht möglich neue Allele zu finden. Des weiteren ist die Hybridisierungseffizienz der einzelnen Sonden unterschiedlich, was sich im Test negativ bemerkbar machen kann. Zusätzlich kann es im Rahmen der Reaktionen zu Rehybridisierungen der Ziel-DNAs kommen [33].

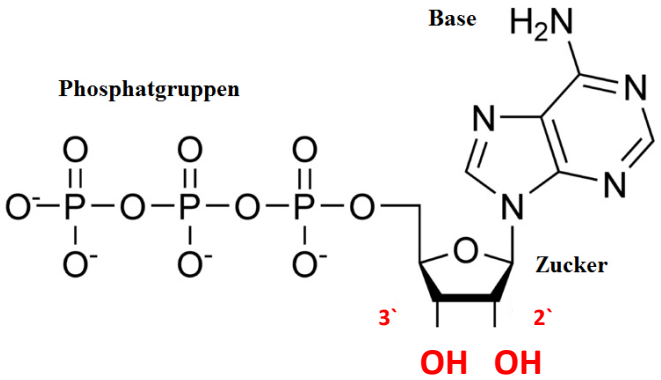
PCR-SSP

Das Prinzip der PCR-SSP beruht auf sequenzspezifischen Primern, welche von vornherein nur bestimmte Allele eines Gens amplifizieren. Nicht komplementäre Primer binden nicht und es wird entsprechend kein Amplifikat gebildet. Die erfolgreich gebildeten Amplifikate werden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese nach vorheriger Färbung mit Ethidiumbromid dargestellt. Der Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zur PCR-SSO ist, dass keine zweite Hybridisierungsreaktion nach der PCR notwendig ist, um die verschiedenen Allele eines Gens nachzuweisen[33].

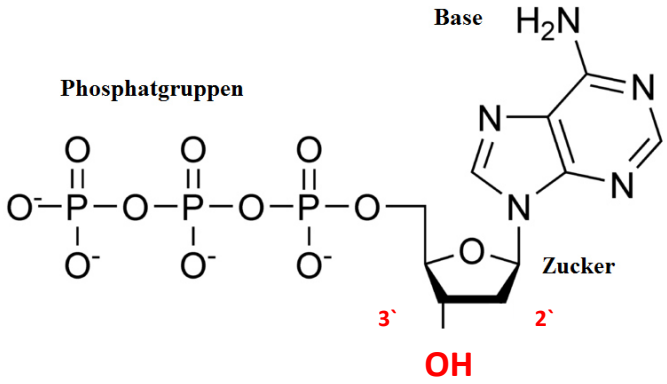
PCR-SBT

Die DNA Sequenzanalyse stellt das derzeit zwar aufwendigste, aber auch modernste, zuverlässigste und genaueste Nachweisverfahren mit der höchsten Auflösung zum Nachweis bestimmter Gene und deren Allele dar [5,6,9,11,33].

Das Grundprinzip basiert auf der Strangabbruchs- oder Didesoxynukleotidmethode nach Sanger (Sanger et al .1977). Hier wird in einem zur PCR vergleichbaren Verfahren das ursprüngliche Amplifikat aus der initialen PCR sequenziert und dessen Basenabfolge analysiert. Die vorher amplifizierte Proben-DNA dient als Matrize zur Synthese neuer unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Die Sequenzierreaktion beginnt mit dem Denaturieren der amplifizierten DNA, damit wieder Einzelstränge für die Folgereaktionen vorliegen. Anschließend wird der zu untersuchende Einzelstrang mit einem Sequenzierprimer hybridisiert, damit sich die DNA-Polymerase zur Strangverlängerung anlagern kann. Es wird ein zur Matrize komplementärer Strang durch die DNA-Polymerase synthetisiert. Zur Durchführung dieser Sequenzierreaktion werden vier Mikroreaktionsgefäße benötigt, in denen die Sequenzierreaktionen parallel ablaufen. In jedem Reaktionsgefäß ist die Matrizen-DNA, der Sequenzierprimer, alle vier Desoxynukloetidtriphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), und jeweils ein Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP)enthalten. Dem ddNTP fehlen dabei zwei Hydroxygruppen. Eine davon ist die zweite Hydroxygruppe am Kohlenstoffatom des 3´-Endes des Zuckermoleküls des Nukleotides. Dies hat zur Folge das weitere Nukleotide nicht mehr mit ihrer Phosphatgruppe an ihrem 5´-Ende mit dem 3´-Ende des vorhergehenden Nukleotides binden können, was zum Strangabbruch während der Synthese führt.

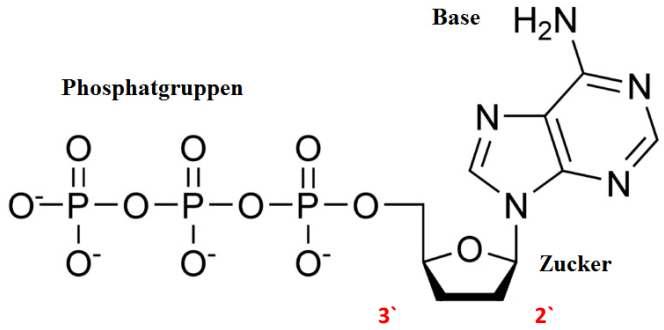


Adenosintriphosphat (ATP)



Desoxynukleotid (dATP)

Entfernte Hydroxygruppe an 2´ Position des Zuckermoleküs



Didesoxynukleotid (ddATP)

Entfernte Hydroxygruppen an den Positionen 2´und 3´des Zuckermoleküls

Abbildung 9: Zustandsformen der Nukleotide

Die ddNTPs werden während der Sequenzierreaktion nach dem Zufallsprinzip von der DNA-Polymerase in die neue Sequenz eingebaut, wodurch DNA-Stränge unterschiedlicher Länge entstehen, die immer mit dem für das jeweilige Reaktionsgefäß gewählten ddNTP (z.B. ddATP) enden. Durch die, mit der PCR vergleichbare, mehrfache Wiederholung der Reaktionszyklen entstehen in den vier Reaktionsgefäßen eine Vielzahl der unterschiedlich langen DNA-Stränge, die anschließend mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Bei Analyse durch einen modernen Sequenzierautomaten geschieht die gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierprodukte des Reaktionsgefäßes in einer Kapillare. Die ddNTPs an den Enden der Sequenzen sind durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert

und können mit Laseranregungs-/Detektionssystemen dargestellt werden. Dabei werden nun die verschiedenen Positionen der vier Basen in dem zu untersuchenden Gen bzw. Allel genau analysiert. Die Laufweiten der verschieden langen fluoreszenzmarkierten DNA-Stücke in einer Kapillare geben dabei Auskunft über die Positionen einer bestimmten Base im gesuchten Gen oder Allel. Betrachtet man nun die ermittelten Positionen sämtlicher, unterschiedlich langer DNA-Stücke in einer Kapillare, welche jeweils mit einem der vier vorher erwähnten ddNTPs markiert sind, ergibt sich die gesuchte Basenabfolge [9,33]. Zur Auswertung der im Sequenzierautomaten ermittelten Basenabfolge gibt es heute verschiedene Programme , wie zum Beispiel den in unserem Institut verwendeten Sequence Pilot der Firma JSI-Medical Systems.

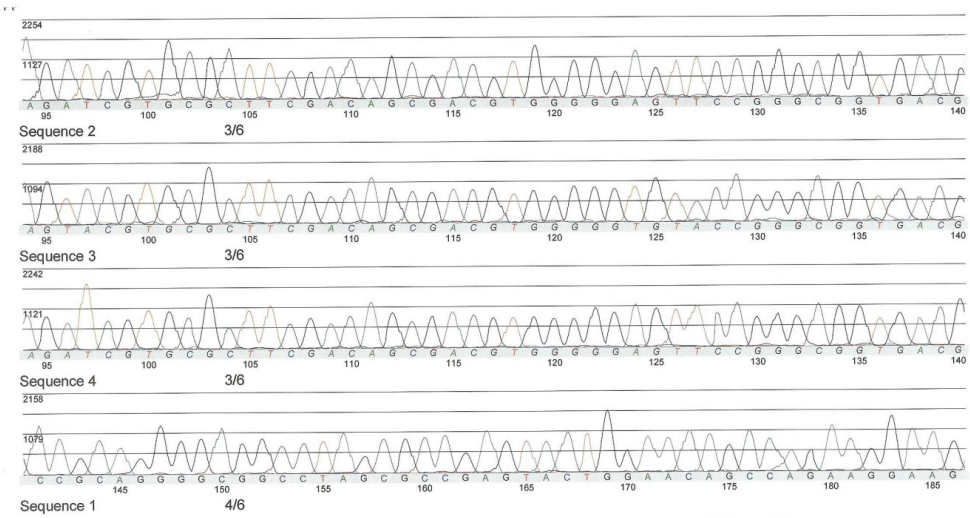


Abbildung 10: Ergebnissequenzen, Quelle: Sequence Pilot, JSI-Medical Systems

Generell gibt es bei der Sequenzanalyse zwei mögliche Vorgehensweisen bzw. Strategien.

1. Genort- oder Locusspezifische Sequenzierung.

Bei diesem Verfahren werden Sequenzierprimer verwendet, die mit allen bekannten Allelen eines gesuchten Genortes reagieren. Dabei werden die Allele beider Chromosomen sequenziert wodurch es bei der Sequenzanalyse zu vielen heterozygoten Stellen kommen kann. Das Problem hierbei ist die korrekte Zuordnung der Basen. So kann eine der beiden Basen einer heterozygoten Stelle sowohl dem ersten Strang bzw. Allel oder dem zweiten Strang bzw. Allel angehören, was zu teilweise deutlichen Unterschieden im Ergebnis füh-

ren kann [27]. Ein weiteres Problem kann das unterschiedliche Laufverhalten der Fragmente zweier Allele in der Gelelektrophorese sein, was die Auswertung weiter erschweren kann. Deswegen sollten bei dieser Verfahrensweise jeweils zwei Sequenzierprimer, ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer, eingesetzt werden [33].

2. Allelgruppenspezifische Sequenzierung

Bei diesem Verfahren werden spezielle Sequenzierprimer für jede Allelgruppe eingesetzt. Dadurch ergeben sich am Ende zwei homozygote Sequenzen eines gesuchten Gens. Bei diesem Verfahren ist eine Vortypisierung mittels PCR-SSP notwendig, andernfalls müsste eine Probe entsprechend mit allen für das jeweilige Gen zur Verfügung stehenden Sequenzierprimern sequenziert werden, da man sonst nicht wissen kann welcher allelgruppenspezifische Primer hier zum Einsatz kommen muss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Sequenzanalyse sämtliche bekannte Allele eines Gens analysiert werden können. Der große Vorteil der Genotyp- gegenüber der Phänotyp-Bestimmung ist, dass auch auf Zelloberflächen schwach exprimierte Spezifitäten, die trotzdem Einfluss auf das Transplantationsergebnis haben können, nachgewiesen werden können [34]. Desweiteren gibt es Polymorphismen der Allele, die sich auf der Molekülebene geringfügig von anderen unterscheiden, so dass diese mit Antikörpern nicht unterschieden werden können, obwohl sie einen Einfluss auf den Verlauf nach einer Transplantation nehmen können [32,23,24,25]. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist es, dass auch neue, bisher nicht bekannte, Allele nachgewiesen werden können.

1.3 Problemstellung und klinische Relevanz des HLA-DQ-Genorts

Um die derzeit beste Auflösung im Nachweis eines Gens oder dessen Allele zu bekommen muss dieses Gen mittels molekularbiologischer Nachweismethoden bestimmt werden. Darüber hinaus bietet im Bereich der molekularbiologischen Analyseverfahren die Sequenzanalyse die höchste Präzision. Im Rahmen von Studien- und Forschungsergebnissen wurde in den letzten Jahren der Zusammenhang von erfolgreichen Transplantationen, niedrigen Abstoßungsraten und dem HLA-Matching immer deutlicher

[6,11,14,23,24,25,26,30,32]. Dabei erkannte man, dass auch HLA Klasse II ebenso wie HLA Klasse I eine große klinische Bedeutung haben, vor allem bei allogenen Knochenmarktransplantationen und Blutstammzelltransplantationen im Rahmen der Therapie hämatologischer Erkrankungen, wie akute Leukämien [6,11,18,19,24,25,26]. Anders als bei Transplantationen solider Organe, sind die unter anderen aus den gespendeten Blutstammzellen hervorgehenden Leukozyten sowohl Träger von HLA Klasse I wie auch HLA Klasse II. Es zeigte sich hier, dass das Auftreten einer sogenannten Graft versus Host Reaktion, bei denen die Spenderleukozyten das Gewebe des Empfängers angreifen, mit dem Vorliegen eines HLA-Mismatches zwischen Spender und Empfänger korreliert. Auf Grund dessen stieg der Bedarf nach immer präziseren Bestimmungsmethoden, auch im Bereich von HLA Klasse II, stetig. Darüber hinaus kann der Nachweis von HLA Klasse II und speziell von HLA-DQB1 interessante Informationen zur Assotiation zwischen diesen Antigenen und gewissen Krankheiten geben. So konnte inzwischen ein Zusammenhang mit der Expression bestimmter HLA-DQB1 Allele und dem Auftreten bestimmter Krankheiten, wie u.a. Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose und Zöliakie, nachgewiesen werden [20,34]. Dabei führt die Expression eines bestimmten HLA-DQB1 Allels nicht zwangsläufig zu einer der genannten Erkrankungen, es konnte jedoch gezeigt werden, dass von diesen Krankheiten betroffene Personen überdurchschnittlich häufig Träger bestimmter HLA-DQB1 Allele sind [20,35].

HLA-DQB1 wird bislang überwiegend durch das PCR-SSP oder durch das PCR-Bead-Array-SSO Verfahren nachgewiesen. Diese Analysemethoden gehören zwar zu den hochauflösenden molekularbiologischen Verfahren, jedoch der Bedarf nach größtmöglicher Präzision führte zur Aufgabe den HLA-DQB1 Nachweis in Zukunft mittels der Methode mit der derzeit höchsten Auflösung, der automatisierten Sequenzanalyse, durchzuführen. Inhalt dieser Arbeit war nun die Entwicklung einer Analysemethode zur HLA-DQB1-Bestimmung mittels PCR-SBT. Diese Analysemethode sollte dabei möglichst kompatibel zu den bereits bestehenden HLA Klasse I Nachweisverfahren mittels PCR-SBT aus der Routinediagnostik des HLA-Labors der ulmer Transplantationsimmunologie sein.

2 Material und Methoden

Entwicklung eines HLA-DQB Typisierungsansatzes mittels Sequenzanalyse

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und -Materialien

* 96-Well Platte mit zugehörigen Deckeln
  Thermo-Fast 96®,Non-skirted AB-600,Fa. Abgene

* 96-Well Platte mit Barcode
  96-well optical reaction plate with barcode Part.No.4306737, Fa Applied Biosystems

* Abzugshaube
  mc6 Elektromodul, Fa. Waldner Laboreinrichtungen

* Achtkanalpipette Eppendorf Research (Mehrkanal), 0,5-10 µl,
  Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

* Becherglas
  Duran 800 ml Retrace code 01252001, Fa.Schott

* Combitips® plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
  0,5 ml Part.No. 003069.420
  0,1 ml Part.No. 003069.404

* Eisschrank
  Froster, Fa. Philipp Kirsch GmbH

* Elektrophoresekammer
  Prod. No. 501, Fa. Universitätsklinikum Heidelberg, Institut für Immunologie

* Stromversorgung Elektrophoresekammer
  Electrophoresis Power Supply EPS300, Fa. Pharmacia Biotech

* Eppendorfgefäß
  Reaktionsgefäße 3810x (1,5 ml) Prod. No. 0030125.150, Fa. Eppendorf

* Gummimatte für Verschluß der 96-Well Platten zum Sequenzieren
Septa(96) Prod. No. 625-2280, Fa. Applied Biosystems

* Kamera Polaroid MP4+ mit UV-Flächenstrahler,
Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg, Deutschland

* Filme für Polaroid: Fujifilm FP-3000B professional

* Kühlschrank
Super, Fa. Philipp Kirsch

* Mehrkanalpipette Research® 0-100µl,
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

* Mikrowelle

* Multipette® plus,
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

* PCR-Thermocycler
GeneAmp PCR Systems 9700, Applied Biosystems GmbH, Foster City, USA

* PCR-Thermocycler PTC-200,
MJ Research, Ltd., Watertown, MA, USA

* Pipette Eppendorf Research® (variabel) 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl,
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

* Pipettenspitzen
10µl Safe Seal Tips® premium, Fa. Biozym
100µl Safe Seal Tips® premium, Fa. Biozym
1000µl Safe Seal Tips® premium, Fa. Biozym

* Präzisionswaage
Scout Pro 2000g, Fa. Ohaus®

* Sequencer: 3730 DNA Analyzer,
Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland

* Sequenzauswertungsprogramm Sequence Pilot™ -HLA SBT Allele Identification Software
JSI Medical Systems GmbH, Kippenheim, Deutschland

* Skalpell
Disposable Scalpel, Fa. Feather

* SuperPlate 96-well pcr plate,
Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

* Thermometer
Standard Glasthermometer Best. Nr. E737.1, Fa. Roth

* Tischzentrifuge
Biofuge pico, Fa. Heraeus Instruments

* Plattenshaker: Monoshake,
Fa. Vaiomag®

* Vortex-Genie 2,
Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA

* Zentrifuge
Plattenzentrifuge: Multifuge3 S-R, Fa. Heraeus Instruments

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme

* Agarose
Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Le Agarose (Prod. Nr. 840004)

* Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit Version 1.1 + Sequencing Buffer,
Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland

* Ethanol absolute for analysis,
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

* Ethidiumbromid 0,07%,
Inno-Train Diagnostik GmbH, Kronberg, Deutschland

* HiDi Formamid,
Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

* LiChrosolv® Wasser,
Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

* Master Mix: Fa. IKT Ulm
Magnesium, 25mM, F. Merck
dNTP-Mix 100mM, Fa. Amersham

Glyzerin 99,5%, Fa. Merck
Ammoniumsulfatpuffer (bestehend aus: Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Fa. Merck; Tween 20, Fa. Merck; Ammoniumsulfat, Fa. Merck; HPLC Wasser, Fa. Merck)
HPLC Wasser

* POP 7 performance optimized polymer (Reagenz für Sequenzierautomat 3730)
Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland

* Sodium-Acetat buffer solution for molecular biology, 3M pH 5,2 ,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

* Taq DNA Polymerase,
Quiagen, Hilden, Deutschland
5 units/µl Mat.Nr. 1005476

* ExoSAP-IT®, Prod. No. 78201
USB® Products Affymetrix, Inc., Cleveland, Ohio, USA

* Primer
Fa. Metabion international AG, HPLC aufgereinigt, lyophilisiert, synthesis scale 0,2µmol

2.1.3 Puffer

* Boratpuffer

(bestehend aus Borsäure 900mM, EDTA 25nM Titriplex III und Tris(hydroxymethyl)aminomethan 900nM)
jeweils von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

* Ladepuffer (Bromphenolblau),
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.2 Methodik

Beim Nachweis eines bestimmten Gens oder seiner Allele aus dem MHC müssen die hochpolymorphen Regionen des jeweiligen Exons, welches vor allem die antigenbindenden Stellen kodiert, dargestellt werden. So hat es sich etabliert, dass beim HLA Klasse I Nachweis Exon 2 und 3 analysiert werden, während beim HLA Klasse II Nachweis Exon 2 bestimmt wird.

2.2.1 DNA Proben

Die für die Versuche herangezogenen DNA Proben wurden alle durch das Chemagen Verfahren der Firma PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH isoliert und durch das PCR Bead-Array-SSO oder Luminex Verfahren vortypisiert. Es handelte sich dabei um Ringversuchsproben, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wurden.

2.2.2 Entwicklung der Amplifikationsmixe für die PCR

Für die Herstellung geeigneter Amplifikations- und Sequenzierprimer ist die vollständige Basensequenz der zum jeweiligen Exon benachbart liegenden, nichtkodierenden, Regionen, der sogenannten Introns, nötig. Amplifiktions- und Sequenzierprimer müssen in solchen nichtkodierenden Regionen ansetzen, damit möglichst keine Information beim Nachweis verlorengeht. Bei Anlagerung des Primers direkt in dem zu analysierenden Exon würde zwangsläufig Information verlorengehen. Im Bereich von HLA-DQB1 ist die Basensequenz von Intron 1 und Intron 2 erst seit einigen Jahren vollständig bekannt [10]. Problematisch gestaltete sich bei der Analyse der Intronsequenzen im Bereich HLA-DQB1 die Tatsache, dass es sich bei diesen nichtkodierenden Regionen um die am stärksten polymorphen DNA-Abschnitte des gesamten menschlichen Genoms handelt. Es zeigte sich weiter, dass die Intronsequenzen der verschiedenen Allelgruppen weitgehend gleich sind mit Ausnahme der Sequenzen der Allele *03:01 und *06:01, die sich von ihren jeweiligen Gruppen unterscheiden. Die unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte bei den Versuchen verwendeten Amplifikations- und Sequenzierprimer wurden von der Firma Metabion International AG (D-82152 Martinsried) nach Vorgabe hergestellt und geliefert.

2.2.3 Ansatz und Test der Amplifikationsmixe

Für den Ansatz einer Amplifikationsreaktion wurden in jedes Well einer 96 Well PCR Standardplatte die nötigen Reagenzien und jeweils 2µl Proben-DNA in einer Konzentration von mindestens 2ng/µl hinzugegeben. Die synthetisch hergestellten Primer lagen in

einer Konzentration von 100 pmol/µl vor und mussten initial für die Reaktion auf 10 pmol/µl verdünnt werden. Dazu wurden 10µl des entsprechenden Primers in seiner ursprünglichen Konzentration mit 90 µl HPLC Wasser vermischt, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. Von den so verdünnten Primern wurden jeweils 1µl des zu testenden (5´) Vorwärts- und 1µl des zu testenden (3´) Rückwärtsprimers pro Well zum Amplifikationsmix hinzu pipettiert. Wenn drei Primer pro Well zum Nachweis gewisser Allegruppen nötig waren, wurden nur 0,7µl des jeweiligen Primers zum Amplifikationsmix dazu pipettiert. Dadurch wurde die Gesamtmenge von 2µl Primer pro Well erhalten, da die Reagenzien auf diese Mengen abgestimmt sind. Desweiteren enthält ein Amplifikationsmix neben Proben-DNA und den entsprechenden Primern 0,2µl Taq-Polymerase (Fa. Qiagen©) und 20µl Mastermix (Hersteller DRK BSD) pro Well. Der Mastermix enthält wiederum $MgCl_2$, was die Taq-Polymerase als Co-Enzym benötigt, und die vier dNTPs (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), die zur Bildung eines komplementären DNA-Stranges verwendet werden. Anschließend musste die 96 Well PCR Platte mit den so hergestellten Amplifikationsmixen einmalig kurz bei 500 U/min. zentrifugiert werden, bevor sie daraufhin mit dem in Tabelle 2 beschriebenen Thermocyclerprogramm angesetzt wurde.

Tabelle 1 : Amplifikationsansatz

Amplifikationsansatz	
Menge	**Konzentration**
2 µl Proben DNA	2 ng/µl
2 µl Primer , davon : 1µl Vorwärtsprimer 1µl Rückwärtsprimer	10 pmol/µl 10 pmol/µl
0,2 µl Taq-Polymerase	
20 µl Mastermix	
24,2 µl Gesamtmenge des Ansatzes	

DNA = desoxyribonucleic acid, Taq-Polymerase = thermostabile DNA-Polymerase, µl = Mikroliter, ng = Nanogramm, pmol = pikomol

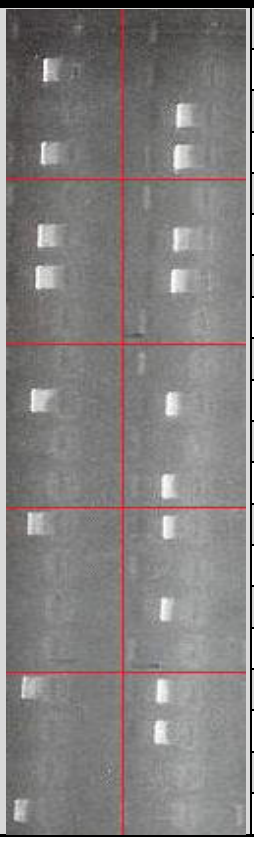
Tabelle 2: Standard-Polymerase Ketten Reaktionsprotokoll DNA Labor I für humane Leukozyten Antigene der Klasse I

	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	96	120	1
Denaturierung	94	10	10
Annealing und Extension	65	60	
Denaturierung	94	10	30
Annealing	61	50	
Extension	72	30	
Extension	72	120	1
Kühlung	4	∞	1

°C = Grad Celsius; ∞ = unendlich, Thermocycler belässt Proben nach den Reaktionen gekühlt bei 4°C bis das Gerät ausgeschaltet wird

Nach Beenden der PCR werden die Amplifikationsprodukte auf einem Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu werden 5µl PCR Produkt eines jeweiligen Wells der PCR Platte mit 5µl Loading Buffer (Methylenblau, 1:3 verdünnt) gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung findet bei 180 V für 15 Min. statt. Das Gel wird nach der Reaktion auf einen UV-Transluminator mit Fotographieeinheit gebracht. Die unter UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden werden fotografiert und ausgewertet.

Tabelle 3: Polymerase Ketten Reaktion-Amplifikationsergebnisse nach Gelelektrophorese, Agarosegel

Position	PCR-Mix	Reaktion	Gel	Mix	Spezifität HLA-DQB1	Reaktion2
1	1	-		1	*05	-
2	2	positiv		2	*06/*06:01	-
3	3	-		3	*02/*03:01	positiv
4	4	positiv		4	*03/*04	positiv
5	1	-		1	*05	-
6	2	positiv		2	*06/*06:01	positiv
7	3	positiv		3	*02/*03:01	positiv
8	4	-		4	*03/*04	-
9	1	-		1	*05	-
10	2	positiv		2	*06/*06:01	positiv
11	3	-		3	*02/*03:01	-
12	4	-		4	*03/*04	positiv
13	1	positiv		1	*05	positiv
14	2	-		2	*06/*06:01	-
15	3	-		3	*02/*03:01	positiv
16	4	-		4	*03/*04	-
17	1	positiv		1	*05	positiv
18	2	-		2	*06/*06:01	positiv
19	3	-		3	*02/*03:01	-
20	4	positiv		4	*03/*04	-

PCR = polymerase chain reaction, HLA = Humane Leukozytenantigene; In der Mitte unter dem Punkt „Gel“ ist ein Foto des Agarosegels nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Banden, welche unter UV-Licht fluoreszieren und damit sichtbar gemacht wurden. Die roten Trennlinien wurden zur leichteren Interpretation hinterher hinzugefügt. Horizontal sollen sie Bereiche von jeweils vier Geltaschen untereinander sichtbar trennen. Vertikal wird das Foto in zwei Hälften geteilt. Es wurden also von oben nach unten und von links nach rechts die Geltaschen mit den Reaktionsprodukten gefüllt. Der Aufbau der Tabelle richtet sich nach den Geltaschen, bzw. nach der Position der Banden. Dementsprechend stehen links unter dem Punkt „Position“ die Positionen der einzelnen Geltaschen, bzw. der DNA-Banden. Unter „PCR-Mix“ stehen die bei der jeweiligen Position zum Einsatz gekommenen Amplifikationsprimermixe 1-4. Unter „Spezifität HLA-DQB1“ stehen zur leichteren Interpretation die Allelspezifitäten der vorher erwähnten Amplifikationsprimermixe an den jeweiligen Positionen. Die Punkte „Reaktion“ links und „Reaktion 2“ rechts zeigen die Positionen auf dem Gel mit positiven Reaktionen an, an denen also fluoreszierende DNA-Banden zu sehen sind.

Die PCR Versuchsanordnung wurde so gestaltet, dass die 96 Well PCR Platte optimal genutzt wird. Dies wurde erreicht indem in einer von insgesamt 8 horizontalen Reihen der verwendeten PCR-Platte, bestehend aus 12 Wells, durchgehend jeweils nur einer der vier

Primermixe verwendet wurde. In den vertikalen Reihen der Platte, bestehend aus 8 Wells, wurden die Amplifikationsprimermixe abgewechselt, so konnte jeder der vier Primermixe zwei Mal für jeweils eine horizontale Reihe zur Anwendung kommen. Es gelingt mit dieser Anordnung 24 Proben auf nur einer Platte zu amplifizieren. Ein weiterer Vorteil dieser Anordnung ist, dass auf diese Weise automatisch immer auch eine Negativkontrolle für die jeweiligen Mixe, die nicht die zur Proben-DNA entsprechenden Allelgruppen amplifizieren, stattfindet. Im endgültigen Testansatz sollten die Amplifikationsprimer nicht mehr in jedes Well in flüssiger Form hinzu pipettiert werden, sondern sie sollten in entsprechenden Mixen auf einer 96-Well-PCR-Platte nach dem Pipettieren zur längerfristigen Lagerung eintrocknen , wie dies in der Routinediagnostik der Fall ist, bevor sie weiter verwendet werden. Im großen Stil durchgeführt hat diese Maßnahme den großen Vorteil, dass man in jedes Well einer solchen 96-Well-PCR-Platte nur noch Taq-Polymerase, DNA-Probe und Mastermix hinzugeben muss und nicht mehr die entsprechenden Primer bzw. Primermixe.

2.2.4 Primerdesign

Die Entwicklung geeigneter Primer ist entscheidend für den Erfolg sowohl der Amplifikations- als auch der Sequenzierreaktion. Die Güte der einzelnen Primer entscheidet hierbei über Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der Versuche [2]. Dabei sind mehrere Parameter von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Primer. Die Schmelztemperatur (Tm), die Länge, die Nukleotidzusammensetzung, die Beschaffenheit der 3´-Enden der Primer sowie mögliche Primer-Primer Wechselwirkungen sind dabei zu nennen. Die Schmelztemperatur, also die Temperatur, bei der 50% der DNA-Moleküle denaturiert bzw. als Einzelstränge vorliegen, ist zu beachten, da von ihr das optimale Thermocyclertemperaturprofil abhängt [2]. Die Schmelztemperatur ergibt sich aus der Länge eines DNA-Doppelstranges, sowie aus der Nukleotidzusammensetzung des DNA-Stranges bzw. Primers. Bei DNA-Doppelsträngen bis zu einer Größe von etwa 25 Basenpaaren kann man Tm näherungsweise anhand der Zahl der vorhandenen GC/AT Basenpaarungen berechnen. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

Tm = 2°C x (A+T) + 4°C x (G+C)

Wie man sieht, tragen die GC Paarungen mehr zur Tm bei als die AT Paarungen, was dadurch zu erklären ist, das die Basen Guanin und Cytosin, im Gegensatz zu den Basen Adenin und Thymin, durch drei statt nur durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Die geeignete Länge eines Primers liegt zwischen 20 und 30 Nukleotiden, wobei der GC Gehalt bei etwa 40-60 % liegen sollte [2]. Die optimale Anlagerungstemperatur (=Annealing Temperatur) im Thermocyclerprofil liegt etwa 5°C unter Tm. In diesem Temperaturbereich ist die spezifische Bindung des Primers an die komplementäre Region der Ziel-DNA am größten. Bei Temperaturen, die deutlich niedriger liegen, kommt es häufig zu unspezifischen Bindungen mit DNA-Molekülen. Bei Temperaturen, die deutlich höher liegen, kommt es nur zu einer geringen Anzahl an Hybridisierungen von Primern mit der entsprechenden Ziel-DNA [2]. Aus diesen Erkenntnissen wird auch klar, dass zwei gemeinsam in einem Mix verwendete Primer etwa dieselbe Schmelztemperatur haben sollten, damit sie unter einem gegebenen Thermocyclertemperaturprofil optimal arbeiten können. Als letzte wichtige Punkte bei der Entwicklung von Primern sind die Sequenz am Replikationsende bzw. 3´-Ende und mögliche Primer-Primer Wechselwirkungen zu diskutieren. Bei der Nukleotidsequenz eines Primers sollte es, speziell am 3´-Ende, nicht zu Komplementaritäten mit anderen Primern kommen, was zu Primer Dimerbildung, den sogenannten Primer Dimers, führt, wodurch diese Primer während der PCR sich gegenseitig „verbrauchen“ und somit uneffektiv sind. Komplementaritäten innerhalb einer Primer Sequenz können zu stabilen sekundären Strukturen der Primer führen, die unter anderem auch als „Hairpins“ bezeichnet werden. Desweiteren hat sich gezeigt, dass Primer mit einer endständigen Thymin Base am 3´-Ende anfälliger für Basenfehlpaarungen sind.

Unter Beachtung der oben genannten Punkte galt es nun im Rahmen dieser Arbeit, nachdem die aus der Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Dunn übernommenen Amplifikationsprimer mit den hauseigenen Thermocycletemperaturprofilen getestet wurden, einen Vorwärts-Sequenzierprimer für den Nachweis von Exon 2 im Genbereich HLA-DQB1 zu entwickeln [10]. Es wurden initial drei verschiedene Vorwärts-Sequenzierprimer entwi-

ckelt und getestet, von denen einer vor und zwei nach einer Deletionstelle im Intron1, in der Nähe von Exon 2, ansetzen. Die beiden von der Arbeitsgruppe um Dunn entwickelten Rückwärts-Sequenzierprimer wurden unter anderem mit Hilfe oben genannter Formel modifiziert und gekürzt und somit an die Annealing-Temperatur des hauseigenen sequenzier Temperaturprofiles angepasst und mit diesem entsprechend getestet.

2.2.5 Sequenzierung der hergestellten Amplifikate

Nach erfolgter allelgruppenspezifischer Amplifikation mittels PCR wurden die Amplifikate mit dem neu entwickelten genortspezifischen Vorwärtsprimern und den modifizierten Rückwärtsprimern sequenziert. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den Vorbefunden aus dem Luminex-Verfahren verglichen.

Aufreinigung der Amplifikate

Die Amplifikate müssen vor der Sequenzierreaktion gereinigt werden. Das bedeutet, dass überschüssige PCR Amplifikationsprimer, dNTPs und Puffersalze entfernt werden müssen. Die übrigen PCR Primer können ansonsten zur Bildung neuer Amplifikate während der Sequenzierreaktion führen, was eine Analyse erschwert oder sogar unmöglich machen kann. Der Abbau der Amplifikationsprimer erfolgt durch das EXOSAP-it Verfahren, bei dem unter anderem ein spezielles Enzym einzelsträngige DNA abbaut. Dabei werden zu den positiven Proben 4µl EXOSAP-it pipettiert. Anschließend wird diese Mischung kurz bei 500U/Min. zentrifugiert und daraufhin bei 37°C für 40 Min. inkubiert.

Sequenzieransatz und Sequenzierung

Die aufgereinigten Amplifikate wurden im zweiten Teil der Nachweisreihe sequenziert. Nach der PCR war eine Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Allelgruppen möglich. Durch die in der Folge durchgeführte Sequenzierreaktion sollten nun die einzelnen Allele genau bestimmt werden. Für den Sequenzieransatz wurde eine neue 96 Well Platte verwendet. Eine positive PCR-Probe wurde dabei aufgeteilt auf anfangs fünf Wells, für die insgesamt fünf entwickelten bzw. modifizierten Primer. Später reduzierte sich diese Zahl

auf drei Wells für die drei am Ende definitiv verwendeten Primer. Der Sequenziermix enthielt pro Well 2µl der positiven, aufgereinigten PCR-Probe, 6µl Primer in einer Verdünnung von 0,5 pmol/µl, 0,5µl Big Dye und 1,5µl Big Dye Puffer. Zur korrekten Verdünnung der Sequenzierprimer wurden diesmal 0,5µl des ebenfalls in einer Konzentration von 100 pmol/µl vorliegenden Primers mit 99,5 µl HPLC Wasser verdünnt. Vergleichbar mit der PCR enthält der Big Dye die verwendete DNA-Polymerase und der Big-Dye-Puffer die vier dNTPs, Kofaktoren und diesmal die vier markierten ddNTPs. Die so gemischten Sequenziermixe wurden zuerst kurz zentrifugiert bei 500 U/ Min. und anschließend mit dem in Tabelle 5 beschriebenen Sequenzier-Thermocyclerprofil angesetzt.

Tabelle 4 : Sequenzieransatz

Sequenzieransatz
Menge und Konzentration
2 µl aufgereinigte, positive PCR-Probe
6 µl Primer in der Konzentration 0,5 pmol/µl
0,5 µl Big Dye
1,5 µl Big Dye Puffer
10 µl Gesamtmenge

µl = Mikroliter, pmol = Pikomol, PCR = polymerase chain reaction

Tabelle 5: Thermocyclerprofil für die Cycle Sequencing Reaktion

	Temperatur in °C	**Zeit in Sekunden**	**Zyklen**
Denaturierung	96	60	1
Denaturierung	96	10	25
Annealing	60	5	
Extension	60	120	
Kühlung	4	∞	1

°C = Grad Celsius; ∞ = unendlich, Thermocycler belässt Proben nach den Reaktionen gekühlt bei 4°C bis das Gerät ausgeschaltet wird

Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Nach der Reaktion im Thermocycler müssen die Sequenzierprodukte gereinigt werden, bevor sie mittels Kapillarelektrophorese im Sequenzierautomaten analysiert werden können. Dabei müssen vor allem überschüssige ddNTPs aus der Lösung entfernt werden, da diese sonst bei der Elektrophorese mitlaufen würden und somit die Analyse durch Signalüberlagerung behindern würden.

Die DNAs wurden mittels Natriumacetat-Alkohol Fällung gereinigt. Dazu wurde in jedes Well 25µl einer Na-Acetat-Alkohol Mischung hinzu pipettiert. Die Mischung wurde aus 1000µl Ethanol 96%ig und 40µl Natriumacetat (3M, pH 5,2) hergestellt. Anschließend wurde das Gesamtgemisch für 40 Minuten bei 2000g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und die Platte mit den DNAs erneut, diesmal jedoch mit der Oberseite, der Seite mit den Öffnungen, nach unten orientiert, bei 150g zwei Minuten zentrifugiert. Nachher wurden in jedes Well 50µl 70%iges Ethanol pipettiert, woraufhin erneut zentrifugiert wurde, diesmal bei 2000g für 15 Minuten. Danach wurden die Arbeitsschritte nach der initialen Zentrifugierung wiederholt. Es wurde also der Überstand wieder verworfen und die Sequenzierplatte wurde daraufhin erneut in umgekehrter Orientierung für zwei Minuten bei 150g zentrifugiert. Anschließend sollten die Wells richtig austrocknen bevor in jedes Well 25µl Formamid pipettiert wurde und die Platte daraufhin erneut kurz mit 500U/Min. zentrifugiert wurde. Zum Abschluss der Fällungsreaktion wurden die so präparierten Sequenzierprodukte im Thermocycler für zwei Minuten bei 90°C Denaturiert.

Analyse der Sequenzierprodukte mittels Sequenzierautomaten

Nach Aufreinigung der Sequenzierprodukte wurde die 96 Well Sequenzierplatte in den Sequenzierautomaten gestellt, damit dort über gelelektrophoretische Auftrennung mittels feiner Kapillaren, die entsprechenden Basensequenzen ermittelt werden konnten. Dabei waren die Wells, die die Sequenzierprodukte enthielten, mit jeweils 25 µl Formamid gefüllt, die anderen, die keine Sequenzierprodukte enthielten, wurden mit 25 µl HPLC-Wasser gefüllt, um ein Auskristallisieren des Gels der Kapillaren zu vermeiden.

Zum Sequenzieren wurde der Sequenzierautomat: 3730 DNA Analyzer, der Firma Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland, verwendet.

Tabelle 6 : Technische Daten des Sequencer: 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland

POP-Medium	3730 POP-7
Capillary	36 cm array
Elektrophorese Puffer	1 x 3730 Puffer mit EDTA
Instrument Protocol	Type: Regular Run Module: RapidSeq36_POP7_IT15_1000 Dye Set: E-Big-DyeV1 (für BDT v.1.1)
Sequence File Format	Flat Profile
Ending Base	At PCR Stop Do not assign N's to Basecalls
Mixed Bases	Use Mixed Base Identification Call IUB if 2nd highest peak is 25% of the highest peak
Clear Range Method	Use quality values; Remove bases from ends until fewer than 10 bases out of 20 have QVs less than 15
Mobility File	3730_POP7_BDTv1.mob (für BDT v1.1)
Sequencing Analyses Software Vers. 5.1	
	Oven Temperature 60°C Pre Run Voltage 15 kV Pre Run Time 180 sec

Run Module	Injection Voltage	1,2 kV
	Injection Time	15 sec
	First ReadOut Time	140 ms
	Second ReadOut Time	140 ms
	Run Voltage	13,2 kV
	Voltage Number Of Steps	20 steps
	Voltage Step Interval	15 sec
	Voltage Tolerance	0,6 kV
	Current Stability	30 µA
	Ramp Delay	300 sec
	Data Delay	80 sec
	Run Time	1060 sec
Basecaller	KB.bcp	
Einstellungen Sample Manager	Basecaller: KB.bcp Dye set/primer file: KB_3730_POP7_BDTv1.mob	
Einstellungen Plate Record	Dye Set: E Mobility File: 3730_POP7_BDTv1.mob (für BDT v1.1) Run Module: RapidSeq36_POP7_IT15_RT1000	

Auswertung der Sequenzierergebnisse

Nachdem die Basensequenzen der einzelnen Proben durch den Sequenzierautomaten ermittelt wurden, müssen die Ergebnisse mittels eines speziellen Programmes ausgewertet werden. Jeder analysierten Sequenz muss auf diese Weise ein passendes Allel des ana-

lysierten Gens zugeordnet werden. Die ermittelten Sequenzen werden vom Sequenzierautomaten als sogenannte Elektropherogramme gespeichert, welche anschließend ins Analyse-Programm Sequence Pilot der Firma JSI-Medical Systems GmbH (D-77971 Kippenheim) für die Zuordnung der passenden Allele geladen werden. Hier werden die ermittelten Sequenzen mit HLA-Datenbanken abgeglichen. Wenn eine ermittelte Sequenz mit einem Allel oder einer Allelkombination übereinstimmt, wird das entsprechende Allel oder die Kombination automatisch als Ergebnis angegeben. Sollte das Programm nach Abgleich kein eindeutiges Ergebnis einer geladenen Sequenz zuordnen können, gibt es mögliche Alternativergebnisse, also alle in Frage kommenden, aber nicht genau passenden Allele oder deren Kombinationen, an. Dabei werden die Alternativmöglichkeiten nach Anzahl der Abweichungen einzelner Basen, den sogenannten Mismatches, und der Wahrscheinlichkeit aufgrund der Häufigkeit der verschiedenen Allele bzw. deren Kombinationen geordnet. Diese Sequenzen müssen manuell nachbearbeitet werden, das heißt vom Programm falsch interpretierte Basen müssen entsprechend editiert werden. Nach jeder Editierung vergleicht das Programm die veränderte Sequenz mit seiner Datenbank, so dass am Ende der Sequenz das richtige Allel zugeordnet werden kann.

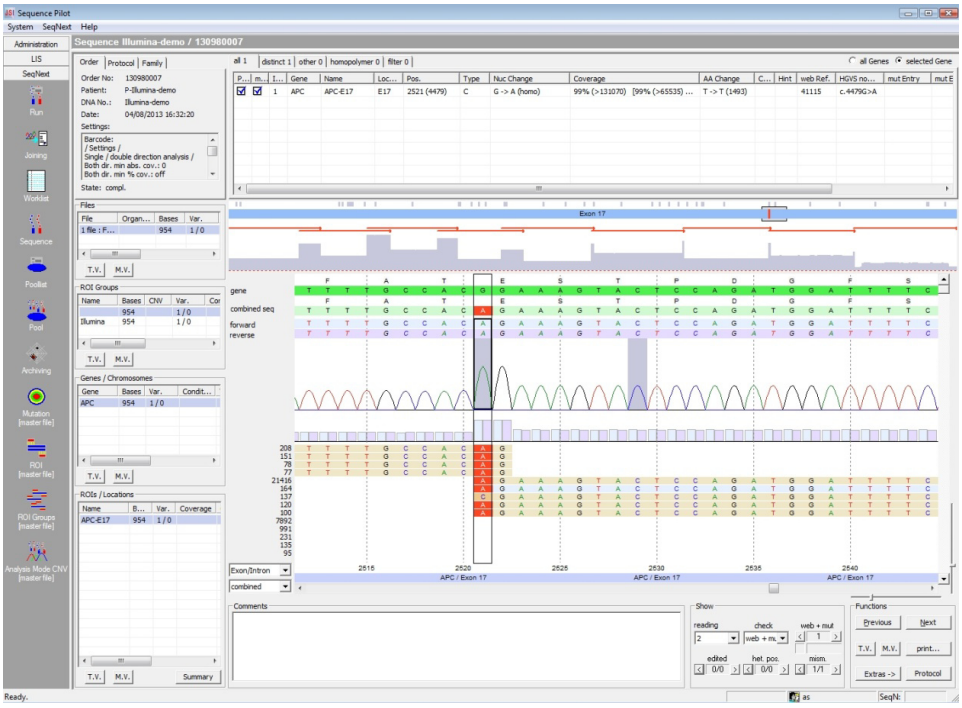


Abbildung 11: „Screenshot“ Sequence Pilot © Arbeitsoberfläche

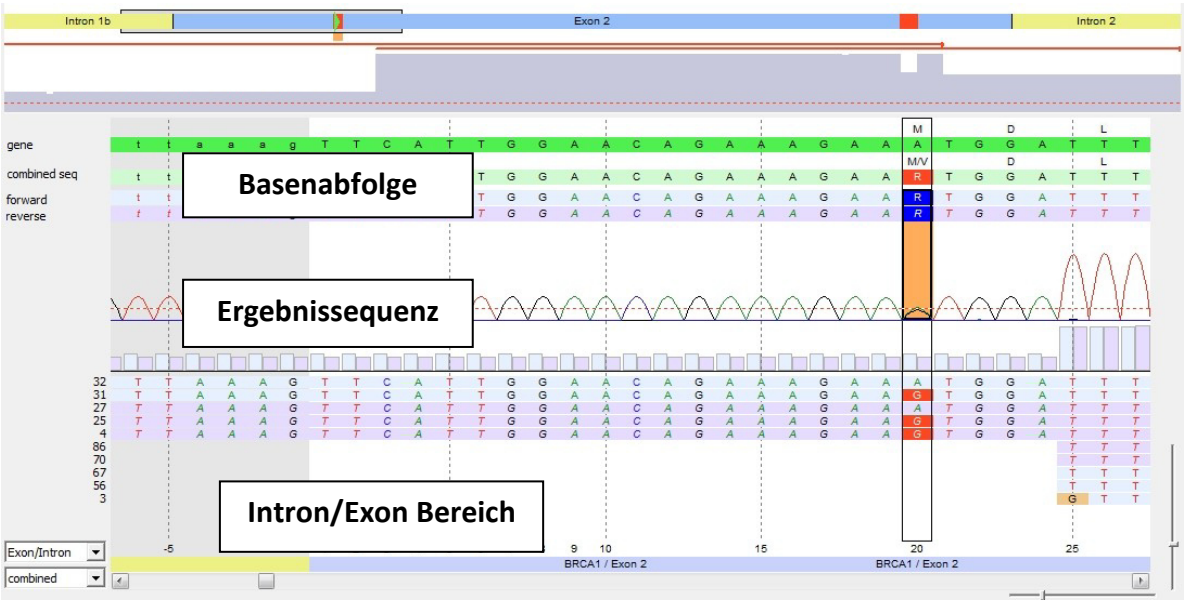


Abbildung 12: Vergrößerter Ausschnitt der Arbeitsoberfläche des Sequence Pilot ©

Ausschnitt aus Arbeitsoberfläche des Sequence Pilot © Programms mit Darstellung des zu untersuchenden Genabschnittes. Der gelbe Balken unten im Bild entspricht dabei der Intronregion, der benachbarte graue Balken entspricht der gesuchten Exonregion eines Gens. Ergebnissequenz in der Mitte farblich kodiert nach entsprechend ermittelten Basen dargestellt. Darüber Basenabfolge mit entsprechenden Buchstaben dargestellt. Dabei steht A für Adenin, C für Cytosin, G für Guanin und T für Thymin. Darüber hinaus werden heterozygote Stellen mit weiteren Buchstaben bezeichnet, wie in diesem Beispiel R für Adenin und Guanin.

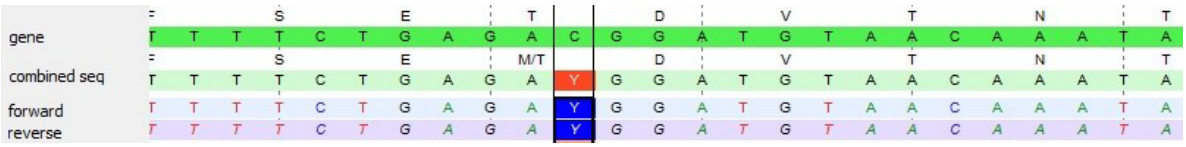


Abbildung 13: Dargestellte Nukleotidsequenzen im Detail

„Gene“ entspricht der Nukleotidsequenz des Referenzgens , „combinded seq“ entspricht den kombinierten Nukleotidsequenzen, ermittlet durch Vorwärts- und Rückwärtsprimer, „forward“ entspricht ermittelter Sequenz durch denVorwärtsprimer, „reverse“ entspricht ermittleter Sequenz durch den Rückwärtsprimer. Basenabfolge durch entsprechende Anfangsbuchstaben der jeweiligen Base dargestellt. Dabei steht A für Adenin, C für Cytosin, G für Guanin, T für Thymin und Y für Cytosin oder Thymin aufgrund einer Ambiguität an entsprechender Position.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzierung von HLA-DQB1

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines hochauflösenden Typisierungsverfahrens für HLA-DQB1 mittels Sequenzanalyse. Bisher wurde für die hochauflösende HLA-DQB1 Testung das PCR Bead Array SSO oder Luminex Verfahren eingesetzt. Mit Bekanntwerden der kompletten Intronsequenzen im Bereich HLA-DQB1 2004 ist die Möglichkeit zur Etablierung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens auf der Basis der Sequenzanalyse entstanden. Das von Dunn et al. entwickelte Verfahren galt als Ausgang [10]. Im ersten Teil der Arbeit sollten Amplifikationsprimer dieses Verfahrens mit ihren eigenen Funktionsparametern, wie zum Beispiel der Schmelztemperatur, mit unseren Standard-Thermocycler Profilen getestet werden. Darüber hinaus wurden eigene Mischungen dieser sieben Amplifikationsprimer getestet. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die zwei von Dunn et al. entwickelten Rückwärts-Sequenzierprimer modifiziert und es wurde ein eigener Vorwärts-Sequenzierprimer entwickelt. Die modifizierten bzw. neuen Primer wurden abschließend nach zahlreichen Vortests mit 100 vortypisierten Proben zur Validierung getestet.

3.2 Primermixe für die Amplifikation

P.P.J. Dunn et al. entwickelten sieben Allelegruppen spezifische Amplifikationsprimer für den Bereich HLA-DQB1, davon drei Vorwärts und vier Rückwärtsprimer [10]. Im ersten Teil dieser Promotionsarbeit wurden mit diesen Primern geeignete Primermixe entwickelt mit dem Ziel, die sieben Primer in möglichst wenige Mixe zusammen zu fassen unter Wahrung einer möglichst großen Allelgruppenspezifität. Dabei wurde aus Praktikabilitätsgründen besonders großer Wert darauf gelegt mit insgesamt vier verschiedenen Amplifika-tionsprimermixen auszukommen. Die Gründe hierfür waren, wie bereits im Teil „Material und Methoden“ unter 2.2.2 „Entwicklung der Amplifikationsmixe für die PCR“ erläutert, dass mit vier Mixen eine Standard-96-Well-PCR-Platte am besten ausgenützt wird. Mit entsprechender Testanordnung können so bis zu 24 Proben untersucht werden.

Neben den Mixen sollten auch die Primer selbst unter Verwendung eines eigenen, bei weiteren HLA-Testungen angewendeten, Thermocycler Temperaturprofils getestet werden. P.P.J. Dunn et al. entwickelten die Amplifikationsprimer zusammen mit einem auf diese Primer abgestimmten Thermocycler Temperaturprofil. Der Aufbau dieser Primer ließ den Verdacht zu, dass diese ohne Modifikation mit unserem Thermocycler Temperaturprofil „PCR-Kl.1“ laufen würden, was es zu testen galt.

Tabelle 7: Amplifikationsprimer zum Nachweis humaner Leukozyten Antigene HLA-DQB1

Primer	Bindungsstelle	Sequenz (5´nach 3´)
Vorwärtsprimer		
L1	Intron 1, 1239 - 1259	GCRGATTCCSGAAGCCCCCAG
L2	Intron 1, 1239 - 1259	GCAGATTCCAGAAGCCCGCAA
L3	Intron 1, 1232 - 1253	TAGGAAGGCGGATTCCCGAAGA
Rückwärtsprimer		
R1	Intron 2, 105 - 125	CCTGTCCCCTGGGGTGGAATA
R2	Intron 2, 92 - 112	GTGGAATGAACKRGGCTCAGA
R3	Intron 2, 105 - 125	CCTGTCCTCTGGGGTGGAACA
R4	Intron 2, 105 - 127	CTCCTGTCMSCYGGGGTGGAACG

L1-3 Vorwärtsprimer, R1-4 Rückwärtsprimer zur Amplifikation; Dunn P.P.J., Day S., Williams S., Bendukidze N., HLA-DQB1-Sequencing-based typing using newly identified conserved nucleotide sequences in introns 1 and 2, Tissue Antigens:66:99-106 (2005)

Die in obiger Tabelle beschriebenen Primer wurden zu den in der folgenden Tabelle dargestellten Primermixen zusammengefasst. Wie bereits beschrieben sind die Intron Sequenzen des HLA-DQB1 Gens hoch Polymorph, allerdings innerhalb der Allelgruppen unterscheiden sie sich weitgehend nicht. Lediglich die Allele *03:01 und *06:01 weichen in ihrer Intronsequenz deutlicher von ihren Allelgruppen *03 und *06 ab. Auf Grund dessen verfügt Mix 2 über zwei Vorwärts-Amplifikationsprimer, um die sich in Intron 1 unterscheidenden Allele der Gruppe *06 vollständig zu erfassen. Das Allel *03:01 wird mit der Allelgruppe *02 in Mix 3 amplifiziert, da sich deren Sequenzen im Intron 1 gleichen, weshalb hier der gleiche Vorwärtsprimer verwendet werden kann.

Tabelle 8: Amplifikationsprimermischungen

Primermix	Verwendete Primer	Allelgruppenspezifität DQB1
Mix 1	L1 + R1	*05
Mix 2	L1 + L2 + R2	*06
Mix 3	L3 + R3 + R4	*02/*03:01
Mix 4	L1 + R4	*03/*04

Mix 1-4 entsprechen Amplifikationsprimermixen,L1-3 Vorwärtsprimer, R1-4 Rückwärtsprimer zur Amplifikation

Die Primermixe wurden mit dem in Tabelle 2 dargestellten Thermocycler Temperaturprofil getestet, ein Profil welches in der Routinediagnostik zum PCR Nachweis von HLA-A,-B und-C, sowie HLA-DRB1 verwendet wird.

Anschließend ist das Thermocycler Temperaturprofil von P.P.J. Dunn et al. zum Vergleich dargestellt. In dem wichtigsten Parameter, der aus der Schmelztemperatur der Primer resultierenden Annealing Temperatur, gleichen sich die Profile. Beide Programme verwenden eine initiale Annealing Temperatur von 65°C und verwenden in der zweiten Zyklusrunde erneut nahezu gleiche Annealing Temperaturen mit 61°C bzw. 60°C. Die Arbeitsgruppe um P.P.J. Dunn et al. haben in ihrem Temperaturprofil als Hauptunterschied zu dem von uns verwendeten Programm eine dritte Zyklusrunde beigefügt, mit einer dabei verwendeten Annealing Temperatur von 55°C. Diese wurde eingeführt, um am Schluss der Reaktion auch schwächer amplifizierte Sequenzen stärker zu vervielfältigen.

Tabelle 9: Thermocycler Temperaturprofil zur Amplifikation

	Temperatur in °C	Zeit in Sek.	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	96	12 Minuten	1
Denaturierung	96	20	20
Annealing	65	45	
Extension	72	60	
Denaturierung	96	20	15
Annealing	60	45	
Extension	72	50	
Denaturierung	96	20	10
Annealing	55	45	
Extension	72	50	
Extension	72	5 Minuten	1
Kühlung	4	∞	1

°C = Grad Celsius; ∞ = unendlich, Thermocycler belässt Proben nach den Reaktionen gekühlt bei 4°C bis das Gerät ausgeschaltet wird; Dunn P.P.J., Day S., Williams S., Bendukidze N., HLA-DQB1-Sequencing-based typing using newly identified conserved nucleotide sequences in introns 1 and 2, Tissue Antigens:66:99-106 (2005)

Die sieben Amplifikationsprimer in den vier entworfenen Primermixen wurden mit dem Thermocycler Temperaturprofil der im Kapitel „Material und Methoden“ erwähnten Tabelle 2 „Standard-PCR-Protokoll DNA Labor I für HLA Klasse I“ in Vortests mit insgesamt 19 Proben getestet. In der Versuchsanordnung, die bereits im Teil „Material und Methoden“ erwähnt wurde, wird jede Probe mit jedem der vier Primermixe getestet. Dadurch werden automatisch für die Primermixe, welche nicht der Allelgruppe der verwendeten Probe entsprechen, negativ Kontrollen durchgeführt. Bei diesen ersten Versuchen mit 19 vortypisierten Proben kam es insgesamt nur zu einem falsch negativen Ergebnis bei Mix 3 im Bereich *02/*0301, bei ansonsten sehr gutem Ergebnis.

Tabelle 10 : Ergebnisse der ersten Polymerase Ketten Reaktionsversuche im Bereich der humanen Leukozyten Antigene HLA-DQB1, 19 Vortypisierte Patientenproben

Test Mix	Allele	Richtig positiv	Richtig negativ	Falsch positiv	Falsch negativ
1	*05	6	13	0	0
2	*06	11	8	0	0
3	*02/*03:01	10	8	0	1
4	*03/*04	7	12	0	0

Nach der ersten erfolgreichen Testreihe wurden Sequenzierprimer entwickelt bzw. modifiziert und in den darauffolgenden Testreihen wurde ein kompletter Sequenzieransatz mit PCR und Sequenzanalyse getestet. Die angewandten Verfahren und Ergebnisse zur Neuentwicklung von Sequenzierprimern und zur Modifikation bestehender Sequenzierprimer für diese Versuche werden im nachfolgenden Punkt 3 „Sequenzierprimer“ entsprechend erläutert.

Nachdem sich der endgültige Sequenzieransatz in den ersten Testreihen bewährte, sollten 100 vortypisierte Proben im Sinne einer einfach geblindeten Studie mit dem kompletten Sequenzieransatz getestet werden. Die Amplifikationsprimer und deren Mixe funktionierten während der Haupttestreihe mit 100 Proben hervorragend. Auch 30 Tage nach Eintrocknen der Amplifikationsprimermixe auf den 96 Well PCR-Platten, gab es keinerlei Probleme in Form von PCR Ausfällen, wodurch die Möglichkeit der längerfristigen Lagerung der Primer gezeigt werden konnte. Im abschließend durchgeführten Test reagierten alle Primer korrekt, entsprechend der vorher ermittelten Allele. Es zeigten sich keinerlei falsch negative oder falsch positive Reaktionen in der Gelelektrophorese.

3.3 Sequenzierprimer

Nachdem sich die Amplifikationsprimer, wie oben beschrieben, in den ersten Testläufen gut bewährten, ging es im zweiten Teil der Arbeit darum, Sequenzierprimer zu entwickeln

bzw. zu modifizieren, damit eine komplette Testreihe, mit Amplifikation und Sequenzierung, absolviert werden konnte. Hierbei wurden die beiden Rückwärts-Sequenzierprimer von P.P.J. Dunn et al. übernommen und ein eigener Vorwärts-Sequenzierprimer entwickelt. Die beiden Rückwärtsprimer sequenzieren unterschiedliche Allelgruppen, wobei der erste Primer R1, die Allelgruppen HLA-DQB1*05 und*06 und der zweite Primer R2, die Allelgruppen *02, *03 und *04 sequenziert. Das von P.P.J. Dunn et al. verwendete Thermocycler Temperaturprofil legte nahe, dass die oben genannten Primer nicht ohne weitere Modifikation mit dem in der Transplantationsimmunologie Ulm verwendeten Temperaturprofil, der „Cycle-Sequencing" Reaktion (Tabelle 5) funktionieren würden.

Tabelle 11: Thermocycler Temperaturprofil zur Sequenzierung der humanen Leukozyten Antigene HLA-DQB1

	Temperatur in °C	**Zeit in Sekunden**	**Anzahl der Zyklen**
Denaturierung	98	10	1
Denaturierung	96	10	30
Annealing und Extension	65	60	
Kühlung	4	∞	1

°C = Grad Celsius; ∞ = unendlich, Thermocycler belässt Proben nach den Reaktionen gekühlt bei 4°C bis das Gerät ausgeschaltet wird; Dunn P.P.J., Day S., Williams S., Bendukidze N., HLA-DQB1-Sequencing-based typing using newly identified conserved nucleotide sequences in introns 1 and 2, Tissue Antigens:66:99-106 (2005)

Nach der im Teil „Material und Methoden" unter dem Kapitel 2.4 „Primerdesign" erwähnten Formel zur Bestimmung der Schmelztemperatur liegt die Schmelztemperatur von Primer R1 bei etwa 70°C und die von Primer R2 zwischen 66 und 70°C. Da das von uns verwendete Sequenzier-Temperaturprofil (siehe Tabelle 5) eine Annealing Temperatur von 60°C verwendet, mussten die beiden Primer in ihrer Länge so gekürzt werden, dass sich optimaler weise eine Schmelztemperatur von nicht mehr als 65°C ergeben würde.

In der Folge wurde der Primer R1 an seinem 5´-Ende um zwei Nukleotide und der Primer R2 an seinem 3´-Ende um ebenfalls zwei Nukleotide gekürzt. Daraus ergaben sich neue Schmelztemperaturen von etwa 62°C für (R1) und 60-64°C für (R2). Die so modifizierten

Primer werden in den weiteren Versuchen, wie in der folgenden Tabelle 12 beschrieben, als Rückwärtsprimer 2a und 2b bezeichnet.

Tabelle 12: Rückwärts-Sequenzierprimer zum Nachweis der humanen Leukozyten Antigene HLA-DQB1

Rückwärts-Sequenzier-Primer	Bindungsstelle	Sequenz	Sequenzierte Allelegruppen HLA-DQB1
R1	Intron 2, 20-39	GGCCAASGGTGSGCCTCACG	*05,*06
R2	Intron 2, 19-38	GCCAAGRRTGGGCCTCGCAG	*02,*03,*04
2a	Intron 2, 22-39	CCAASGGTGSGCCTCACG	*05,*06
2b	Intron 2, 19-36	GCCAAGRRTGGGCCTCGC	*02,*03,*04

Rot dargestellt die entfernten Nukleotide zur Anpassung der Schmelztemperatur, die für die Reaktionen modifizierten Rückwärtssequenzierprimer sind Gelb hinterlegt. HLA-DQB = Humane Leukozyten Antigene vom Typ DQB1;
Dunn P.P.J., Day S., Williams S., Bendukidze N., HLA-DQB1-Sequencing-based typing using newly identified conserved nucleotide sequences in introns 1 and 2, Tissue Antigens:66:99-106 (2005)

Nach Modifikation der Rückwärtsprimer musste nun ein geeigneter Vorwärtsprimer, der im Intron 1 ansetzt, gefunden werden. Ziel war die Entwicklung eines Primers für alle Allelgruppen, um die Sequenzierreaktion so weit wie möglich zu vereinfachen. Durch die gleichzeitige Verwendung entgegengesetzt arbeitender Vorwärts- und Rückwärtsprimer, ist die höchste Nachweissicherheit gewährleistet, da häufig auftretende Ungenauigkeiten bei der Analyse im Anfangsbereich einer Sequenzierten DNA ausgeglichen werden. Diese Ungenauigkeiten sind auf das Prinzip der Nachweismethode, der sogenannten Strangabbruchsmethode, zurück zu führen. Bei der Strangabbruchmethode nach Sanger entstehen unterschiedlich lange Oligonukleotide, die jeweils immer mit einem markiertem ddNTP enden, wie im Teil „Material und Methoden“ beschrieben. Die Position der einzelnen Basen in einem DNA-Strang wird nun durch die Distanzen der markierten Oligonukleotide, die sie in einer bestimmten Zeit im Polymer während der Kapillarelektrophorese-Reaktion zurückgelegt haben, ermittelt. Dabei steigt die Präzision mit der Größe der Moleküle, was dazu führt, dass die ersten ermittelten Basen ungenau, z.B. teilweise überlappend, darge-

stellt werden, wohingegen die Basenabfolge im weiteren Verlauf immer präziser dargestellt wird.

Die Schwierigkeit einen einzelnen Vorwärtsprimer für alle Allelgruppen zu entwickeln lag darin, dass die Intronsequenzen im Bereich HLA-DQB1 sehr polymorph angelegt sind. Es galt nun eine ideale Stelle im Intron 1 zu finden, an der der neue Primer ansetzen sollte. Dies wurde weiter erschwert durch eine Deletionsstelle im Intron 1 in der Nähe von Exon 2 an Position 1414-1425, die nur die Allelgruppen *02 und *06 ohne *06:01 betrifft. Initial wurden auf Grund dessen insgesamt drei Vorwärtsprimer, die jeweils für alle Allelgruppen im Bereich HLA-DQB1 spezifisch sind, entwickelt und getestet. Zwei der Primer setzten nach der oben beschriebenen Deletionsstelle im Exon 1 an und ein Primer davor. Mit den beiden Primern, die nach der Deletionsstelle ansetzten, umging man zwar mögliche Probleme, die durch die Deletion beim Nachweis auftreten konnten, sie hatten jedoch den Nachteil, dass sie sehr nahe am Exon 2 ansetzten. Dies konnte sich durch die oben beschriebenen Probleme in der Darstellung der ersten Basen einer Sequenz als Nachteilig erweisen. Die drei Primer wurden nach den Prinzipien des Primerdesign, welche im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben wurden, entwickelt. Dabei wurde auf eine zum verwendeten Sequenzier-Temperaturprofil für die „Cycle-Sequencing“ Reaktion (Tabelle 5) passende Schmelztemperatur geachtet, die für die verschiedenen Primer zwischen 60 und 64°C lag. Nun folgten Vorversuche um die drei Primer auf ihre Leistungsfähigkeit zu prüfen und um idealerweise einen zu finden, mit dem in Zukunft Nachweisreaktionen sicher durchgeführt werden können.

Tabelle 13: Vorwärts-Sequenzierprimer zum Nachweis humaner Leukozyten Antigene HLA-DQB1

Vorwärts-Sequenzier-Primer	Bindungsstelle	Sequenz
1a	Intron 1	CGCGGGCKGTTCCACAGC
1b	Intron 1	ACTGACYGGCCGGTGATTCC
1c	Intron 1	GGGCCKSACTGACYGGCC

Primer 1b und 1c befinden sich zwischen den Deletionsstellen und Exon 2 auf Position 1371.

Primer 1a befindet sich vor oben genannter Deletionsstelle.

3.4 Vorversuche zur entwickelten HLA-DQB-Nachweisreaktion mittels Sequence-Base-Typing

Um die modifizierten Rückwärts-Sequenzierprimer zu testen und um den geeignetsten Vorwärts-Sequenzierprimer zu finden wurden insgesamt drei Testreihen einer kompletten Nachweisreaktion mit Amplifikation und Sequenzierung durchgeführt. Die drei Testreihen wurden mit jeweils acht unterschiedlichen und vortypisierten DNA-Proben durchgeführt. In der ersten Testreihe wurden Proben, die alle Allelgruppen im Bereich HLA-DQB1 abdecken, ausgesucht. Die beiden anderen Testreihen wurden an die Allelgruppenspezifität der modifizierten Rückwärtsprimer angepasst, so dass folglich in der zweiten Testreihe die Allelgruppen *02, *03 mit *03:01 und in der dritten Testreihe die Allelgruppen *04, *05 und *06 getestet wurden.

Bei Testreihe 1 ergab sich bei der Amplifikation:

Tabelle 14: Amplifikationsergebnisse Testreihe 1

Primermix	Allelgruppen-Spezifisch	falsch negativ	Falsch positiv	korrekt	gesamt
1	05	0	0	2	2
2	06/06:01	0	0	4	4
3	02/03:01	1	0	3	4
4	03/04	0	0	5	5
Gesamtmenge:		**1**	**0**	**14**	**15**

Es wurden 16 Allele von 8 verschiedenen Probanden getestet, jeweils zwei pro Proband. Lediglich ein falsch negatives Resultat für das Allel *03:01 trat auf. Zwei Allele einer Probe gehörten beide zu dem Bereich *06/*06:01, so dass es insgesamt, bei 16 Allelen in den Versuchen, nur zu maximal 15 korrekt positiven Proben kommen konnte. Aufgrund der falsch negativen Probe im Bereich *03:01 lagen am Ende von Testreihe 1 14 korrekt positive Ergebnisse vor.

Bei Testreihe 2 ergab sich bei der Amplifikation:

Tabelle 15: Amplifikationsergebnisse Testreihe 2

Primermix	Allelgruppen-Spezifisch	falsch negativ	Falsch positiv	korrekt	gesamt
1	**02/03:01**	**2**	**0**	**5**	**7**
2	03:01	0	0	4	4
3	02	0	0	3	3
4	**03/04**	**0**	**0**	**8**	**8**
Gesamtmenge:		**2**	**0**	**13**	**15**

Die Ergebnisse, der in der Routinediagnostik zu verwendenden Primermixe, sind weiß unterlegt. Nur deren Ergebnisse wurden in der Gesamtsumme der Resultate berücksichtigt. Hellgrau unterlegt sind die Mixe 2 und 3, die lediglich zur Probe durchgeführt wurden.

Für die Testreihe zwei wurden neben dem Primermix für die Allelkombination *02/*03:01, wie er später in der Routine verwendet wird, auch zwei Primermixe, Mix 2 und 3, verwendet, welche die Allele bzw. Allelgruppen *02 und *03:01 getrennt nachweisen. Diese dienten lediglich zur Probe der Primer, die die genannten Allelgruppen getrennt nachweisen und deren Ergebnisse flossen nicht in die Gesamtsumme korrekt positiver Ergebnisse mit ein. Zwei falsch negative Resultate traten bei Primermix 1 für den Bereich *02/*03:01 auf. Beim getrennten Nachweis der Allelgruppen *02 und dem Allel *03:01 mit den Primermixen 2 und 3 kam es zu keinem falsch negativen Resultat. Insgesamt wurden in dieser zweiten Testreihe 8 DNA-Proben mit jeweils zwei Allelen getestet. Bei einer Probe waren beide Allele aus der Allelgruppe *03 (ohne *03:01), die folglich nur zu einem positiven Testresultat bei der Amplifikation führten, womit sich eine maximale Anzahl von 15 korrekt positiven Reaktionen ergeben hätte.

Bei der Testreihe 3 ergab sich für die Amplifikation:

Tabelle 16: Amplifikationsergebnisse Testreihe 3

Primermix	Allelgruppen-Spezifisch	falsch negativ	falsch positiv	korrekt	gesamt
1	06/06:01	0	0	6	6
2	05	0	0	4	4
3	03/04	0	0	3	3
Gesamtmenge:		0	0	13	13

In Testreihe drei kam es zu keinerlei falschen Resultaten bei der Amplifikation. Es wurden 8 DNA Proben mit 16 Allelen getestet. Bei drei DNA Proben gehörten die jeweiligen Allele der gleichen Allelgruppe an, so dass insgesamt 13 positive Resultate vorlagen.
Bei der Sequenzierung ergab sich folgendes Bild.

Die Modifizierten Rückwärts-Primer 2a und 2b arbeiteten mit dem hauseigenen Programm für die „Cycle-Sequencing“ Reaktion (Tabelle 5) und einer Annealing Temperatur von 60°C sehr gut. Dabei wurden beide Primer mit Allelen aller Allelgruppen aus dem Be-

reich HLA-DQB1 getestet. Die erwartete Allelgruppenspezifität wurde bestätigt. Die drei entwickelten Vorwärts-Sequenzierprimer arbeiteten unterschiedlich gut. Dabei lieferten die Primer 1b und 1c, welche beide nach der Deletion (1414-1425 im Intron 1)an den Positionen 1452 und 1443 binden, deutlich schlechtere Ergebnisse mit mehr Mismatches, sogenanntem Hintergrundrauschen und Totalausfällen als der Primer 1a, welcher noch vor der Deletion an Stelle 1371 ansetzt. Die Probleme bei Sequenzierung mit den Vorwärts-Sequenzierprimern 1b und 1c traten im gesamten HLA-DQB1 Bereich auf und nicht nur bei den von der Deletion im Intron 1 betroffenen Allelgruppen *02, *06 und *06:01. Die Ergebnisse nach Sequenzierung mit diesen beiden Primern waren so schlecht, vor allem im Vergleich zu dem Vorwärts-Sequenzierprimer 1a, dass eine weitere Analyse der Ursachen oder eine statistische Auswertung der Fehler nach Häufigkeit bei bestimmten HLA-DQB-Allelgruppen aufgrund der sehr guten Ergebnisse mit dem Primer 1a hinfällig wurden. Die mit dem Vorwärts-Sequenzierprimer 1a nachgewiesenen Sequenzen machten einen optisch sauberen, sehr guten Eindruck mit wenig Hintergrundrauschen und Mismatches. Speziell der Anfangsteil der ermittelten Sequenzen wurde mit Primer 1a deutlich besser ermittelt als mit den Primern 1b und 1c. Da der Vorwärts-Sequenzierprimer 1a, wie erhofft, mit allen Allelgruppen und deren einzelnen Allelen korrekt arbeitet, wurde dieser Primer für die folgenden Versuche und für die spätere Routinediagnostik als neuer Standard-Sequenzierprimer ausgewählt.

Tabelle 17: Neuentwickelte bzw. modifizierte Sequenzierprimer zum Nachweis humaner Leukozyten Antigene HLA-DQB

Vorwärtsprimer	**Bindungsstelle**	**Sequenz**	**Sequenzierte Allelegruppen**
1a	Intron 1	CGCGGGCKGTTCCACAGC	Alle HLA-DQB1-Allele
Rückwärtsprimer	**Bindungsstelle**	**Sequenz**	**HLA-DQB:**
2a	Intron 2, 22-39	CCAASGGTGSGCCTCACG	*05 , *06
2b	Intron 2, 19-36	GCCAAGRRTGGGCCTCGC	*02,*03,*04

Im Folgenden sollen die Begriffe Ambiguität, Mismatch und Hintergrundrauschen erläutert werden, sowie die möglichen Auswirkungen einer Deletion im zu ermittelnden Gen dargestellt werden. Bei der Analyse der ermittelten Sequenzen durch den Sequenzierautomaten und anschließender Darstellung in einem speziellen Auswertungsprogramm können gewisse Fehler, wie Hintergrundrauschen und Mismatches, sowie Probleme bei der Zuordnung dieser ermittelten Sequenzen zum gesuchten Allel auftreten, zum Beispiel beim Vorliegen sogenannter Ambiguitäten. Bei genortspezifischer Sequenzierung im Gegensatz zu allelspezifischer Sequenzierung werden beide Allele einer DNA-Probe im Auswerteprogramm überlappend dargestellt. An Positionen, an denen sich beide Allele eines Genortes durch einzelne Basen unterscheiden, sogenannte heterozygote Stellen, werden zwei verschiedene Basen überlappend an einer Position innerhalb einer Sequenz dargestellt. Treten diese heterozygoten Stellen an mindestens zwei Positionen der überlappend dargestellten Sequenz zweier Allele auf, kann nicht unterschieden werden, zu welcher einzelnen Sequenz die jeweilige Base gehört. Es entstehen in diesem Fall vier Kombinationsmöglichkeiten für die dargestellten Basen bei zwei heterozygoten Stellen einer überlappend dargestellten Sequenz. Folglich kommen auch vier verschiedene Allele als Resultat in Frage. Diese Resultatmöglichkeiten werden als Ambiguitäten bezeichnet.

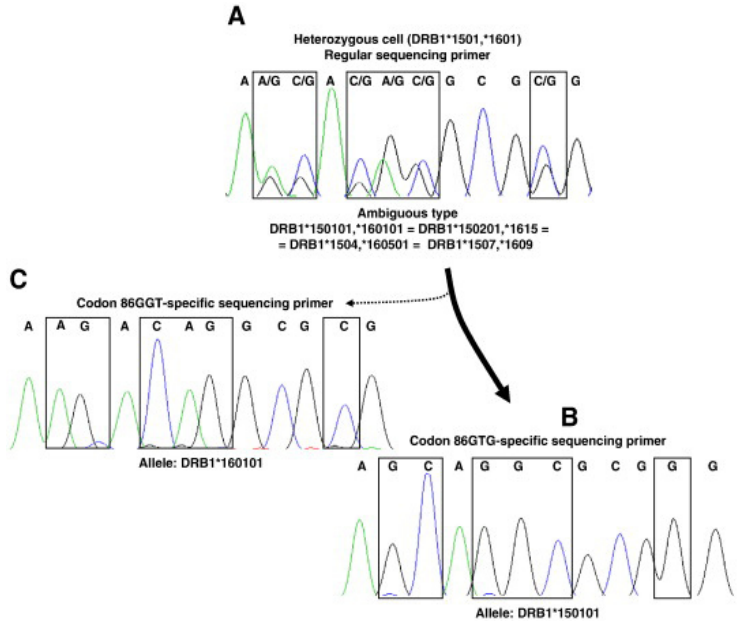


Abbildung 14: heterozygote Stellen und Ambiguitäten

In A ist eine Nukleotidsequenz einer heterozygoten Probe gezeigt (DRB1 *15:01,*16:01), mit insgesamt sechs heterozygoten Stellen, Positionen mit überlagerten Signalen zweier verschiedener Basen, welche durch Rechtecke markiert sind. Darunter sind, aufgrund der heterozygoten Stellen, mögliche Ambguitäten aufgeführt

In B und C sind die Nukleotidsequenzen der beiden Allele des heterozygoten Probanden jeweils getrennt dargestellt (B: Allel DRB1 *1501; C: Allel DRB1 *1601). sequenziert mit spezifischen Primern. Die Positionen der heterozygoten Stellen aus A sind auch in B und C mit Rechtecken markiert.

In A sind zwei Sequenzen überlappend dargestellt mit zahlreichen heterozygoten Stellen. In diesen heterozygoten Stellen sind jeweils zwei verschiedene Basen auf einer Position dargestellt. Liegen nur zwei heterozygote Stellen vor, sind bereits vier verschiedene Basenkombinationen möglich:

Position 10 16

AATGGCGTTAGGCTATGCCG

AATGGCGTTAGGCTACGCCG

AATGGCGTTGGGCTATGCCG

AATGGCGTTGGGCTACGCCG

Vier Beispielsequenzen bzw. Ambiguitäten, die sich aus zwei heterozygoten Stellen an den Positionen 10 (A/G) und 16 (T/C) ergeben.

Eine Deletion kann zu zahlreichen heterozygoten Stellen führen und damit eine Sequenzierung nicht auswertbar machen, wenn zwei Allele eines Genortes überlappend dargestellt werden, wobei die Deletion nur bei einem der beiden Allele vorliegt. Dies führt bei gleichzeitiger Sequenzierung der beiden Allele zu einer Verschiebung des Leserasters bei der nachfolgenden Analyse, bedingt durch die fehlenden Basen bei der durch die Deletion betroffenen Sequenz.

Bei Mismatches handelt es sich um dargestellte Basen einer ermittelten Sequenz, die nicht zum analysierten Allel passen. Sequenzier-Analyseprogramme geben nach Ermittlung einer Sequenz, die nicht eindeutig zuzuordnen ist, Ergebnisvorschläge, die nach Passgenauigkeit zu den Allelen der Datenbank geordnet sind, an. Abweichungen, also einzelne nicht zum vorgeschlagenen Allel passende Basen, werden als Mismatches bezeichnet.

Als Hintergrundrauschen bezeichnet man Stellen einer analysierten Sequenz, bei der mehrere Basen, oft mit niedriger Amplitude, also mit schwachem Signal, überlappend oder leicht versetzt übereinander dargestellt werden, was die Analyse des zu ermittelnden Allels deutlich erschwert oder sogar unmöglich machen kann.

Für diese drei Testreihen wurden, wie oben beschrieben, teilweise andere Amplifikations-Primermixe verwendet, als sie später in der Routinediagnostik und in den folgenden Validierungsversuchen verwendet wurden. Für die anschließenden Validierungsversuche wurden wieder ausschließlich die vier eingangs des Kapitels in Tabelle 8 erwähnten Amplifikations-Primermixe verwendet.

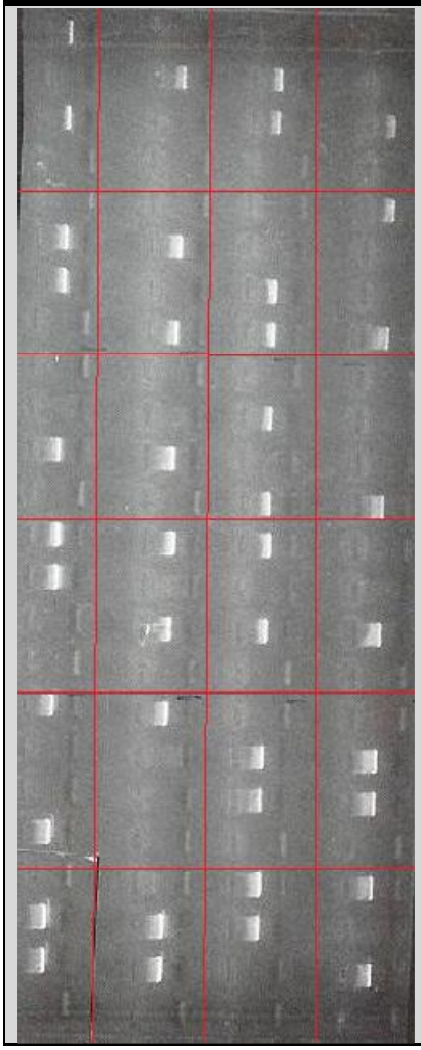
3.5 Validierung des Sequenzieransatzes

Nach erfolgreicher Entwicklung eines kompletten Sequenzieransatzes für den Genort HLA-DQB1 sollte eine finale Validierung anhand einer größeren Anzahl von Proben durchgeführt werden. Dazu wurden in einer einfach geblindeten, abschließenden Testreihe 100 vortypisierte DNA-Proben mit dem entwickelten Sequenzieransatz getestet. Die Studie wurde einfach geblindet durchgeführt um eine mögliche Beeinflussung der Resultate zu verhindern, was durch Bearbeiten, das sogenannte Editieren, der ermittelten Sequenzen im Rahmen der Auswertung mittels dem Analyse-Programm Sequence Pilot möglich wäre. So herrschten vor Testbeginn Bedingungen, wie sie bei der Routinediagnostik regelmäßig vorliegen, wenn Probanden erstmals typisiert werden.

3.5.1 Amplifikation

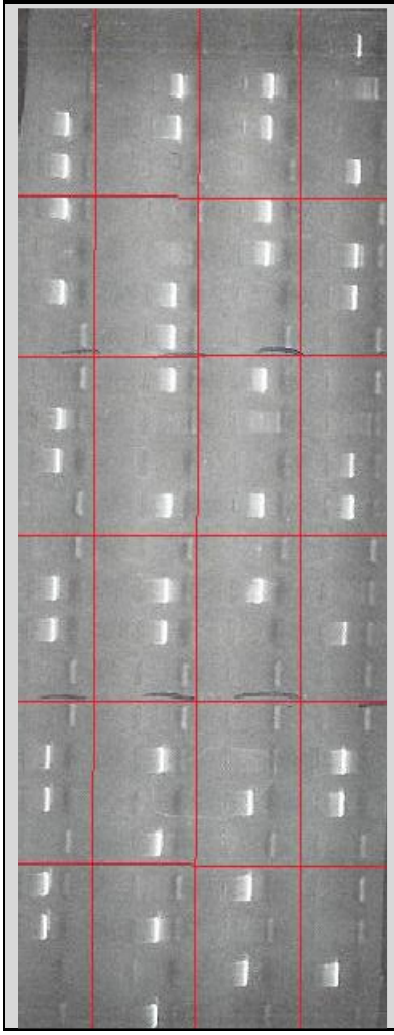
Zur Amplifikation wurden die vier Standard-Amplifikationsprimermixe verwendet, wie sie in Tabelle 8 dargestellt sind, mit dem einzigen Unterschied, dass die Primer diesmal vorab auf den entsprechenden 96-Well-PCR-Platten eingetrocknet wurden, wie oben bereits erläutert. Für diese letzte Testreihe wurden fünf 96-Well-PCR-Platten verwendet mit vier mal 24 und einmal 5 Proben, also insgesamt 101 Proben. Die Ergebnisse der Amplifikation waren sehr gut. Es kam lediglich zu einem falsch negativen Ergebnis.

Tabelle 18: Amplifikationsergebnisse Platte 1 nach Gelelektrophorese

Gel 1: R1 R2 R3 R4	Pos.	Mix	HLA-DQB1-Spezifität	R1	R2	R3	R4
	1	1	*05	pos.	-	-	-
	2	2	*06/*06:01	-	pos.	pos.	-
	3	3	*02/*03:01	pos.	-	pos.	pos.
	4	4	*03/*04	-	-	-	-
	5	1	*05	-	-	-	pos.
	6	2	*06/*06:01	pos.	pos.	-	-
	7	3	*02/*03:01	pos.	-	pos.	-
	8	4	*03/*04	-	pos.	pos.	pos.
	9	1	*05	-	-	-	-
	10	2	*06/*06:01	-	-	pos.	-
	11	3	*02/*03:01	pos.	pos.	-	-
	12	4	*03/*04	-	-	pos.	pos.
	13	1	*05	pos.	pos.	pos.	-
	14	2	*06/*06:01	pos.	-	-	-
	15	3	*02/*03:01	-	pos.	pos.	pos.
	16	4	*03/*04	-	-	-	-
	17	1	*05	pos.	pos.	-	-
	18	2	*06/*06:01	-	-	pos.	pos.
	19	3	*02/*03:01	-	-	pos.	pos.
	20	4	*03/*04	pos.	-	-	-
	21	1	*05	-	-	pos.	pos.
	22	2	*06/*06:01	pos.	pos.	pos.	-
	23	3	*02/*03:01	pos.	pos.	-	pos.
	24	4	*03/*04	-	-	-	-

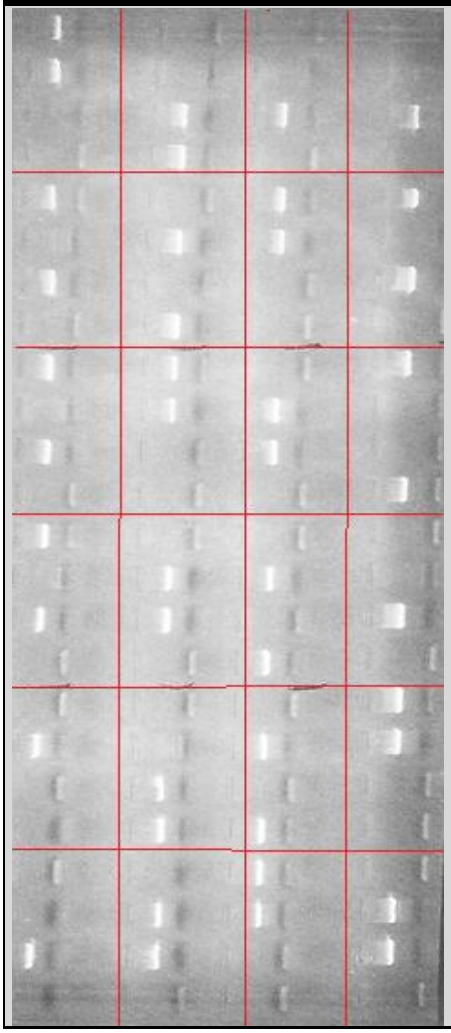
HLA = Humane Leukozytenantigene; Links unter dem Punkt „Gel 1“ ist ein Foto des Agarosegels nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Banden, welche unter UV-Licht fluoreszieren und damit sichtbar gemacht wurden. Die roten Trennlinien wurden zur leichteren Interpretation hinterher hinzugefügt. In der Horizontalen sollen sie Bereiche von jeweils vier Geltaschen untereinander sichtbar trennen. In der Vertikalen trennen die roten Linien das Bild in vier Reihen „R1-4“. Es wurden also von oben nach unten und von links nach rechts die Geltaschen mit den Reaktionsprodukten gefüllt. Der Aufbau der Tabelle richtet sich nach den Geltaschen, bzw. nach der Position der Banden. Dementsprechend stehen rechts neben dem Foto unter dem Punkt „Pos.“ die Positionen (1-24)der einzelnen Geltaschen, bzw. der DNA-Banden, jeweils einer Reihe „R1-4“. Unter „Mix“ stehen die bei der jeweiligen Position zum Einsatz gekommenen Amplifikationsprimermixe 1-4. Unter „HLA-DQB1 Spezifität“ stehen zur leichteren Interpretation die Allelspezifitäten der vorher erwähnten Amplifikationsprimermixe an den jeweiligen Positionen. Die Punkte „R1-4“ rechts zeigen die Positionen innerhalb der Reihen auf dem Gel mit positiven Reaktionen an, an denen also fluoreszierende DNA-Banden zu sehen sind.

Tabelle 19: Amplifikationsergebnisse Platte 2 nach Gelelektrophorese

Gel 2: R1 R2 R3 R4	Pos.	Mix	HLA-DQB1-Spezifität	R1	R2	R3	R4
	1	1	*05	-	-	-	pos.
	2	2	*06/*06:01	-	pos.	pos.	-
	3	3	*02/*03:01	pos.	pos.	pos.	-
	4	4	*03/*04	pos.	-	-	pos.
	5	1	*05	pos.	-	pos.	-
	6	2	*06/*06:01	-	-	pos.	pos.
	7	3	*02/*03:01	pos.	pos.	-	pos.
	8	4	*03/*04	-	pos.	-	-
	9	1	*05	-	pos.	pos.	-
	10	2	*06/*06:01	pos.	-	-	-
	11	3	*02/*03:01	pos.	-	-	pos.
	12	4	*03/*04	-	pos.	pos.	pos.
	13	1	*05	-	-	-	-
	14	2	*06/*06:01	pos.	pos.	pos.	-
	15	3	*02/*03:01	pos.	pos.	-	pos.
	16	4	*03/*04	-	-	-	-
	17	1	*05	-	-	-	-
	18	2	*06/*06:01	pos.	pos.	-	pos.
	19	3	*02/*03:01	pos.	-	pos.	pos.
	20	4	*03/*04	-	pos.	-	-
	21	1	*05	pos.	-	pos.	-
	22	2	*06/*06:01	pos.	pos.	-	-
	23	3	*02/*03:01	-	-	pos.	pos.
	24	4	*03/*04	-	pos.	-	-

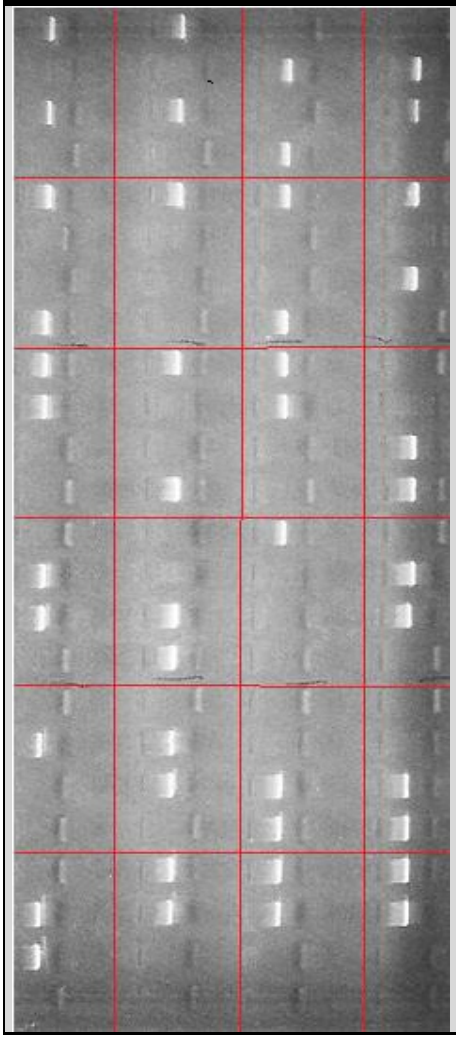
HLA = Humane Leukozytenantigene; Links unter dem Punkt „Gel 2“ ist ein Foto des Agarosegels nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Banden, welche unter UV-Licht fluoreszieren und damit sichtbar gemacht wurden. Die roten Trennlinien wurden zur leichteren Interpretation hinterher hinzugefügt. In der Horizontalen sollen sie Bereiche von jeweils vier Geltaschen untereinander sichtbar trennen. In der Vertikalen trennen die roten Linien das Bild in vier Reihen „R1-4“. Es wurden also von oben nach unten und von links nach rechts die Geltaschen mit den Reaktionsprodukten gefüllt. Der Aufbau der Tabelle richtet sich nach den Geltaschen, bzw. nach der Position der Banden. Dementsprechend stehen rechts neben dem Foto unter dem Punkt „Pos.“ die Positionen (1-24)der einzelnen Geltaschen, bzw. der DNA-Banden, jeweils einer Reihe „R1-4“. Unter „Mix“ stehen die bei der jeweiligen Position zum Einsatz gekommenen Amplifikationsprimermixe 1-4. Unter „HLA-DQB1 Spezifität“ stehen zur leichteren Interpretation die Allelspezifitäten der vorher erwähnten Amplifikationsprimermixe an den jeweiligen Positionen. Die Punkte „R1-4“ rechts zeigen die Positionen innerhalb der Reihen auf dem Gel mit positiven Reaktionen an, an denen also fluoreszierende DNA-Banden zu sehen sind.

Tabelle 20: Amplifikationsergebnisse Platte 3 nach Gelelektrophorese

Gel 3: R1 R2 R3 R4	Pos.	Mix	HLA-DQB1-Spezifität	R1	R2	R3	R4
	1	1	*05	pos.	-	-	-
	2	2	*06/*06:01	pos.	-	-	-
	3	3	*02/*03:01	-	pos.	pos.	pos.
	4	4	*03/*04	-	Pos.	-	-
	5	1	*05	pos.	-	pos.	pos.
	6	2	*06/*06:01	-	pos.	-	-
	7	3	*02/*03:01	pos.	-	pos.	pos.
	8	4	*03/*04	-	pos.	-	-
	9	1	*05	pos.	pos.	pos.	pos.
	10	2	*06/*06:01	-	pos.	-	-
	11	3	*02/*03:01	pos.	-	-	-
	12	4	*03/*04	-	-	pos.	pos.
	13	1	*05	pos.	-	-	-
	14	2	*06/*06:01	-	pos.	-	-
	15	3	*02/*03:01	pos.	pos.	pos.	pos.
	16	4	*03/*04	-	-	-	-
	17	1	*05	-	-	pos.	pos.
	18	2	*06/*06:01	pos.	-	pos.	pos.
	19	3	*02/*03:01	-	pos.	-	-
	20	4	*03/*04	-	pos.	-	-
	21	1	*05	-	-	-	-
	22	2	*06/*06:01	-	pos.	pos.	pos.
	23	3	*02/*03:01	pos.	pos.	pos.	pos.
	24	4	*03/*04	-	-	-	-

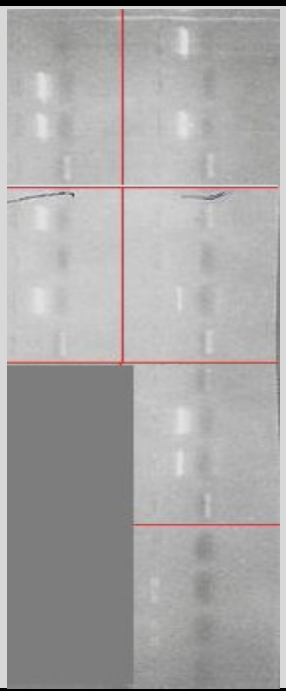
HLA = Humane Leukozytenantigene; Links unter dem Punkt „Gel 3“ ist ein Foto des Agarosegels nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Banden, welche unter UV-Licht fluoreszieren und damit sichtbar gemacht wurden. Die roten Trennlinien wurden zur leichteren Interpretation hinterher hinzugefügt. In der Horizontalen sollen sie Bereiche von jeweils vier Geltaschen untereinander sichtbar trennen. In der Vertikalen trennen die roten Linien das Bild in vier Reihen „R1-4“. Es wurden also von oben nach unten und von links nach rechts die Geltaschen mit den Reaktionsprodukten gefüllt. Der Aufbau der Tabelle richtet sich nach den Geltaschen, bzw. nach der Position der Banden. Dementsprechend stehen rechts neben dem Foto unter dem Punkt „Pos.“ die Positionen (1-24)der einzelnen Geltaschen, bzw. der DNA-Banden, jeweils einer Reihe „R1-4“. Unter „Mix“ stehen die bei der jeweiligen Position zum Einsatz gekommenen Amplifikationsprimermixe 1-4. Unter „HLA-DQB1 Spezifität“ stehen zur leichteren Interpretation die Allelspezifitäten der vorher erwähnten Amplifikationsprimermixe an den jeweiligen Positionen. Die Punkte „R1-4“ rechts zeigen die Positionen innerhalb der Reihen auf dem Gel mit positiven Reaktionen an, an denen also fluoreszierende DNA-Banden zu sehen sind.

Tabelle 21: Amplifikationsergebnisse Platte 4 nach Gelelektrophorese

Gel 4: R1 R2 R3 R4	Pos.	Mix	HLA-DQB1-Spezifität	R1	R2	R3	R4
	1	1	*05	pos.	pos.	-	-
	2	2	*06/*06:01	-	-	pos.	pos.
	3	3	*02/*03:01	pos.	pos.	-	pos.
	4	4	*03/*04	-	-	pos.	-
	5	1	*05	pos.	pos.	pos.	pos.
	6	2	*06/*06:01	-	-	-	-
	7	3	*02/*03:01	-	-	-	pos.
	8	4	*03/*04	pos.	-	pos.	-
	9	1	*05	pos.	pos.	pos.	-
	10	2	*06/*06:01	pos.	-	pos.	-
	11	3	*02/*03:01	-	-	-	pos.
	12	4	*03/*04	-	pos.	-	pos.
	13	1	*05	-	-		-
	14	2	*06/*06:01	pos.	-	-	pos.
	15	3	*02/*03:01	pos.	pos.	-	pos.
	16	4	*03/*04	-	pos.	-	-
	17	1	*05	-	-	-	-
	18	2	*06/*06:01	pos.	pos.	-	-
	19	3	*02/*03:01	-	pos.	pos.	pos.
	20	4	*03/*04	-	-	pos.	pos.
	21	1	*05	-	pos.	pos.	pos.
	22	2	*06/*06:01	pos.	pos.	pos.	pos.
	23	3	*02/*03:01	pos.	-	-	-
	24	4	*03/*04	-	-	-	-

HLA = Humane Leukozytenantigene; Links unter dem Punkt „Gel 4“ ist ein Foto des Agarosegels nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Banden, welche unter UV-Licht fluoreszieren und damit sichtbar gemacht wurden. Die roten Trennlinien wurden zur leichteren Interpretation hinterher hinzugefügt. In der Horizontalen sollen sie Bereiche von jeweils vier Geltaschen untereinander sichtbar trennen. In der Vertikalen trennen die roten Linien das Bild in vier Reihen „R1-4“. Es wurden also von oben nach unten und von links nach rechts die Geltaschen mit den Reaktionsprodukten gefüllt. Der Aufbau der Tabelle richtet sich nach den Geltaschen, bzw. nach der Position der Banden. Dementsprechend stehen rechts neben dem Foto unter dem Punkt „Pos.“ die Positionen (1-24)der einzelnen Geltaschen, bzw. der DNA-Banden, jeweils einer Reihe „R1-4“. Unter „Mix“ stehen die bei der jeweiligen Position zum Einsatz gekommenen Amplifikationsprimermixe 1-4. Unter „HLA-DQB1 Spezifität“ stehen zur leichteren Interpretation die Allelspezifitäten der vorher erwähnten Amplifikationsprimermixe an den jeweiligen Positionen. Die Punkte „R1-4“ rechts zeigen die Positionen innerhalb der Reihen auf dem Gel mit positiven Reaktionen an, an denen also fluoreszierende DNA-Banden zu sehen sind.

Tabelle 22: Amplifikationsergebnisse Platte 5 nach Gelelektrophorese

Gel 5: R1 R2	Pos.	Mix	HLA-DQB1-Spezifität	R1	R2
	1	1	*05	-	pos.
	2	2	*06/*06:01	pos.	-
	3	3	*02/*03:01	pos.	pos.
	4	4	*03/*04	-	-
	5	1	*05	pos.	A
	6	2	*06/*06:01	-	-
	7	3	*02/*03:01	pos.	pos.
	8	4	*03/*04	-	-
	9	1	*05	-	-
	10	2	*06/*06:01	-	pos.
	11	3	*02/*03:01	-	pos.
	12	4	*03/*04	-	-
	13	1	*03/*04	-	-
	14	2	*02/*03:01	-	pos.
	15	3	*06/*06:01	-	pos.
	16	4	*05	-	-

HLA = Humane Leukozytenantigene; Links unter dem Punkt „Gel 5“ ist ein Foto des Agarosegels nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Banden, welche unter UV-Licht fluoreszieren und damit sichtbar gemacht wurden. Die roten Trennlinien wurden zur leichteren Interpretation hinterher hinzugefügt. In der Horizontalen sollen sie Bereiche von jeweils vier Geltaschen untereinander sichtbar trennen. In der Vertikalen trennen die roten Linien das Bild in zwei Reihen „R1-2“. Es wurden also von oben nach unten und von links nach rechts die Geltaschen mit den Reaktionsprodukten gefüllt. Der Aufbau der Tabelle richtet sich nach den Geltaschen, bzw. nach der Position der Banden. Dementsprechend stehen rechts neben dem Foto unter dem Punkt „Pos.“ die Positionen (1-16)der einzelnen Geltaschen, bzw. der DNA-Banden, jeweils einer Reihe „R1-2“. Unter „Mix“ stehen die bei der jeweiligen Position zum Einsatz gekommenen Amplifikationsprimermixe 1-4. Unter „HLA-DQB1 Spezifität“ stehen zur leichteren Interpretation die Allelspezifitäten der vorher erwähnten Amplifikationsprimermixe an den jeweiligen Positionen. Die Punkte „R1-2“ rechts zeigen die Positionen innerhalb der Reihen auf dem Gel mit positiven Reaktionen an, an denen also fluoreszierende DNA-Banden zu sehen sind. Das rot markierte A steht dabei für „Ausfall“, da an dieser Position nicht die erwartete Bande zu sehen ist.

Tabelle 23: Zusammenfassung abschließende Validierung, Amplifikation

Primermix	Allelgruppen-Spezifisch	falsch negativ	falsch positiv	korrekt	Gesamt Proben
1	05	1	0	14	15
2	06/06:01	0	0	27	27
3	02/03:01	0	0	34	34
4	03/04	0	0	16	16

Damit war eine zuverlässige Funktionsweise der getrockneten Amplifikationsprimer und der entsprechenden vier Primer-Mixe gewährleistet. Die Amplifikationsprimer konnten Allele sämtlicher Allelgruppen aus HLA-DQB1 sicher amplifizieren.

3.5.2 Sequenzierung, Problemlösung und Gesamtergebnisse

Bei der Auswertung der Sequenzen oben aufgezeichneter Amplifikate kam es bei Proben mit der heterozygoten Allelkombination *02:01/02:02/02:03 mit *03:01 zu Ausfällen, wobei oft nur eines der beiden Allele nachgewiesen werden konnte. Bemerkenswert ist hier, dass es bei Allelkombinationen welche nur eines der beiden genannten Allele in Kombination mit einem anderen Allel enthielten, zu keinen Schwierigkeiten bei der Sequenzierung gekommen ist. Dies deutete auf eine präferentielle Amplifikation hin, d.h. die entwickelten Primer konnten diese Allele einzeln nachweisen, allerdings wenn beide Allelgruppen (*02:01/02:02/02:03 und *03:01) gemeinsam in einem Ansatz amplifiziert werden sollten, kam es zur bevorzugten Amplifizierung eines der beiden Allele. Dies fiel in den Vorversuchen aufgrund der deutlich geringeren Probenzahl nicht sofort auf. Nun galt es die Ursache zu finden, warum die Allele *02:01/02:02/02:03 und *03:01 in Kombination nicht richtig analysiert werden konnten. Es kam nun zu dem Verdacht, dass bei dieser Kombination regelmäßig eines der beiden Allele in zu geringen Mengen amplifiziert wird, was zu Nachweisschwierigkeiten in der nachfolgenden Sequenzierreaktion führt, da von einem der beiden Allele zu wenig Ausgangsmaterial (oder Sequenziermatrix) zur Sequenzierung vorhanden ist. Wie oben erwähnt dient die Primerkombination L3 + R3 + R4 zur Amplifikation der Kombination *02:01/02:02/02:03 und *03:01. Dabei werden von jedem

Primer 0,7µl der Verdünnung 10pmol/µl in den Amplifikationsmix hinzugegeben, so dass die Gesamtmenge von 2µl Primer pro Mix konstant bleibt. Der L3 (5´) Vorwärtsprimer amplifiziert beide Allele und ist in diesem Fall unspezifisch, wohingegen die beiden (3´) Rückwärtsprimer R3 und R4 spezifisch für jeweils eines der beiden Allele sind. Für die folgenden Versuche wurde die Menge der spezifischen Rückwärtsprimer zu Gunsten des für das Allel *03:01 spezifischen Primers R4 modifiziert, da das Allel *03:01 am häufigsten durch die erwähnten Ausfälle betroffen war:

L3+R3+R4 / 0,5µl+0,5µl+1µl

In den folgenden Versuchen mit dem entsprechend modifizierten Amplifikationsprimermix 3 konnten, nach initialer Amplifikation der gewählten Proben, in der anschließenden Sequenzierreaktion die Allele HLA-DQB1 *02 und *03:01 erfolgreich dargestellt werden. Erwähnenswert ist, dass es beim Nachweis der Allele der Gruppe *06, also bei *06:01 und den restlichen Allelen im *06 Bereich, nicht zu ähnlichen Schwierigkeiten gekommen ist, obwohl der Amplifikationsprimermix hierfür auch aus drei Primern, diesmal einem unspezifischen Rückwärtsprimer und zwei spezifischen Vorwärtsprimern besteht.

Insgesamt konnten jetzt bis auf ein Allel HLA-DQB1 *03:02 der Probe 08204590 mit der Kombination DQB1 *03:02/*05:01 alle Proben erfolgreich mit dem entwickelten und nachträglich teilweise modifizierten Testansatz nachgewiesen werden.

Es zeigte sich bei der Sequenzierung der erwähnten Probe im ersten Versuch, wie auch im Wiederholungsversuch, dass das Allel *03:02 nur mit dem entsprechenden Rückwärtsprimer nachgewiesen werden konnte, nicht aber mit dem entwickelten Vorwärts-Sequenzier-Primer. Da keine anderen Proben mit diesem Allel oder gleicher Allelegruppenkombination zu derartigen Problemen führten, musste es sich um ein spezifisches Problem dieser Probe handeln. Die Sequenzierung der Intronsequenzen des Allels der betroffenen Probe bestätigte diesen Verdacht. Es lagen hier zwei Mutationen im Intron 1 vor, die beide genau im sensiblen Bereich der Primeransatzstelle der Vorwärtsprimer lagen, wobei eine Mutation die Ansatzstelle des Amplifikationsprimers, die andere die Ansatzstelle des Sequenzierprimers betraf.

Ergebnisse der Sequenzierung der Probe 08204590:

Amplifikationsprimer

Basenabfolge des Consensus-DNA Einzelstranges bzw. des Primers

GCR GAT TCC SGA AGC CCC CAG

GCG GAA TCC CGA AGC CCC CAG

Basenabfolge des DNA Einzelstranges der Probe an gleicher Stelle

Sequenzierprimer

Basenabfolge des Consensus-DNA Einzelstranges bzw. des Primers

CGC GGG CKT TTC CAC AGC

CGC GGG CGG TTC CAC AGC

Basenabfolge des DNA Einzelstranges der Probe an gleicher Stelle

(Rot dargestellt die durch die Mutationen veränderten Basen der Probe 08204590)

Damit war die Ursache für die negativen Testergebnisse der Probe 08204590 bei der Sequenzierung mit dem Forwärtsprimer 1a nachgewiesen. Der entwickelte Vorwärts Sequenzierprimer konnte aufgrund der Mutationen im Intron 1 nicht mit dem komplementären DNA-Einzelstrang hybridisieren. Ein Sachverhalt, der offensichtlich bei der Amplifikation nicht zum Tragen kam, da die Mutation im Intron 1 eine weniger sensible Stelle des entsprechenden Primers betrifft.

Eine Anschlussstudie, die nicht mehr zum offiziellen Teil dieser Arbeit gehört, sollte nun klären, ob besagte Mutationen im Intron 1 des Allels HLA-DQB1*03:02 häufiger auftreten, was bisher nicht bekannt war. Hierbei sollten weitere Proben mit jeweils einem Allel *03:02 mittels neuem Sequenzieransatz, zum Nachweis der Intron 1 Sequenz, untersucht werden. Allein in den 100 verwendeten Proben der vorliegenden Versuchsreihe waren 21 Proben mit dem Allel *03:02 enthalten, von denen, wie bereits erwähnt, nur eine diese Mutationen zeigte. Weitere 20 Versuche konnten auch keine Mutationen nachweisen.

Insgesamt zeigten die Validierungsversuche, nachdem die oben erwähnten Probleme aufgeklärt werden konnten, zufriedenstellende Ergebnisse. Sämtliche entwickelten Vorwärts- und Rückwärtsprimer funktionierten tadellos, sowohl bei der Amplifikation als auch bei

der Sequenzierung. Die gewonnenen Sequenzen sind von guter bis sehr guter Qualität mit wenigen Mismatches und je nach Probe mit sehr wenig bis keinem Hintergrundrauschen. Im Tabellen Anhang sind die Sequenzierergebnisse der Proben, die zur Validierung eingesetzt wurden, tabellarisch dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Molekularbiologische Nachweismethoden im Vergleich

Molekularbiologische Typisierungsverfahren sind mittlerweile weltweit fest in der Routinediagnostik zum Nachweis von HLA-Genen etabliert. Sie haben das höchste Auflösungsvermögen und sind damit anderen Testverfahren überlegen, was im Rahmen von Transplantationen, auch vor dem Hintergrund einer ständig wachsenden Zahl neuer Allele der verschiedenen HLA-Gene, erforderlich ist [4,5,22,31]. Innerhalb der drei wichtigen molekularbiologischen Nachweismethoden, PCR-SSP, PCR-SSO und die Sequenzanalyse, gibt es wichtige Unterschiede und damit Vor- und Nachteile.

Für HLA-Nachweis auf hohem Auflösungsniveau mittels PCR-SSP werden viele Primermixe verwendet, was zu einer hohen Anzahl an nötigen PCR-Reaktionen führt. Dies wiederum hat den Nachteil, dass sehr viel Probenmaterial für die diversen Reaktionen benötigt wird. So beschreibt Olerup et. al. in seiner Arbeit aus dem Jahr 1993, dass für die komplette Analyse von HLA-DQB1 mittels PCR-SSP Verfahren nicht weniger als 22 Einzelreaktionen nötig waren. Hierzu mussten entsprechend 22 Primerpaare entwickelt und eingesetzt werden [21]. Das Aufspüren neuer Allele ist mit dem PCR-SSP Verfahren nur begrenzt möglich. Unterscheidet sich ein neues Allel einer Gruppe von einem anderen Allel nur im Exon jedoch nicht an der Primeransatzstelle im Intron führt dies zwar zu einer positiven Amplifikationsreaktion, jedoch ohne dass dabei erkannt wird, dass es sich bei dem nachgewiesenen Allel um ein neues, bisher nicht beschriebenes, handelt.

Auch das PCR-SSO Verfahren birgt einige Limitationen in sich [4]. Bei diesem Verfahren ist der Nachweis neuer Allele ebenfalls schwierig. Unterscheiden sich ein bekanntes und ein neues Allel in einem Bereich des Exon, der von den eingesetzten Oligonukleotidsonden nicht erfasst wird, so ist eine Differenzierung nicht möglich. Gleiches gilt auch für bereits bekannte Allele, die sich ebenfalls in einem Bereich des Exon unterscheiden, der von den relativ kurzen, etwa 15-25 Basen langen, Oligonukleotidsonden nicht erfasst wird. Zum Vergleich ist das „Exon 2“ über 200 Basen lang. Hier sieht man sofort den Nachteil dieses

Verfahrens. Möchte man diesem entgegen wirken, muss man die Anzahl der Oligonukleotidsonden erhöhen, sowie die Anzahl der PCR-Reaktionen, in dem man z.B. den Nachweis von Exon 3 und 4 in die Analyse mit einschließt, was die Zahl nötiger PCR-Reaktionen deutlich erhöhen würde. Desweiteren ist es durchaus möglich, dass durch nicht optimale Hybridisierungsbedingungen nicht vollständig komplementäre Amplifikate an den Oligonukleotidsonden binden, was zu falschen Ergebnissen führen würde.

4.2 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse hat sich als Standard-Analyse und Typisierungsverfahren immer mehr in der Routinediagnostik durchgesetzt [31]. Es bietet die bestmögliche Auflösung mit der Möglichkeit durch die direkte Analyse der Basenabfolge, neue Allele nachzuweisen. Generell gibt es zwei unterschiedliche Herangehensweisen an die Analyse mittels Sequenzierung, in Abhängigkeit von den vorher durchgeführten Amplifikationsreaktionen, die im Folgenden erläutert werden sollen.

4.2.1 Genortspezifische Sequenzieransätze

Genortspezifische Sequenzieransätze verwenden Primer, sowohl zur Amplifikation, als auch zur Sequenzierung, die für einen bestimmten Genort spezifisch sind, nicht aber für die verschiedenen Allelgruppen des Genortes. Es werden also alle Allele bzw. Allelgruppen eines Genortes durch den verwendeten Primermix erfasst, was dieses Verfahren relativ einfach gestaltet. Nach Sequenzierung und Analyse mittels Kapillarelektrophorese werden beide Allele eines Genortes in einer heterozygoten Sequenz durch das Auswertungsprogramm dargestellt. Dies hat den Nachteil, dass oft die verschiedenen Basen einer heterozygoten Stelle nicht eindeutig einem der beiden Allele zugeordnet werden können. Die sogenannte cis-trans-Positionierung der Basen ist dann nicht eindeutig zuzuordnen. Dies ist gerade bei zwei oder mehreren heterozygoten Positionen der Fall. Es ergeben sich bei zwei heterozygoten Stellen bereits vier mögliche Basenkombinationen in einer Sequenz, die jeweils für ein Allel, also insgesamt vier Allele stehen. Bei diesen vier verschiedenen möglichen Allelen spricht man dann von Ambiguitäten, wie bereits im Ka-

pitel 3 „Ergebnisse“ ausführlich erläutert. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, dass auch hier manche neuen Allele nicht nachgewiesen werden können, da eine eindeutige Zuordnung der cis-trans-Positionierungen nicht möglich ist. Neue Allele entstehen laufend durch Mutation und Rekombination, was zu einer ständig wachsenden Zahl bekannter Allele eines Genortes führt. Neue Allele, die durch eine Rekombination von bereits beschriebenen Sequenzen anderer Allele entstanden wären, würden nicht als neu detektierbar sein. Die neuen Allele können dabei durchaus Relevanz im Rahmen einer Transplantation erlangen, wenn ein neues Allel zu einem veränderten Phänotyp führt, mit den entsprechend möglichen klinischen Folgen. Stammzelltransplantationen stellen eine wichtige Therapiemöglichkeit hämatologischer Erkrankungen dar. Es zeigte sich jedoch im Rahmen klinischer Studien eine signifikant erhöhte Frühmortalität, sowie ein höheres Risiko einer Graft-versus-Host-Disease unter den Empfängern nach erfolgter Stammzelltransplantation, bei nicht vollständig HLA-identischen Spendern, wie in der Arbeit von W. Saber et. al. aus dem Jahre 2012 beschrieben [30]. Auch He J et. al. kam in seiner Arbeit über die Auswirkungen von Mismatches bei hochauflösender HLA-Analyse auf das Überleben nach hämatopoeitischer Stammzelltransplantation von nicht verwandten Empfängern und Spendern, zu vergleichbaren Ergebnissen [14].

Ein Vorteil des genortspezifischen Sequenzieransatzes ist wiederum, dass homozygote Sequenzen eindeutig als solche ermittelt werden können. Das bedeutet, wenn in einer Vortypisierung fälschlicherweise ein homozygotes Ergebnis entstanden wäre, wobei ein Allel fehlerhaft nicht typisiert wurde, würde das bisher nicht typisierte Allel in einem genortspezifischen Ansatz mit amplifiziert und sequenziert werden und so auch nachgewiesen werden.

4.2.2 Allelgruppenspezifische Sequenzieransätze

Bei der allelgruppenspezifischen Sequenzierung werden die beiden Allele eines Genortes in unterschiedlichen Ansätzen sequenziert, was zu zwei hemizygoten Sequenzen in der Darstellung nach elektrophoretischer Analyse führt. Somit ist die cis-trans-Positionierung möglicher heterozygoter Stellen, die bei überlappender Darstellung entstehen können,

eindeutig möglich. Dadurch ist auch die Entdeckung, bzw. der Nachweis neuer Allele möglich. Dies wäre beim Nachweis einer homozygoten, optisch einwandfreien (ohne störende, starke Hintergrundpeaks bzw. ohne Hintergrundrauschen) Sequenz, bei der nach Auswertung keine Zuordnung zu bereits bekannten Allelen möglich ist, der Fall. Da bei diesem Verfahren immer nur zwei hemizygote Sequenzen entstehen, bleiben diese Sequenzen auch beim Vorliegen schwacher Hintergrundpeaks, also irrtümlicherweise vorliegender Signale anderer Basen, auswertbar. Beim genortspezifischen Verfahren müsste man hier immer auch eine mögliche heterozygote Stelle bedenken. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass falsch homozygot vortypisierte Proben als solche nicht erkannt werden. Wurde also ein Allel, welches bereits bei einer Vortypisierung irrtümlicher Weise nicht analysiert wurde, erneut nicht analysiert, fällt dies bei homozygoten Ergebnissequenzen nicht auf.

4.2.3 Sequenzieransatz dieser Arbeit

Der Sequenzieransatz dieser Arbeit verwendet zum Nachweis von HLA-DQB1 eine Kombination beider vorher genannten Verfahren. Die Amplifikation wird dabei mit allelgruppenspezifischen Primermixen und die folgende Sequenzierung mit genortspezifischen Sequenzierprimern durchgeführt. Allerdings wurde die Allelgruppenspezifität der Primermixe zur Amplifikation bei diesem Ansatz absichtlich etwas eingeschränkt. Aus den verwendeten Amplifikationsprimern können statt vier auch bis zu sieben Mixe hergestellt werden um sämtliche Allelgruppen bzw. Allele, die sich nicht so leicht einer Gruppe zuordnen lassen, wie die Allele *03:01 und *06:01, nachzuweisen. Aus praktikabilitätsgründen verzichteten wir bei dieser Arbeit auf die maximal mögliche Allelgruppenspezifität und fassten die vorhandenen Primer zu vier Mixen zusammen, was uns, wie bereits im Teil „Material und Methoden“ erwähnt, ermöglicht, eine Standard- 96-Well-PCR-Platte voll auszunützen. So ist es durch entsprechende Anordnung der vier Primermixe möglich, bis zu 24 Proben auf diesen 12 x 8 (=96)PCR- Platten zu untersuchen. Dies ist ohne weiteres möglich, da bei der nachfolgenden Sequenzierung genortspezifische Primer verwendet werden. Es kommt also nicht zu dem Szenario, dass bei einer positiven Reaktion eines

Amplifikationsmix (z.B. Mix 3), welcher zwei verschiedene Allelgruppen nachweist (in dem Fall *02 und *03:01), versehentlich der falsche Sequenzierprimer für die weitere Nachweisreaktion verwendet wird (z.B. der Primer für *03:01 bei tatsächlich vorliegendem Allel *02:01). Bei der Sequenzierung wurden absichtlich genortspezifische Primer verwendet um die Reaktion möglichst einfach zu halten. Dabei muss ein Kompromiss eingegangen werden, da wir zwei Rückwärtsprimer von der Arbeitsgruppe um P.P.J. Dunn et. al., mit unterschiedlichen Spezifitäten im Bereich HLA-DQB1, modifiziert übernommen haben [10]. Hier war es aufgrund der hochpolymorphen Intron 2 Sequenz nicht möglich, einen passenden genortspezifischen Primer zu entwickeln, welcher zuverlässig sämtliche Allelgruppen nachweisen könnte. In der Sequenz des Intron 1 bestehen ähnliche Bedingungen, es ist aber erfreulicherweise gelungen hier einen einzelnen Vorwärtsprimer, der sicher alle Allelgruppen nachweisen kann, zu entwickeln. Einen passenden Vorwärtsprimer zu entwickeln war wichtiger Bestandteil dieser Arbeit um die Analysesicherheit zu erhöhen, da bei unklarem Ergebnis oder sogar Ausfall in der Sequenzierung mit einem Rückwärtsprimer noch die Möglichkeit bestünde, ein zuverlässiges Ergebnis durch den Vorwärtsprimer zu bekommen. Darüber hinaus schreiben Qualitätsstandards in der HLA-Diagnostik mittels Sequenzierung die Erfassung von Vor- und Rückwärtssequenzen vor.

Zu den Schwächen dieses Ansatzes gehört die nicht vollständige Allelgruppenspezifität der verwendeten Amplifikationsprimermixe. Mix drei und Mix vier werden zum Nachweis der Allelgruppen HLA-DQB1*02 bzw. *03:01 und *03 bzw. *04 verwendet. Dies kann in der hier eingesetzten Kombination mit genortspezifischen Sequenzierprimern zu Problemen führen. Sind beide Allele eines zu analysierenden Genortes jeweils aus Allelgruppen, die durch den gleichen Amplifikationsprimermix nachgewiesen werden, kommt es bei der folgenden genortspezifischen Sequenzierung zu heterozygoten Ergebnissen. Für den Fall, dass solche Ergebnissequenzen mehr als eine heterozygote Stelle enthalten und damit Ambiguitäten vorliegen, liegen die oben beschriebenen Schwierigkeiten in der sicheren Bestimmung des richtigen Allels vor. In diesem Fall könnte man den Ansatz mit Trennung der PCR-Primer wiederholen, um die einzelnen Gruppen zu differenzieren. Ein zweites Problem bei heterozygoten Sequenzen stellen die schwachen Hintergrundpeaks dar, also

irrtümlicherweise an einer Stelle zusätzlich auftretende Basensignale. Hier kann die Unterscheidung von wahrer heterozygoter Stelle oder Hintergrundpeak schwer sein. Darüber hinaus ist auch der Nachweis neuer Allele beim Auftreten heterozygoter Sequenzen nicht sicher auf Grund der ebenfalls nicht immer möglichen Zuordnung der cis-trans-Positionen.

Die Vorteile des entwickelten Testansatzes liegen in der relativ einfachen Durchführbarkeit bei sehr hoher Auflösung. Speziell bei der Sequenzierung sind wenige Ansätze erforderlich aufgrund des genortspezifischen Verfahrens, was die Gesamtzeit zum Nachweis verringert und Reagenzien für den Ansatz spart. Durch die allelgruppenspezifischen Amplifikationsreaktionen werden, mit den oben erwähnten Ausnahmen, weitestgehend die Nachteile des Genortspezifischen Sequenzieransatzes vermieden. Es ist, abgesehen von Fällen bei denen beide Allele eines Genortes mit demselben Amplifikationsprimermix reagieren, möglich neue Allele nachzuweisen. Wie bereits erklärt, überwiegen für die Routinediagnostik, mit einer hohen Zahl an zu bearbeitender Proben, die Vorteile bei der Verwendung von lediglich vier Amplifikationsprimermixen, was die Allelgruppenspezifität etwas einschränkt. Bei strittigen Fällen besteht aber die Möglichkeit die genannten Amplifikationsprimermixe drei und vier weiter aufzutrennen um bestimmte Allele genauer nachweisen zu können.

4.3 Validierung

Zur Bestätigung der sicheren Funktionsweise des entwickelten Sequenzieransatzes für den Genort HLA-DQB1 war es nach den Vorversuchen, welche die Funktionstüchtigkeit des Ansatzes zeigten, erforderlich, diesen Ansatz mit einer bestimmten Anzahl an neuen vortypisierten Proben zu testen. Dazu verwendeten wir 100 Proben welche sämtliche Allele der verschiedenen Allelgruppen des Genortes HLA-DQB1 in möglichst ausgewogener Zahl enthielten. Die Anzahl der Proben für den Bestätigungsversuch wurde so gewählt, dass Interpretationsfehler bei Ausfällen oder falschen Ergebnissen möglichst vermieden werden, wie sie bei einer sehr kleinen Anzahl an Gesamtproben auftreten können. In einer einfach geblindeten Studie wurden durch eine nicht mit dem Prüfer identi-

sche Person 100 vortypisierte Proben ausgewählt, die anschließend analysiert wurden. Die Studie wurde nicht doppelt geblindet durchgeführt, da in Anbetracht der natürlichen Häufigkeit der verschiedenen Allele des Genortes HLA-DQB1 die Gefahr bestanden hätte, das bestimmte Allele bzw. Allelgruppen gar nicht getestet worden wären, aufgrund ihrer Seltenheit. Die Ergebnisse der Vortypisierung der ausgewählten Proben wurden im Rahmen der Routinediagnostik durch das PCR-SSO (Luminex) Verfahren ermittelt. Am Ende wurden die durch den neuen Sequenzieransatz ermittelten Ergebnisse mit den Ergebnissen der Vortypisierung verglichen. Hier zeigte sich die zuverlässige Funktionsweise des entwickelten Verfahrens.

4.4 Klinische Relevanz

Die Knochenmarktransplantation stellt bei hämatoonkologischen Erkrankungen häufig die Therapie der Wahl dar. Dabei ist die Knochenmarktransplantation ein potentiell kurativer Therapieansatz. Es kommt hierbei sehr häufig zu Knochenmarkspenden von nicht verwandten Spendern, da oft keine passenden, nahe verwandten Spender gefunden werden [11]. Im Rahmen steigender Transplantationszahlen weltweit kann man in den letzten Jahren diverse Entwicklungen beobachten. Generell steigt die Anzahl älterer Patienten die transplantiert werden [11]. Desweiteren erlangt die Transplantation von peripheren Blutstammzellen zunehmende Bedeutung und so haben sich periphere Blutstammzellen mittlerweile als „Hauptspendematerial“ durchgesetzt [11]. Darüber hinaus steigt der Bedarf an nicht verwandten Knochenmarkspenden stetig [11]. HLA Oberflächenantigene spielen hier, wie bereits erwähnt, eine zentrale Rolle im Bereich der zellvermittelten und der humoralen Transplatatabstoßung [33]. Oft muss man auf der Suche nach geeigneten Spendern Kompromisse eingehen und dabei akzeptieren, dass es zu einzelnen „Mismatches“ zwischen Spendern und Empfängern, also zu einer nicht vollständigen Übereinstimmung der HLA-Antigene bzw. Allele kommt. In solchen Fällen ist das Risiko von Abstoßungsreaktionen und Graft versus Host Erkrankungen besonders hoch, was diverse klinische Studien bereits bestätigt haben [11,14,19,23,24,25,26]. Hier zeigte sich, dass neben HLA der Klasse I auch die HLA der Klasse II eine wichtige Rolle für den Erfolg oder Misserfolg einer Knochenmarktransplantation spielen [24,26]. Die Arbeitsgruppe um Effie W. Petersdorf

konnte hier in einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 1996 zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit nach erfolgter, nichtverwandter Knochenmarktransplantation eine schwerwiegende GVHD (Grad III-IV) zu entwickeln, deutlich höher ist bei nicht vollständig übereinstimmenden HLA DQB1 Allelen zwischen Spender und Empfänger [26]. Selbst bei nur einem HLA-DQB1 Mismatch lag das relative Risiko eine akute GVHD zu entwickeln in dieser Sudie bei 1,8 (p = 0,01)[26]. Somit trägt die HLA Typisierung, speziell auch im Bereich von HLA-DQB1, entscheidend zum Erfolg einer Knochenmarktransplantation bei.

4.5 Ausblick - Next Generation Sequencing (NGS)

Next generation sequencing (NGS) ist eine neue Sequenziertechnik, die es erlaubt eine sehr große Anzahl klonaler Sequenzen in einem einzelnen Sequenziervorgang herzustellen [8,12,13]. Initial wurde diese Technik in der Forschung eingeführt um das gesamte menschliche Genom sequenzieren zu können („whole genome sequencing“) und um zum Beispiel genetische Variationen im Tumorgewebe diverser Tumoren besser bestimmen zu können [12]. In jüngster Zeit wurde zunehmend das Potential der NGS-Methoden im Hinblick auf eine hochauflösende HLA-Typisierung mit einem möglichst hohen Durchsatz evaluiert. Bislang ist die Sequenzanalyse nach der Methode von Fred Sanger der Goldstandart in der HLA-Diagnostik. Dabei birgt diese Methode die bereits erwähnten Probleme in sich, wie zum Beispiel das Auftreten von Ambiguitäten, also nicht sicher zuzuordnenden Basenpositionen beim Sequenzieren heterozygoter Proben. Die Einführung von NGS-Verfahren soll hier Abhilfe verschaffen und es ermöglichen klonale Sequenzierreaktionen in sehr großer Anzahl durchzuführen, wobei insgesamt deutlich weniger Ambiguitäten auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem sogenannten NGS-454 Verfahren von Roche eine Reduktion der Ambiguitäten im Vergleich zur Sanger-Methode um insgesamt 93,5% erreicht werden konnte [12]. Speziell im Bereich von HLA-DQB1 konnte eine Reduktion um 100% und im Bereich von HLA-B um 92,7 % gezeigt werden [12]. Weitere Vorteile die die NGS-Verfahren bieten, sind deutlich niedrigere Kosten im Vergleich zu anderen Sequenziertechniken und die Möglichkeit größere Amplifikate mit Ableselängen von 450-1000 Basenparen (Bp) herzustellen [8,12,13]. Im Vergleich dazu haben aktuelle Ableselängen nach der SBT-Sequenzanalyse Werte von ca. 200 Bp.

Nachteile sind eine relativ hohe Fehlerrate im Vegleich zur SBT-Sequenzanalyse und dass momentan noch nicht die HLA-Auswertungssoftware und die HLA-Testkits für eine Routinediagnostik zur Verfügung stehen, da die NGS-Verfahren derzeit hauptsächlich in der Forschung eingesetzt werden.

Insgesamt gibt es drei NGS-Verfahren auf dem Markt, das Roche 454, das Illumina Miseq und das Ion Torrent System. Speziell das Roche 454 und das auf seinem Grundprinzip aufbauende Ion Torrent System sollen hier kurz im Vergleich zur Sanger Methode erläutert werden.

Das Roche 454 System war das erste kommerzialisierte System auf dem Markt und basiert auf dem emulsions PCR Verfahren zur klonalen Proben Amplifikation, gefolgt von der parallelen Pyrosequenzierung in großer Zahl. Matrizen (template) DNA wird im Rahmen der emulsions PCR an Kügelchen, den sogenannten Beads, gebunden und klonal amplifiziert. Anschließend werden die DNA tragenden Kügelchen angereichert und in Wells einer speziellen Titerplatte fixiert. Die Wells enthalten dabei alle nötigen Enzyme zur Sequenzierung. Die Platte wird daraufhin pro Durchlauf mit jeweils einem der vier Nukleotide (dNTPs) umspült, wobei folglich komplementäre Nukleotide an der Matrizen DNA anlagern. Nach Anlagerung eines Nukleotides durch die Polymerase wird jeweils ein Pyrophophatmolekül (PPi) freigesetzt, welches nachfolgend eine Luziferase-katalysierte Reaktion in Gang setzt, wobei ein sogenanntes Lumineszenz Signal entsteht. Dieses wird von einer CCD Kamera aufgezeichnet [13]. Der große Nachteil dieses Systems im Vergleich zur Strangabbruchmethode nach Sanger ist das Auftreten systematischer Fehler bei der Sequenzierung von homopolymeren Regionen. Dies sind Regionen eines DNA-Stranges mit mehreren gleichen Basen hintereinander. Bei der Fluss basierten Sequenzierung kommt es dabei in einem Durchlauf zur Anlagerung mehrerer gleicher Nukleotide an einem Strang. Das dabei produzierte Signal steigt nicht linear zur Anzahl der eingesetzten Nukleotide, was zu Schwierigkeiten bei der Darstellung der korrekten Anzahl an Basen in einer homopolymeren Region führen kann [13]. Bei dem ebenfalls von Jonathan Rothberg später entwickelten Ion Torrent NGS-System kommt es zu ähnlichen Problemen bei der Sequenzierung homopolymerer Regionen. Dieses System basiert auf dem Prinzip der De-

tektion von pH Verschiebungen, die bei der Sequenzierung durch freigesetzte, positiv geladene, Wasserstoffionen entstehen. Durch die kovalente Bindung eines Nukleotides wird ein Pyrophosphatmolekül und ein Wasserstoffion freigesetzt. Ähnlich wie beim vorherigen Verfahren werden auch hier pro Durchlauf Mikrotiteplatten mit jeweils einem Nukleotid umspült, was, wie bereits erwähnt, im Bereich homopolymerer Regionen zu den genannten Problemen führt [13]. So bleibt die Sequenzanalyse nach Sanger weiter das Verfahren mit der niedrigsten Fehlerquote. Dieses Verfahren wird auch in nächster Zukunft aus der Routinediagnostik nicht weg zu denken sein, allein da für die neuen Verfahren, wie schon erwähnt, noch nicht die Testkits und die Auswärtungssoftware für die HLA-Typisierung in der Routinediagnostik zu Verfügung stehen. Dennoch werden sich aufgrund der geringeren Kosten und der insgesamt größeren Möglichkeiten, wie zum Beispiel der Möglichkeit zur deutlich schnelleren Analyse von erheblich größeren Probenmengen, die neuen Verfahren in verbesserter Ausführung langfristig durchsetzen.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren zeigte sich immer deutlicher, welche Bedeutung eine Humane Leukozyten Antigen (HLA)-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger für eine Organ- bzw. Knochenmarktransplantationen hat. Somit bekamen Nachweisverfahren zur Ermittlung der jeweiligen HLA-Oberflächenantigene bzw. deren Gene beim Spender und Empfänger eine immer größere Bedeutung für den Erfolg einer Transplantation. Seit einigen Jahren etablierte sich die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzierung als das Verfahren mit der höchsten Auflösung, wodurch folglich der Wunsch bestand dieses Verfahren möglichst für alle wichtigen Genorte des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) in der Routinediagnostik anzuwenden. Da die Umstellung auf dieses Verfahren für den Genort HLA-DQB1 in unserem Institut noch nicht stattfand, war es folglich das Ziel dieser Arbeit die DNA-Sequenzierung für den Genort HLA-DQB1 zu etablieren. Hierzu wurde ein Assay entwickelt, der basierend auf publizierten Informationen, mit insgesamt vier Amplifikationsprimermixen, alle Allelgruppen des Genortes HLA-DQB1 in einem weitgehend allelgruppenspezifischen Ansatz abdeckt. Für die an die Amplifikation anschließende Sequenzierung wurde ein genortspezifischer Ansatz, also ein Ansatz mit Primern, die mit allen Allelgruppen eines Genortes reagieren, gewählt. Nach entsprechenden Vorversuchen wurde der entwickelte Sequenzieransatz für den Genort HLA-DQB1 abschließend mit 100 vortypisierten DNA-Proben getestet. Dabei zeigte sich die zuverlässige Funktionsweise des Ansatzes. Mittlerweile wird dieses Verfahren seit ca. 6 Monaten in der Routine-Diagnostik bei Patienten und Spendern erfolgreich eingesetzt.

6 Literaturverzeichnis

[1] Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS
5. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), Seiten:130-144
Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS (Herausgeber), Immunologie
Hans Huber Verlag, Hogrefe AG Göttingen (1996)

[2] Bangsow T, Deutsch U, Engel H, Korfhage C, Löffert D
5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Seiten: 153-156
Jahnsohn M (Herausgeber), Gentechnische Methoden, Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Elsevier GmbH, 4. Auflage (2007)

[3] Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, Knolle PA, Thomas Roman K, von Bergwelt-Baildon M, Hallek M, Schultze JL
Reduced frequencies and suppressive function of $CD4^{+}CD25^{hi}$ regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine
Blood;106:2018-2025 (2005)

[4] Brick C, Atouf O, Benseffaj N, Essakalli M
Evaluation of high resolution Luminex technology for specific HLA-DRB1* typing in the moroccan population
Tissue Antigens;45:103-110 (1995)

[5] Bryan CF, Harrell KM, Nelson PW, Pierce GE, Ross G, Shield CF III, Warady BA, Aeder M I, Helling TS, Landreneau MD, Luger AM
HLA-DR and DQ typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primer mixes reduces the incidence of phenotypic homozygosity (blanks) over serology
Annales de biologie clinique;71:599-602 (2013)

[6] Czachurski D
Hochauflösende Typisierung von HLA-Klasse-I und -Klasse-II mittels Sequenzanalyse. Einfluss auf das Transplantatüberleben.
Dissertation , Karlsruhe 2004

[7] Cano P, Klitz W, Mack SJ, Maiers M, Marsh SG, Noreen H, Reed EF, Senitzer D, Setterholm M, Smith A, Fernández-Viña M.
Common and Well-Documented HLA-Alleles, Report of the Ad-Hoc Committee of the American society for Histocompatibility and Immunogenetics
Journal of Human Immunology;68:392-417 (2007)

[8] De Santis D, Dinauer D, Duke J, Erlich HA, Holcomb CL, Lind C, Mackiewicz K, Monos D, Moudgil A, Norman P, Parham P, Sasson A, Allcock RJN
16th IHIW: Review of HLA typing by NGS
International Journal of Immunogenetics;40:72-76 (2013)

[9] http://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Sequenzierung
DNA-Sequenzierung
Wikipedia ® Die freie Enzyklopedie (26.07.2014)

[10] Dunn PPJ, Day S, Williams S, Bendukidze N
HLA-DQB1-Sequencing-based typing using newly identified conserved nucleotide sequences in introns 1 and 2
Tissue Antigens;66:99-106 (2005)

[11] Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K, Mytilineos J
High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a collaborative analysis
Blood;122:3220-3229 (2013)

[12] Gabriel C, Fürst D, Faé I, Wenda S, Zollikofer C, Mytilineos J, Fischer GF
HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality
Tissue Antigens;83:65-75 (2014)

[13] Grumbt B, Eck SH, Hinrichsen T, Hirv K
Diagnostic Applications of Next Generation Sequencing in Immunogenetics and Molecular Oncology
Transfusion Medicine and Hemotherapy;40:196-206 (2013)

[14] He J, Xu C, Wu XJ, Bao XJ, Qiu QC, Yuan XN, Li Y, Shen HJ, Wu DP, Hong JL, Liu JH, DU HY, Zhang L, DU D, Lu J, Liu J.
The impact of HLA high resolution typing mismatching of donor-recipient pairs on outcome of unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation
Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi;33:353-7 (2012)

[15] Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Noreen HJ, Kempenich JH, Setterholm M, Maiers M
The HLA-Dictionary 2008: a summary of HLA-A,-B,-C,-DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A,-B,-C,-DR,and -DQ antigens
Tissue Antigens;73:95-170 (2009)

[16] http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html
IMGT/HLA-Database 2014, HLA Nomenclature,
WHO Nomenclature Comittee (22.07.2014)

[17] http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html
IMGT/HLA-Database 2014, Statistics (22.07.2014)

[18] Jordan F, McWhinnie AJ, Turner S, Gavira N, Calvert AA, Cleaver SA, Holman RH, Goldman JM, Madrigal JA
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;45:103-110 (1995)

[19] Kassar N El, Legouvello S, Joseph CM, Salasses P, Rieux C, Cordonnier C, Vernant JP, Farcet JP, Bierling P, Kuentz M
High resolution HLA class I and II typing and CTLp frequency in unrelated donor transplantation: a single-institution retrospective study of 69 BMTs
Bone Marrow Transplantation;27:35-43 (2001)

[20] Liu E, Lee HS, Aronsson CA, Hagopian WA, Koletzko S, Rewers MJ, Eisenbarth GS, Bingley PJ, Bonifacio E, Simell V, Agardh D, TEDDY Study Group
Risk of pediatric celiac diesease according to HLA haplotype and country
New England Journal of Medicine;371:42-49 (2014)

[21] Olerup O, Aldener A, Fogdell A
HLA-DQB1 and –DQA1 typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours
Tissue Antigens; 41:119-34 (1993)

[22] Otten HG, Tilanus MG, Barnstijn M, van Heutgen JG, de Gast GC
Serology versus PCR-SSP in typing for HLA-DR and HLA-DQ: a practical evaluation
Tissue Antigens;45:36-40 (1995)

[23] Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, Woolfrey A, Smith A, Mickelson E, Hansen JA
Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation
Blood;104:2976-2980 (2004)

[24] Petersdorf EW, Kollman C, Katovich Hurley C, Dupont B, Nademanee A, Begovich AB, Weisdorf D, McGlave P
Effect of HLA class II gene disparity on clinical outcome in unrelated donor hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia: the US National Marrow Donor Program Experience
Blood;98:2922-2929 (2001)

[25] Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, Woolfrey AE, Hansen JA
Optimizing Outcome After Unrelated Marrow Transplantation by Comprehensive Matching of HLA Class I and II Alleles in the Donor and Recipient
Blood;92:3515-3520 (1998)

[26] Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Mickelson EM., Smith AG, Martin PJ., Hansen JA
Definition of HLA-DQ as a transplant antigen
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 93:15358-15363 (1996)

[27] Robinson J, Mistry K, Marsh SGE
Exon identity and ambiguous Typing combinations
Anthony Nolan Research Institute, April (2010)
IMGT/HLA Database, http://www.ebi.ac.uk

[28] Röllinghoff M, Wagner H
3 Zelluläre Immunreaktionen, Seite: 37
Gemsa D, Kalden JR, Resch K (Herausgeber), Immunologie, Grundlagen, Klinik, Praxis
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 4. Auflage (1997)

[29] Saad K, Elsayh KI, Zahran AM, Sobhy KM
Lymphocyte Populations and apoptosis of peripheral blood B and T lymphocytes in children with end stage renal disease
Renal Failure;36:502-507 (2014)

[30] Saber W, Opie S, Rizzo DJ, Zhang MJ, Horowitz MM, Schriber J
Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling
hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia
Blood;119:3908-3916 (2012)

[31] Shankarkumar U, Pawar A, Gosh K
Implications of HLA-sequence-based typing in transplantation
Journal of Postgraduate Medicine;54:41-44 (2008)

[32] Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, Grundschober C, Gratwohl A, Chapuis B, Helg C, Löliger CC, Siren MK, Roosnek E, Jeannet M

High Resolution Matching With Decreased Mortality After Unrelated Bone Marrow Transplantation
Blood;87:4455-4462 (1996)

[33] Wassmuth R
1.1 The human leukocyte antigen (HLA) system, Seiten: 9-15,26-42
1.3 HLA and transplantation, Seiten: 49-62
1.6 HLA and disease, Seiten: 72-73
2.3 Molecular genetics methods, Seiten: 92-102
Wassmuth R (Herausgeber),Primers on the HLA System, Basic Concepts-Medical Relevance-Laboratory Methods-Quality Management
Ecomed-Medizin, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH Heidelberg München(2010)

[34] Zhang ZM, Guan X, Li YJ, Zhu MC, Yang XJ, Zou X
HLA Class I Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Colorectal Cancer Patients
Chinese Journal of Cancer Research;24:77-82 (2012)

[35] Zhou Z, Jensen PE
Structural Characteristics of HLA-DQ that May Impact DM Editing and Susceptibility to Type-1 Diabetes
Frontiers in Immunology;4:Article262 (2013)

Anhang

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Amplifikationsansatz 24

Tabelle 2 Standard-Polymerase Ketten Reaktionsprotokoll DNA Labor I für humane Leukozyten Antigene der Klasse I 25

Tabelle 3: Polymerase Ketten Reaktion-Amplifikationsergebnisse nach Gelelektrophorese, Agarosegel 26

Tabelle 4: Sequenzieransatz 30

Tabelle 5: Thermocyclerprofil für die Cycle Sequencing Reaktion 30

Tabelle 6 : Technische Daten des Sequencer: 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland 32

Tabelle 7: Amplifikationsprimer zum Nachweis humaner Leukozyten Antigene HLA-DQB1 37

Tabelle 8: Amplifikationsprimermischungen 38

Tabelle 9: Thermocycler Temperaturprofil zur Amplifikation 39

Tabelle 10 : Ergebnisse der ersten Polymerase Ketten Reaktionsversuche im Bereich der humanen Leukozyten Antigene HLA-DQB1,19 VortypisiertePatientenproben 40

Tabelle 11: Thermocycler Temperaturprofil zur Sequenzierung der humanen Leukozyten Antigene HLA-DQB1 41

Tabelle 12: Rückwärts-Sequenzierprimer zum Nachweis der humanen Leukozyten Antigene HLA-DQB1 42

Tabelle 13: Vorwärts-Sequenzierprimer zum Nachweis humaner Leukozyten Antigene HLA-DQB1 44

Tabelle 14: Amplifikationsergebnisse Testreihe 1 45

Tabelle 15: Amplifikationsergebnisse Testreihe 2 45

Tabelle 16: Amplifikationsergebnisse Testreihe 3 46

Tabelle 17: Neuentwickelte bzw. modifizierte Sequenzierprimer zum Nachweis humaner Leukozyten Antigene HLA-DQB 47

Tabelle 18: Amplifikationsergebnisse Platte 1 nach Gelelektrophorese 51

Tabelle 19: Amplifikationsergebnisse Platte 2 nach Gelelektrophorese 52

Tabelle 20: Amplifikationsergebnisse Platte 3 nach Gelelektrophorese 53

Tabelle 21: Amplifikationsergebnisse Platte 4 nach Gelelektrophorese 54

Tabelle 22: Amplifikationsergebnisse Platte 5 nach Gelelektrophorese 55

Tabelle 23: Zusammenfassung abschließende Validierung, Amplifikation 56

Tabelle 24: Sequenzierergebnisse Platte 1,HLA-DQB1 77

Tabelle 25: Sequenzierergebnisse Platte 2,HLA-DQB1 78

Tabelle 26: Sequenzierergebnisse Platte 3,HLA-DQB1 79

Tabelle 27: Sequenzierergebnisse Platte 4,HLA-DQB1 80

Tabelle 28: Sequenzierergebnisse Platte 5,HLA-DQB1 81

Tabellen Ergebnisse

Tabelle 24: Sequenzierergebnisse Platte 1,HLA-DQB1

Proben-Nummer	Amplifikationsmix	Vortypisierung	Sequenzier-Ergebnis
08204479	4 (03/04)	*03:02/*03:03	*03:02/*03:03
08204481	3 (02/03:01)	*02:01/*06:01	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:01
08204518	2 (06/06:01)	*03:01/*06:03	*03:01
	3 (02/03:01)		*06:03
08204520	4 (03/04)	*04:02/*06:02	*04:02
	3 (02/03:01)		*06:02
08204584	3 (02/03:01)	*02:02/*06:03	*02:02
	2 (06/06:01)		*06:03
08204585	2 (06/06:01)	*06:02	*06:02
08204586	3 (02/03:01)	*02:01/*03:01	*02:01/*03:01
08204587	1 (05)	*05:01	*05:01
08204588	3 (02/03:01)	*02:01/*05:01	*02:01
	1 (05)		*05:01
08204589	3 (02/03:01)	*02:02/*03:01	*02:02/*03:01
08204590	4 (03/04)	*03:02/*05:01	**Ausfall - Mutation**
	1 (05)		*05:01
08204591	4 (03/04)	*04:02/*05:03	*04:02/*05:03
	1 (05)		*05:03
08204593	3 (02/03:01)	*02:01/*02:02	*02:01/02:02
08204677	3 (02/03:01)	*02:02/*05:03	*02:02
	1 (05)		*05:03
08204678	3 (02/03:01)	*03:01/*03:02	*03:01/*03:02
	4 (03/04)		*03:02
08204679	3 (02/03:01)	*02:02/*05:02	*02:02
	1 (05)		*05:02
08204680	1 (05)	*05:01/*06:04	*05:01
	2 (06/06:01)		*06:04
08204682	4 (03/04)	*03:02/*06:02	*03:02
	2 (06/06:01)		*06:02
08204683	3 (02/03:01)	*02:02/*05:03	*02:02
	1 (05)		*05:03
08204686	3 (02/03:01)	*02:01/*06:03	*02:01

	2 (06/06:01)		*06:03
08204687	3 (02/03:01)	*02:02/*06:02	*02:02
	2 (06/06:01)		*06:02
08204693	1 (05)	*05:02/*06:02	*05:02
	2 (06/06:01)		*06:02
08204775	3 (02/03:01)	*02:01/*06:01	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:01

Tabelle 25: Sequenzierergebnisse Platte 2,HLA-DQB1

Proben-Nummer	Amplifikationsmix	Vortypisierung	Sequenzier-Ergebnis
08204777	4 (03/04)	*03:02/*05:02	*03:02
	1 (05)		*05:02
08204778	3 (02/03:01)	*03:01/*03:03	*03:01
	4 (03/04)		*03:03
08204779	3 (02/03:01)	*03:01/*06:04	*03:01
	2 (06/06:01)		*06:04
08204780	3 (02/03:01)	*02:01/*06:03	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:03
08204798	4 (03/04)	*03:03/*05:01	*03:03
	1 (05)		*05:01
08204799	3 (02/03:01)	*02:02	*02:02
08204800	3 (02/03:01)	*02:02/*06:02	*02:02
	2 (06/06:01)		*06:02
08204801	4 (03/04)	*03:02/*05:02	*03:02
	1 (05)		*05:02
08204802	4 (03/04)	*03:02/*06:03	*03:02
	2 (06/06:01)		*06:03
08204803	3 (02/03:01)	*03:01/*03:02	*03:01
	4 (03/04)		*03:02
08204804	3 (02/03:01)	*03:01/*06:02	*03:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08204685	3 (02/03:01)	*03:01/*06:03	*03:01
	2 (06/06:01)		*06:03
08204883	3 (02/03:01)	*02:01/*06:02	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08204885	3 (02/03:01)	*02:02/*03:01	*02:02/*03:01
08204886	3 (02/03:01)	*02:01/*03:01	*02:02/*03:01
08204887	1 (05)	*05:03/*06:03	*05:03
	2 (06/06:01)		*06:03

08204889	2 (06/06:01)	*06:02	*06:02
08204892	3 (02/03:01)	*03:01/*05:03	*03:01
	1 (05)		*05:03
08204860	3 (02/03:01)	*02:02/*04:02	*02:02
	4 (03/04)		*04:02
08204862	3 (02/03:01)	*02:01/*06:03	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:03
08204861	4 (03/04)	*03:02/*06:03	*03:02
	2 (06/06:01)		*06:03
08204906	3 (02/03:01)	*02:02/*05:01	*02:02
	1 (05)		*05:01
08204907	3 (02/03:01)	*03:01/*06:02	*03:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08204908	1 (05)	*05:01/*06:04	*05:01
	2 (06/06:01)		*06:04

Tabelle 26: Sequenzierergebnisse Platte 3,HLA-DQB1

Proben-Nummer	Amplifikationsmix	Vortypisierung	Sequenzier-Ergebnis
08204909	3 (02/03:01)	*02:01/*0301	*02:01/*03:01
08204910	4 (03/04)	*04:02/*0502	*04:02
	1 (05)		*05:02
08204911	1 (05)	* 05:02	* 05:02
	2 (06/06:01)	*06:02	*06:02
08204912	3 (02/03:01)	*03:01	*03:01
08204913	3 (02/03:01)	*02:01/*06:02	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08205040	4 (03/04)	*03:02/*06:02	*03:02
	2 (06/06:01)		*06:02
08205041	3 (02/03:01)	*02:02/*03:02	*02:02
	4 (03/04)		*03:02
08205042	1 (05)	*05:02/*06:09	*05:02
	2 (06/06:01)		*06:09
08205044	3 (02/03:01)	*03:01/*03:02	*03:01
	4 (03/04)		*03:02
08205045	1 (05)	*05:03/*06:01	*05:03
	2 (06/06:01)		*06:02
08205046	3 (02/03:01)	*03:01/*05:02	*03:01
	1 (05)		*05:02
08205047	2 (06/06:01)	*03:02/*06:03	*03:02

08205059	3 (02/03:01)	*02:02/*05:03	*02:02
	1 (05)		*05:03
08205060	3 (02/03:01)	*02:01/*03:01	*02:01/*03:01
08205061	3 (02/03:01)	*03:01/*06:02	*03:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08205141	1 (05)	*05:01/*06:03	*05:01
	2 (06/06:01)		*06:03
08205142	4 (03/04)	*03:02/*06:03	*03:02
	2 (06/06:01)		*06:03
08205143	1 (05)	*05:01/*06:04	*05:01
	2 (06/06:01)		*06:04
08205144	4 (03/04)	*03:02/*06:03	*03:02
	2 (06/06:01)		*06:03
08205145	3 (02/03:01)	*03:01/*06:02	*03:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08205146	3 (02/03:01)	*02:01/*06:02	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08205147	3 (02/03:01)	*02:01/05:01	*02:01
	1 (05)		*05:01
08205148	3 (02/03:01)	*03:01/*05:03	*03:01
	4 (03/04)		*05:03
08205149	3 (02/03:01)	*03:01	*03:01

Tabelle 27: Sequenzierergebnisse Platte 4,HLA-DQB1

Proben-Nummer	Amplifikationsmix	Vortypisierung	Sequenzier-Ergebnis
08205151	3 (02/03:01)	*02:01/*06:02	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08205248	3 (02/03:01)	*03:01/*03:02	*03:01
	4 (03/04)		*03:02
08205249	3 (02/03:01)	*03:01/*04:02	*03:01
	4 (03/04)		*04:02
08205251	4 (03/04)	*03:02/*06:03	*03:02
	2 (06/06:01)		*06:03
08205250	1 (05)	*05:01/*06:03	*05:01
	2 (06/06:01)		*06:03
08205252	3 (02/03:01)	*03:01/*03:02	*03:01
	4 (03/04)		*03:02
08205259	3 (02/03:01)	*03:01/*05:01	*03:01
	1 (05)		*05:01

08205333	4 (03/04)	*03:03/*05:01	*03:03
	1 (05)		*05:01
08205334	3 (02/03:01)	*03:01/*06:02	*03:01
	2 (06/06:01)		*06.02
08205760	3 (02/03:01)	*02:01/*05:03	*02:01
	1 (05)		*05:03
08205832	1 (05)	*05:01/*06:02	*05:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08205833	2 (06/06:01)	*06:02/*06:03	*06:02/*06:03
08205834	3 (02/03:01)	*02:02/*05:01	*02:02
	1 (05)		*05:01
08205835	3 (02/03:01)	*03:01/*06:04	*03:01
	2 (06/06:01)		*06:04
08205857	1 (05)	*05:03/*06:03	*05:03
	2 (06/06:01)		*06:03
08205858	4 (03/04)	*03:02/*05:01	*03:02
	1 (05)		*05:01
08205923	1 (05)	*05:02/*05:03	*05:02/*05:03
08205924	1 (05)	*05.03/*06:02	*05:03
	2 (06/06:01)		*06:02
08205739	1 (05)	*05:01	*05:01
08205740	3 (02/03:01)	*02:01/*03:02	*02:01
	4 (03/04)		*03:02
08205741	1 (05)	*05:03/*06:02	*05:03
	2 (06/06:01)		*06:02
08205742	4 (03/04)	*04:02/*05:02	*04:02
	1 (05)		*05:02
08205856	3 (02/03:01)	*03:02	*03:02
	2 (06/06:01)		
08205767	3 (02/03:01)	*03:01/*06:02	*03:01
	2 (06/06.01)		*06:02

Tabelle 28: Sequenzierergebnisse Platte 5,HLA-DQB1

Proben-Nummer	Amplifikationsmix	Vortypisierung	Sequenzier-Ergebnis
08205768	3 (02/03:01)	*02:02/*05:02	*02:02
	1 (05)		*05:02
08205769	3 (02/03:01)	*03:01/*03:02	*03:01
08205770	3 (02/03:01)	*03:01/*06:03	*03:01
	2 (06/06:01)		*06:03

08205729	3 (02/03:01)	*02:01/*06:02	*02:01
	2 (06/06:01)		*06:02
08205730	3 (02/03:01)	*02:02/*05:01	*02:02
	1 (05)		*05:01

Abbildungen

Abbildung 1: Expression und Antigenprozessierung von humanen Leukozyten Antigen Molekülen der Klasse 1 und 2 2

Abbildung 2: Darstellung der humanen Leukozyten Antigen-Nomenklatur 3

Abbildung 3: Molekulare Struktur der humanen Leukozyten Antigene der Klasse I 4

Abbildung 4: Molekulare Struktur humanen Leukozyten Antigene der Klasse II 5

Abbildung 5: Faltblattstruktur der Antigenbindungsstelle der humanen Leukozyten Antigene der Klasse II 6

Abbildung 6: Struktur des Major Histocompatibility Complex auf Chromosom Nr. 6 8

Abbildung 7: : Schematische Darstellung der Exon-Intron Struktur der humanen Leukozyten Antigene der Klasse I und II 9

Abbildung 8: Prinzip der Polymerase Ketten Reaktion 12

Abbildung 9: Zustandsformen der Nukleotide 14

Abbildung 10: Ergebnissequenzen, Quelle: Sequence Pilot, JSI-Medical Systems 16

Abbildung 11: „Screenshot“ Sequence Pilot © Arbeitsoberfläche 34

Abbildung 12: Vergrößerter Ausschnitt der Arbeitsoberfläche des Sequence Pilot © 35

Abbildung 13: Dargestellte Nukleotidsequenzen im Detail 35

Abbildung 14: heterozygote Stellen und Ambiguitäten 48

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Hubert Schrezenmeier, danke ich für die Möglichkeit in seinem Institut unter so hervorragenden Bedingungen zu promovieren. Hier möchte ich mich speziell für das in mich gelegte Vertrauen bedanken, mir zu ermöglichen, diese Arbeit berufsbegleitend durch zu führen.

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Joannis Mytilineos, danke ich für die großartige Unterstützung während der gesamten Dauer der Arbeit. Er stand mir stets für Fragen und Vorschläge zur Verfügung, selbst an Wochenenden, um mit seinem umfangreichen Wissen und seiner Erfahrung entscheidend zum Gelingen der Arbeit bei zu tragen.

Den Mitarbeitern des DNA-Labors danke ich für die gute Zusammenarbeit und die ausgezeichnete Unterstützung, wobei ich hier Herrn André Skambraks besonders erwähnen möchte, der mir so häufig mit Rat und Tat, auch Wochenends, zu Seite stand und mich dabei, speziell bei Sequenzierarbeiten, maßgeblich unterstützt hat.

Mein spezieller Dank gilt meiner Familie, die mich so tatkräftig und aufopferungsvoll auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt hat.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.