

Martin Lempert
Dr. sc. hum.

Typisierung der HLA-Klasse I-Genorte (HLA-A, -B, -Cw) durch PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)

Geboren am 14.06.1963 in Mannheim
Reifeprüfung am 06.06.1983 in Sandhausen
Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1985 bis SS 1988 und vom WS 1990 bis SS 1993
Vordiplom am 16.03.1988 an der Universität Münster
Diplom am 05.08.1993 an der Universität Frankfurt a.M.

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. G. Opelz

In dieser Promotionsarbeit wurde ein molekularbiologisches Verfahren zur Typisierung der klassischen MHC-Klasse I-Genorte entwickelt und erprobt. Hierzu wurden DNA-Fragmente von HLA-Klasse I-Allelen in Polymerase-Kettenreaktionen mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) vervielfältigt, in Agarose-Gelen elektrophoretisch getrennt und über UV-Fluoreszenz nachgewiesen.

Das Grundprinzip der PCR-SSP-Analyse beruht darauf, daß eine Amplifikationsreaktion nur dann erfolgt, wenn das 3'-Ende des Primers komplementär zur Ziel-DNA des zu typisierenden Individuums ist. Die Unterscheidung einzelner HLA-Allele oder –Allelgruppen geschieht über die Bildung spezifischer PCR-Produkte. Daher wurden gemäß der vorliegenden Sequenzinformationen (ASHI-Datenbank) Primerkombinationen gewählt, die nur bei Anwesenheit eines HLA-Allels oder einer HLA-Allelgruppe zur Bildung von spezifischen Amplifikaten führen.

Insgesamt wurden 95 PCR-Reaktionsgemische entwickelt, mit deren Einsatz eine höher auflösende Typisierung als mit der serologischen Methode erreicht wird. In zahlreichen Versuchen wurden die Längen der HLA-spezifischen Primer sowie deren Konzentrationen in den einzelnen Reaktionsgemischen optimiert. Das Gleiche galt für das jedem Reaktionsgemisch zugefügte Kontrollprimerpaar, welches zur Amplifikation eines 95 bp langen Abschnittes des β -Globin-Gens führt.

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktionsgemische dienten Referenz-Zellen von zuvor serologisch eindeutig typisierten Individuen. Sie stammten von hiesigen Blutspendern sowie von Nierenempfängern und –spendern der „Collaborative Transplant Study“.

Am Ende der Erprobungsphase stand ein PCR-SSP-System zur Verfügung, das die vollständige HLA-Klasse I-Typisierung eines Individuums innerhalb von 3-3,5 Stunden erlaubt. Es ermöglicht die zweifelsfreie HLA-A-, HLA-B- und HLA-Cw-Typisierung von über 95 % der zu testenden Individuen.

Die große Verlässlichkeit des Verfahrens wurde bereits in den Testreihen zu seiner Erprobung sichtbar. Sie bestätigte sich bei nachfolgenden Typisierungen von verschiedenen serologisch vortypisierten Individuengruppen in eindrucksvoller Weise:

Der Vergleich der Typisierungsergebnisse ergab, daß von 110 Kaukasiern, die serologisch als HLA-A-homozygot eingestuft wurden, tatsächlich über ein Drittel bezüglich dieses Genortes heterozygot sind. Die serologische Erfassung der HLA-A19-Splitspezifitäten war bei diesen Individuen mit einer besonders hohen Fehlerrate verknüpft.

Die PCR-SSP-Typisierung von 421 negroiden Individuen zeigte, daß 18,5 % der serologischen HLA-A- bzw. 25,4 % der serologischen HLA-B-Typisierungen fehlerhaft waren. Die Fehlerquoten der auf diesen Genorten fast ausschließlich heterozygoten Negroiden übertrafen die für Kaukasier in vergleichbaren Untersuchungen ermittelten Quoten um ein Vielfaches. Die höchsten Raten an falsch bestimmten Antigenen stellten jeweils die Splitspezifitäten der HLA-A10- und HLA-A19-Gruppen sowie die Spezifitäten HLA-B*53, HLA-B15*, HLA-B5, HLA-B*42 und HLA-B17. Die PCR-SSP-Methode ermöglichte die Differenzierung von allen 487 HLA-A- und 457 HLA-B-Splitspezifitäten, die mit der serologischen Methode nur als breite Antigene erfaßt wurden.

Bei der HLA-Cw-Retypisierung von 650 Kaukasiern wurde die Überlegenheit der DNA-Technik gegenüber der serologischen Methode besonders deutlich. So waren nahezu ein Drittel der Individuen serologisch fehltypisiert worden. Die Mehrheit der Fehltypisierungen war auf die serologisch nicht erfaßten Spezifitäten HLA-Cw*12-*17 zurückzuführen.

Das PCR-SSP-Typisierungsverfahren zeichnet sich durch eine hohe Verlässlichkeit, eine relativ hohe Auflösung und eine schnelle Durchführbarkeit aus. Es eignet sich daher auch zur prospektiven HLA-Klasse I-Typisierung bei der Transplantation von Leichennieren.

Die Ergebnisse der Retypisierungen fordern den routinemäßigen Einsatz der PCR-SSP-Methode bei der Nierentransplantation. Vor allem für Negroide sollte dies zu einer Verbesserung der Organüberlebensrate führen. Überdies könnte mit Hilfe der DNA-Technik die klinische Bedeutung des HLA-Cw-Genortes bei der Nieren- und Knochenmarkstransplantation weiter geklärt werden.