Molekulargenetische Untersuchungen zur Mikrochimärismusdiagnostik

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Cornelia Diening
aus Koblenz

Gießen 2008

Aus dem
Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
Leiter: Prof. Dr. med. Gregor Bein
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. J. Bux
Gutachter: Frau PD Dr. D. Nolte

Tag der Disputation: 23.09.2008

Meiner Familie

Χίμαιρα

Die Chimäre ist in der griechischen Mythologie
ein dreiköpfiges, feuerspeiendes Ungeheuer,
bestehend aus Schlange, Löwe und Ziege.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

1.1 Der Begriff Mikrochimärismus ... 1

1.2 Die Stammzell-Transplantation ... 1

1.2.1 Die allogene Stammzell-Transplantation ... 2

1.2.2 Probleme im Rahmen der allogenen Stammzell-Transplantation ... 3

1.3 Mikrochimärismusdiagnostik ... 4

1.3.1 Prinzip und Notwendigkeit der Mikrochimärismusdiagnostik ... 4

1.3.2 Techniken der Mikrochimärismusdiagnostik ... 5

1.3.2.1 gegenwärtige Verfahren ... 6

1.4 Geeignete Genorte ... 9

1.4.1 HLA-System ... 9

1.4.2 Mitochondriale DNA ... 11

1.4.3 Fcγ-Rezeptor IIIb ... 12

1.4.4 Duffy-Blutgruppensystem ... 13

1.4.5 Kidd-Blutgruppensystem ... 14

1.4.6 Amelogenin-Gen ... 15

2 Ziele der Arbeit ... 16

3 Materialien ... 17

3.1 Geräte ... 17

3.2 Laborbedarf ... 17

3.3 Reagenzien ... 18

3.3.1 Immunologie ... 18

3.3.2 Molekularbiologie ... 18

3.4 Testkits ... 18

3.5 Chemikalien und sonstige Reagenzien ... 19

3.6 Computersoftware ... 19

4 Methoden ... 20

4.1 DNA-Extraktion ... 20

4.2 DNA-Konzentrationsbestimmung und -Qualitätskontrolle ... 21

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) ... 21

4.3.1 Unterscheidung von Allelen: PCR-SSP ... 24

4.4 PCR-SSP Typisierungen ... 25

4.4.1 HLA-DRB1-Typisierung ... 25

4.4.2 HVR1-Typisierung 27
4.4.3 Fcγ-Rezeptor IIIb-Typisierung 28
4.4.4 Duffy- und Kidd-Typisierung 29
4.4.5 Serologische Blutgruppenbestimmung für die Blutgruppen-Systeme Duffy und Kidd 31
4.4.6 Amelogenin-Typisierung 32
4.5 Gelelektrophoretischer Nachweis amplifizierter DNA 33
4.6 Quantitative PCR mit dem LightCycler™ 34
4.7 Der LightCycler™ 34
4.8 Real-time PCR mittels LightCycler™ 37
4.9 Sequenzierung von PCR-Produkten 38
4.10 Short Tandem Repeats-PCR 43
4.11 Schaffung mikrochimärer Verhältnisse 44
5 Ergebnisse 46
5.1 Vergleich zwischen dem Nachweis nukleärer und mitochondrialer DNA mit PCR-SSP 46
5.2 Nachweis nukleärer und mitochondrialer DNA mit LightCycler-PCR 47
5.2.1 HLA-DRB1 48
5.2.2 HVR1 49
5.3 Mikrochimärismusstudie 52
6 Diskussion 62
7 Zusammenfassung 70
8 Summary 71
9 Abkürzungsverzeichnis 72
10 Literaturverzeichnis 75
11 Anhang 86
11.1 Primer 86
11.2 PCR-Programme 90
11.3 Sequenzen 93
11.4 Nukleinsäuren-Datendank 95
11.5 tabellarische Darstellung von Ergebnissen 95
Erklärung 98
Danksagung 99
Lebenslauf 100

1 Einleitung

1.1 Der Begriff Mikrochimärismus

Der Begriff Mikrochimärismus ist abgeleitet von der aus der griechischen Mythologie stammenden „Chimäre“ (griech. Χ ί μ α ι ρ α), einem dreiköpfigen, Feuer speienden Ungeheuer mit dem Kopf eines Löwen, dem Leib einer Ziege und dem Schwanz eines Drachen. Die Chimäre suchte Lykien, ein Königreich in Kleinasien, heim und wurde schließlich von Bellerophon getötet. Im übertragenen Sinn bedeutet Chimäre Hirngespinst oder Trugbild (aus Microsoft® Encarta® Enzyklopädie Professional 2003).

In der Medizin wird der Begriff des Mikrochimärismus zur Beschreibung der Koexistenz von hämatopoetischen Zellpopulationen zweier Individuen in einem Organismus benutzt. Er entsteht beispielsweise physiologisch während der Schwangerschaft im mütterlichen Organismus, bei dem der Fetus trotz Besitzes väterlicher Antigene vom mütterlichen Immunsystem in den allermeisten Fällen toleriert wird. Auch nach Bluttransfusionen und nach allogener Stammzelltransplantation (SZT), die in Kapitel 1.2 näher erklärt wird, entsteht Chimärismus.
Man unterscheidet nach erfolgter Knochenmark- oder Stammzelltransplantation zwischen dem Entstehen eines „vollständigen“ und eines „partiellen“ Mikrochimärismus. Bei Vorliegen eines vollständigen Mikrochimärismus können nur hämatopoetische Zellen des Spenders nachgewiesen werden. „Partieller“ oder auch inkompletter Chimärismus liegt vor, wenn im Blut oder Knochenmark blutbildende Zellen sowohl von Spender als auch vom Empfänger existieren.
Im folgenden Kapitel 1.2 wird auf die Besonderheiten der allogenen Stammzelltransplantation eingegangen, da sich diese Arbeit hauptsächlich auf den nach allogener Stammzell-transplantation entstehenden Mikrochimärismus bezieht.

1.2 Die Stammzell-Transplantation (SZT)

Die Stammzell-Transplantation ist eine Übertragung von in Knochenmark oder peripherem Blut enthaltenen, blutbildenden Stammzellen von einer Person auf eine andere. Allgemein werden Stammzell-Transplantationen bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien, Lymphomen, Myelomen und aplastischen Anämien therapeutisch eingesetzt (Armitage 1994).

Prinzipiell gibt es unterschiedliche Transplantationsformen (s. Abb. 1). Im Rahmen dieser Arbeit richtet sich das Augenmerk auf die allogene Stammzell-Transplantation, welche die am häufigsten angewandte Form ist.

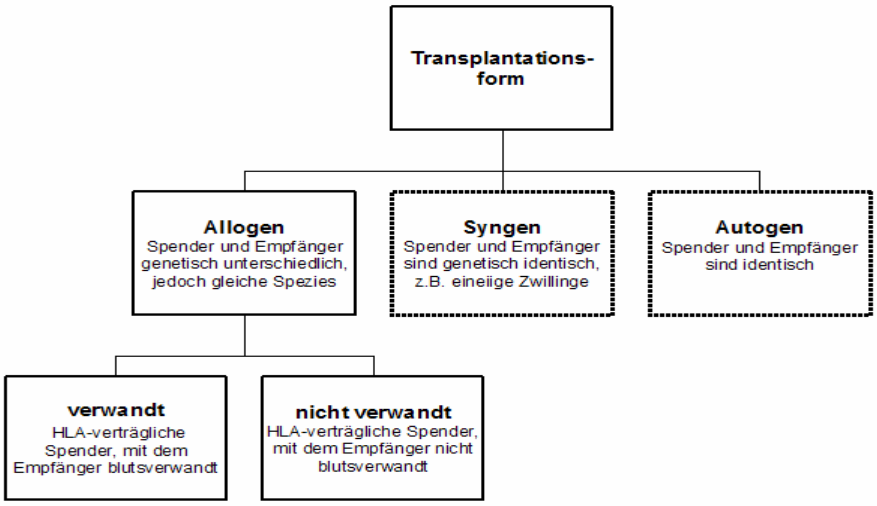

Abb. 1.1: ***Transplantationsarten:*** *Bei den gestrichelt umrandeten Kästchen liegt zwischen Empfänger und Spender ein (nahezu) genetisch identisches Immunsystem vor. (HLA - humane Leukozyten- Antigene)*

1.2.1 Die allogene Stammzell-Transplantation (SZT)

Bei der allogenen SZT sind Spender und Empfänger genetisch unterschiedlich (Abb. 1.1). Es werden zwei Formen unterschieden: allogene SZT zwischen Verwandten und zwischen nicht verwandten Personen. In nationalen bzw. internationalen Spenderregistern wird nach einem geeigneten Fremdspender gesucht. Die Ermittlung eines geeigneten Spenders erfolgt nach bestimmten Verträglichkeitskriterien. Dazu gehören Humane Leukozyten Antigen-Kompatibilität (HLA), Blutgruppenbestimmung, Geschlecht und Cytomegalievirus-Status (CMV) (Mickelson et al. 2000, Petersdorf et al. 1998). Ist ein kompatibler Spender gefunden, werden nach Prüfung des Gesundheitszustandes etwa 1000 ml Knochenmark unter Vollnarkose aus dem Beckenkamm entnommen.

Eine neuere, ambulant durchführbare Methode der Stammzellgewinnung ist die Isolierung aus dem Blutkreislauf. Durch Gabe von G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) wird das Knochenmark angeregt, mehr Stammzellen zu bilden und diese dann in den Blutkreislauf auszuschütten. Nach Stimulation über mehrere Tage werden die Zellen mittels Zytapherese in 2 - 3 Sitzungen entnommen (Bensinger et al. 1995) und die Zellsuspension aufbereitet.

Vor Transfusion der Stammzellen ist eine Vorbehandlung (= Konditionierung) des Empfängers mit einer Chemotherapie notwendig, um dessen eigene Stammzellen und damit auch die malignen Zellen zu eliminieren. Es wird unterschieden zwischen vollständiger und partieller Zerstörung der Hämatopoese, d.h. einer myeloablativen Chemotherapie (vollständige Konditionierung) und einer nicht-myeloablativen Chemotherapie (partielle

Konditionierung) (Pulsipher et al. 2001), bei der noch ein kleiner Anteil an eigenen blutbildenden Zellen übrig bleibt. Bei der myeloablativer Konditionierung findet sich nach der SZT im Empfängerorganismus ein vollständiger hämatopoetischer Chimärismus mit ausschließlichem Vorhandensein der Spender-Stammzellen.

Die partielle Konditionierung weist als wesentlichen Unterschied zur vollständigen Konditionierung eine verminderte Toxizität der Chemotherapie auf, wobei Leukämiezellen verbleiben können. Bei schwierigen Transplantationsbedingungen wie beispielsweise schlechtem Gesundheitszustand und hohem Alter ermöglicht die partielle Konditionierung trotzdem eine Transplantation. Daneben tritt begünstigend ein sog. „graft-versus-leukaemia"-Effekt auf, bei dem die Spenderzellen die verbleibenden Leukämiezellen zerstören (Barrett et al. 1997). Die noch vorhandenen Empfänger-Blutzellen werden in den nächsten Monaten von den gespendeten Stammzellen zerstört bzw. von der Milz abgebaut (Childs et al. 1999). Ein vollständiger Chimärismus entsteht erst einige Monate nach der Transplantation.

Nach Transplantation rekolonisieren die Spenderzellen im Empfänger-Organismus Milz, Knochenmark und Lymphknoten, d.h. sie „wachsen" in ihrer neuen Umgebung an (*Engraftment*). Die transplantierten Zellen und ihre „Nachkommen" übernehmen dann die Funktionen des Immunsystems, und im Empfänger ist ein kompletter hämatopoetischer Spenderchimärismus nachweisbar.

1.2.2 Probleme im Rahmen der allogenen Stammzell-Transplantation

Die Probleme und möglichen Komplikationen im Rahmen der allogenen SZT sind sehr vielfältig (Tabbara et al. 2002). Ein Problem vor der Transplantation stellt die Suche nach einem geeigneten (Fremd-)Spender aufgrund der strengen Verträglichkeitskriterien wie HLA-Kompatibilität dar. Während der Konditionierung des Empfängers und in den ersten Wochen nach Transplantation besteht im Rahmen der (erwünschten) Aplasie ein hohes Risiko an z.T. systemischen bakteriellen, viralen und mykotischen Infektionen zu erkranken mit erhöhter Mortalität trotz Einsatz potenter Medikamente.

Nach der Transplantation verursachen die genetischen Unterschiede zwischen Spender und Empfänger immunologische Komplikationen. So ist eine Immunsuppression notwendig, um ein optimales „Engraftment" zu ermöglichen und eine Transplantatabstoßung zu vermeiden. Die Immunsuppression darf jedoch auch nicht zu stark sein, um nicht über das gewünschte Maß hinaus gesunde Zellen wie Blut-, Stammzellen oder anderes Gewebe zu beeinflussen. Unter Immunsupression steigt das Infektionsrisiko - insbesondere für opportunistische Infektionen (Fukuda et al. 2003, Junghanss et al. 2002).

Ferner besteht die Gefahr der gefürchteten Transplantat-gegen-Wirt- Krankheit (*Graft-versus-Host-Disease = GvHD*), d.h. einer Reaktion der Spenderzellen gegen das Empfängergewebe. Bei der GvHD werden zwei Erkrankungen unterschieden: Die akute GvHD ist eine Erkrankung mit einer charakteristischen Trias aus Dermatitis, Hepatitis und Gastroenteritis, die innerhalb der ersten 100 Tage nach allogener SZT auftritt. Die chronische GvHD ist eine komplexe Erkrankung unter Mitbeteiligung vieler Organsysteme, die sich in der Regel etwa 100 Tage nach der allogenen SZT entwickelt. Beide Erkrankungen können zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen (Flowers et al. 1999).

Eine minimale Resterkrankung *(minimal residual disease)* kann als Grundlage für ein Rezidiv auftreten (Biondi et al. 2000, Szczepanski et al. 2001). Minimale Resterkrankung bedeutet, dass trotz scheinbar vollständiger Remission noch eine geringe Anzahl an eigenen Stammzellen und damit auch Tumorzellen vorhanden sind, die auf molekularer Ebene nachweisbar sind, jedoch keine klinischen Symptome verursachen.

Weitere Probleme können aufgrund einer Vorimmunisierung gegen HLA- oder Thrombozyten-spezifischer Antigene auftreten. Ebenso besteht die Gefahr maligner Zweiterkrankungen durch Bestrahlung, zytostatische Therapie und Immunsuppression. Mögliche Spätfolgen der zytostatischen Therapie und Immunsuppression sind Infertilität und - insbesondere bei pädiatrischen Patienten - Wachstums- und Entwicklungsstörungen.

Auch können langfristig Organfunktionen beeinträchtigt werden und die seltene Lebervenenverschlusskrankheit (*Hepatic-Veno-Occlusive Disease - HVOD*) auftreten (Parikh et al. 2004).

1.3 Mikrochimärismusdiagnostik

1.3.1 Prinzip und Notwendigkeit der Mikrochimärismusdiagnostik

Das Phänomen der Koexistenz hämatopoetischer Spender- und Empfängerzellen im Empfängerorganismus ist in den letzten Jahren mit steigendem klinischem Interesse behandelt und untersucht worden. Durch große Fortschritte in der Forschung wie die Einführung strengerer Auswahlkriterien bei der Spendersuche und die Einführung verschiedener Konditionierungsformen (Kapitel 1.2.1) vor Transplantation haben sich die Heilungschancen deutlich verbessert. Dadurch rücken die Komplikationen nach erfolgreicher SZT wie die Langzeit-Nachbehandlung und die Schwierigkeiten, eine langfristige Remission beizubehalten, immer mehr in den Vordergrund.

Der Chimärismusdiagnostik kommt wesentliche Bedeutung in der Erkennung eines möglichen Rezidivs nach allogener SZT zu, um somit rechtzeitig therapeutisch eingreifen zu können.

Nach erfolgter Transplantation wird mittels geeigneter Methoden (vgl. Kapitel 1.3.2) der (Teil-) Chimärismus nachgewiesen und mögliche Änderungen auch quantitativ registriert. Die Chimärismus-Analyse fungiert optimalerweise als Frühdiagnostikum im sog. „submikroskopischen Bereich", also auf molekularer Ebene.

Durch zahlreiche Studien ist belegt, dass ein steigender Anteil an Empfängerzellen bei MRD bzw. ein unvollständiges Engraftment ein signifikant erhöhtes Risiko für ein Rezidiv (Ramirez et al. 1996, Mackinnon et al. 1995, Roux et al. 1994) darstellen, was die Bedeutung der Chimärismusdiagnostik unterstreicht. Durch frühzeitige Intervention wie die Gabe von Spender-Lymphozyten (*Donor Lymphocyte Infusions, DLI*), eine Neuanpassung der Immuntherapie oder eine erneute SZT können die Heilungschancen verbessert werden.

1.3.2 Techniken der Mikrochimärismusdiagnostik

Schon sehr frühe SZT-Studien weisen auf die Bedeutung und den Nachweis des entstehenden Chimärismus hin (Mathe et al. 1965). In den 80er und 90er Jahren wurden verschiedene Methoden zum Nachweis des Chimärismus wie die erythrozytäre Phänotypiserung (Roy et al. 1990, Sparkes et al. 1977), die Immunglobulin-Isotypenanalyse (Witherspoon et al. 1978), zytogenetische Methoden (Lawler et al. 1987) und die Ermittlung von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) (Blazar et al. 1985) entwickelt.

Einschränkungen dieser Methoden ergaben sich aus einem begrenzten Grad an Polymorphismen, geringer Sensitivität und aufwendiger Techniken. Mit der Entdeckung und Weiterentwicklung der Polymerasekettenreaktion wurden sie von schnelleren und präziseren molekulargenetischen Methoden, die in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden, abgelöst.

Allgemein basieren alle unterschiedlichen Verfahren der Chimärismus-Analyse auf dem Nachweis genetischer Unterschiede zwischen Spender und Empfänger. Dazu sind polymorphe Genorte notwendig, die sich durch variable Sequenzen auszeichnen. So besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Spender und Empfänger differente Merkmale aufweisen. Zum Nachweis und zur Verlaufsbeobachtung des Chimärismus ist eine hoch sensitive Methode Voraussetzung, um ein Rezidiv der Erkrankung so früh wie möglich erkennen zu

können. Ferner ist möglichst eine quantitative Analyse zweckmäßig, um Änderungen des Chimärismus-Status präzise registrieren zu können.

1.3.2.1 Gegenwärtige molekulargenetische Verfahren

Heutzutage werden verschiedene qualitative und quantitative molekulargenetische Methoden, die auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) (s. Kap. 4.3) basieren zur Chimärismusdiagnostik eingesetzt. Verschiedene Verfahren werden im Folgenden vorgestellt:

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Ein regelmäßig eingesetztes Verfahren ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von X- und Y-Chromosomen. Hierbei werden meist kurze Sequenzen mittels mehrerer Farbstoffe in einem Chromosomenpräparat lokalisiert. Da diese Methode auf den genetischen Unterschieden zwischen X- und Y-Chromosom basiert, kann sie nur bei Spender- / Empfängerpaaren mit differierendem Geschlecht in der Chimärismus-Diagnostik eingesetzt werden (Tamura et al. 2000). Damit ist der Einsatz dieser Methode limitiert.

Short Tandem Repeats (STR)-Diagnostik

Diese Methode weist Allelunterschiede zwischen Mikrosatelliten-DNA nach, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind und eine charakteristische Anzahl von repetitiven Nukleotidsequenzen enthalten, sog. DNA-Tandem-Wiederholungen (Senitzer et al. 2001, Bader et al.1997, Childs et al. 1999). Diese für jeden Menschen charakteristischen Sequenzen sind über das gesamte Genom verteilt, zeichnen sich durch ein hohes Maß an Variabilität aus und stellen eine Art „genetischen Fingerabdruck“ dar. Diese Methode kommt daher auch häufig bei forensischen Untersuchungen zum Einsatz. Die Tandem-Wiederholungen befinden sich in sog. Introns (also nicht-kodierenden Sequenzabschnitten). Dabei unterscheidet man zwischen Minisatelliten, sog. *Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)*, bei denen die Länge der sich wiederholenden Einheiten etwa 9-100 Basenpaare beträgt, und den Mikrosatelliten, auch *Short Tandem Repeat (STR)*, die nur aus 1-6 Basenpaaren bestehen. Je nach Methode werden vor Transplantation 9 oder mehr verschiedene Genloci durch DNA-Sequenzierung bei Spender und Empfänger untersucht, um differente Allele aufspüren zu können. Werden dabei Unterschiede gefunden, können diese nach der SZT zur STR-Diagnostik genutzt werden. Die Wahrscheinlichkeit, unterschiedliche Allelausprägungen in verschiedenen Genorten zu finden ist groß, so dass die Methode in den

allermeisten Fällen angewandt werden kann. Für die Diagnostik werden nur sehr kleine DNA Mengen (1,0-2,5 ng) benötigt.
Als Nachteil des STR-Verfahrens gilt der hohe zeitliche und technische Aufwand und die Notwendigkeit einer DNA-Sequenziermaschine zur ultrasensitiven Gelelektrophorese. Die Untersuchung kann nur in speziellen Zentren, die über die entsprechenden Geräte und geschultes Personal verfügen, erfolgen. Zudem ist eine vollständige STR-Analyse zeitaufwendig, so dass ihr Einsatz in der Routinediagnostik problematisch ist, da eine frühzeitige Änderung der chimären Verhältnisse im Empfänger nachweisbar sein sollte. Eine exakte Quantifizierung ist mit der STR-Diagnostik nicht möglich, da das Verhältnis zwischen Spender- und Empfängerzellen nur auf etwa 5 Prozentpunkte genau bestimmt werden kann.

PCR-Methoden

Die Polymerasekettenreaktion *(Polymerase Chain Reaction, PCR*) wurde 1984 erfunden (Mullis et al. 1990). Die Methode basiert auf der Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte bis zu einer Menge, die mittels Gelelektrophorese und anschließender Färbung nachgewiesen werden kann (s. Kap. 4.5). Dabei werden nach Denaturierung doppelsträngiger DNA mit Hilfe von DNA-Polymerase Oligonukleotide angelagert und der jeweils komplementäre Strang neusynthetisiert. Diese Phasen werden zyklisch wiederholt. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge an DNA der gewünschten Sequenz. Nach der PCR kann das Amplifikat mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht und ausgewertet werden.
Es gibt unterschiedliche PCR-abhängige Verfahren, die zur Chimärismus-Diagnostik eingesetzt werden:
Die *sequenzspezifische PCR (PCR-SSP*) (s. Kap. 4.3.1) ist eine Methode, bei der das Vorhandensein bzw. Fehlen einer interessierenden Sequenz über Produktnachweis in der Gelelektrophorese angezeigt wird. Voraussetzung für dieses PCR-Verfahren ist, dass die zu amplifizierenden Sequenzabschnitte bekannt sind und dementsprechend spezifische Primer-Kombinationen erstellt werden können, die nur bei Anwesenheit des interessierenden Allels, zur Bildung eines spezifischen Produktes führen. Hierbei handelt es sich um eine Endpunktbestimmung, also eine rein qualitative Nachweismethode. Die PCR-SSP wird routinemäßig bei der HLA-Typisierung für die Spendersuche eingesetzt (Olerup et al. 1992, Bunce et al. 1995).

Mit qualitativen PCR-Methoden können gut reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse mit - einmal etabliert- einem mäßigen technischen Aufwand erzielt werden. Nachteilig ist jedoch,

dass nur eine Endpunktbestimmung, allenfalls neben der qualitativen, eine semiquantitative Analyse möglich ist.

Seit einigen Jahren gibt es die Möglichkeit, PCR-Reaktionen auch quantitativ auszuwerten. Als Beispiele hierfür sollen zwei Methoden vorgestellt werden: die *SYBR® Green-Methode* mit dem LightCycler (Eckert et al. 2003, Li et al. 2002) und die *TaqMan™ -5'-Nuclease-Nachweistechnik* (Provenzano et al. 2001, Pongers-Willems et al. 1998).
Bei beiden Methoden wird wie bei der qualitativen PCR jeweils ein spezifischer DNA-Bereich amplifiziert. Neu ist bei diesen Techniken, dass zusätzlich eine „online-Beobachtung" möglich ist, d.h. das PCR-Produkt wird nach jedem Zyklus durch Messung integrierter fluoreszierender Marker quantifiziert. Diese PCR-Form hat daher auch den Namen real-time-PCR. Die Quantifizierung von Proben mit unbekannter Ausgangskonzentration gelingt durch Vergleichen mit Standardkurven, die auf der Basis von Proben mit bekannter DNA-Konzentration hergestellt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die SYBR® Green-Methode (s. Kap. 4.6) angewandt.
Mit der 5'Nuklease-Technik (TaqMan™ Prinzip) kann spezifisch die gesuchte Ziel-DNA nachgewiesen werden. Dazu wird eine TaqMan™ Sonde (*engl. probe*), ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, benutzt, welche mit einem Fluoreszenz-Farbstoff und einem „Quenching-Molekül" markiert ist. Während der Annealing-Phase der PCR binden neben den PCR-Primern auch die TaqMan™ Sonden an die Ziel-DNA. Im folgenden Elongationsschritt synthetisiert die Polymerase, die eine 5'-Exonukleaseaktivität besitzt, den zweiten Strang und löst die gebundene TaqMan™-Sonde nicht von der Ziel-DNA, sondern baut sie ab. Das „Quenching-Molekül" wird dabei vom Fluoreszenz-Farbstoff getrennt, wodurch der Farbstoff jetzt Fluoreszenz, deren Intensität direkt proportional zur Zahl der neu gebildeten DNA-Stränge ist, abgeben kann. So wird eine Quantifizierung möglich.
Bei der SYBR® Green-Methode mit dem LightCycler® interkaliert der Fluoreszenzmarker während der PCR-Amplifikation in die Doppelstrang-DNA und emittiert Fluoreszenzlicht, das nach jedem Zyklus gemessen wird. Hier findet eine Quantifizierung über die Intensität des Fluoreszenzlichts statt (s. Kap. 4.6).
Beide Methoden haben den Vorteil, dass keine Nachbearbeitung der Proben nötig ist, da sowohl die Amplifizierung als auch die anschließende Analyse der Produkte in einem Reaktionsgefäß erfolgt. Ferner ist eine schnelle Durchführung in ca 1-3 h möglich. Es können im TaqMan™ viele Proben gleichzeitig in die PCR eingesetzt werden. Neben der Möglichkeit

zur quantitativen Analyse ist zudem eine rasche Auswertung der Ergebnisse durch Anbindung an den Computer sehr vorteilig.

1.4 Geeignete Genorte für die Chimärismusdiagnostik

Die im Folgenden vorgestellten sechs Genorte zeichnen sich durch variable Sequenzen aus. Die Auswahl der Genorte erfolgte nach der Genfrequenzverteilung bei Kaukasiern. Bei allen hier verwendeten Genorten besteht eine nahezu gleich häufige bzw. ähnliche Frequenzverteilung in der europäischen Bevölkerung, so dass eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, differente Merkmale bei Spender und Empfänger zu finden. Diese variablen Sequenzen spielen mit Ausnahme des HLA-Systems immunologisch bei der Transplantation keine Rolle. Das HLA-System nimmt somit eine Sonderstellung ein: es zeichnet sich durch enorme Variabilität, die jedoch immunologisch entscheidend ist (s. Kap. 1.4.1), aus. Warum bestimmte Genorte ausgewählt wurden, wird in den folgenden Kapiteln gesondert erörtert. Die hier verwendeten polymorphen Genorte sind: die HLA-DRB1-Region des HLA-Systems, die HVR1-Region des mitochondrialen Genoms, der Fcγ-Rezeptor IIIb (CD16b), die Blutgruppen-Systeme Kidd und Duffy sowie das Amelogenin-Gen.

1.4.1 HLA-System

Kernhaltige Zellen tragen auf der Zelloberfläche individuelle Antigene zur immunologischen Abgrenzung des Organismus von Fremdstrukturen. Das immunologische „Selbst“ wird dabei durch Produkte des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex, MHC*) repräsentiert. Dieser Molekültyp wird beim Menschen auch als HLA (humanes Leukozyten-Antigen) bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der erworbenen Immunität (Zinkernagel und Doherty, 1974).

Ferner kommt dem HLA-Komplex eine entscheidende Bedeutung bei der Abstoßung nach Transplantation und bei der Disposition für viele (auto-)immunologische Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide Arthritis und ankylosierende Spondylitis zu. Lokalisiert ist das hochpolymorphe etwa 3600 kbp umfassende HLA-System auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 6 (6p21.1-3).

Die Einteilung des HLA-Systems erfolgt - abhängig von der Struktur und Funktion seiner Genprodukte - in drei Klassen:

- HLA Klasse I-Region
- HLA Klasse II-Region
- weder HLA Klasse I noch HLA Klasse II- (früher HLA Klasse III-) Regionen

Die hier interessierende HLA-DRB1-Region ist in der HLA-Klasse II-Region, die nun näher erläutert wird, lokalisiert.

HLA Klasse II-Region

Hier unterscheidet man Genorte, die für HLA-DR- (200kb), -DP- (90kb) und -DQ- (120kb) Moleküle kodieren. HLA Klasse II-Moleküle sind Heterodimere und bestehen aus zwei etwa gleich langen nicht-kovalent gebundenen Polypeptidketten α (33-35 kDa) und β (26-28 kDa). Die einzelnen HLA Klasse II-Moleküle können noch weiter unterteilt werden. So umfasst beispielsweise HLA-DR die Genorte DRA für die α-Kette und mehrere für die β-Kette wie DRB1, eine hochpolymorphe Region, DRB2 (ein Pseudogen), DRB3, DRB4 und weitere, die jedoch nicht alle gleichzeitig nachweisbar sind (Brown et al. 1993). Ähnlich basieren die DQ- und DP-Moleküle auf mehreren Genorten.
HLA Klasse II-Moleküle befinden sich vor allem auf Zellen des mononukleär-phagozytischen Systems, sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie beispielsweise Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten. Peptidantigene, die von den HLA Klasse II-Molekülen an der Zelloberfläche für CD4-positive T-Lymphozyten präsentiert werden, entstammen „exogenen“ Proteinen, meist von Bakterien oder Parasiten, die von der Zelle aufgenommen und zum weiteren Abbau in Lysosomen eingeschlossen wurden. Die nativen Proteine werden dort proteolytisch degradiert und mit Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums, die inaktive HLA Klasse II-Moleküle enthalten, fusioniert. Weiter wird die Antigenbindungsstelle mit prozessiertem Antigen beladen und anschließend an der Zelloberfläche präsentiert.

Der HLA-Komplex ist das variabelste System im Organismus und wäre damit ideal in der Chimärismus-Diagnostik einsetzbar. Aufgrund seiner immunologischen Funktion sind seine Produkte jedoch für die Unterscheidung zwischen körpereigen/körperfremd zuständig. Um Abstoßungen nach Transplantationen zu vermeiden, wird deshalb versucht, eine möglichst weitgehende Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger herzustellen (Petersdorf et al. 1995). Die HLA-Kompatibilität ist bei der Spendersuche das entscheidende Matchkriterium. Daher gibt es nur in Ausnahmefällen (haploidente KMT) HLA-Unterschiede zwischen Spender und Empfänger. Somit ist das HLA-System de facto nur eingeschränkt für die Chimärismusdiagnostik einsetzbar. In den hier vorgestellten Untersuchungen wird das HLA-System stellvertretend für den molekulargenetischen Nachweis nukleärer DNA als polymorpher Genort eingesetzt.

1.4.2 Mitochondriale DNA

Mitochondrien sind Zellorganellen, die eine eigene DNA (mt-DNA) in Form eines zirkulären Doppelstranges besitzen. In Leukozyten sind etwa 10000 mitochondriale DNA-Kopien enthalten (Garritsen et al 1997). In Mitochondrien erfolgen die oxidative Phosphorylierung, der Abbau von Fettsäuren mittels β-Oxidation und Teile des Harnstoffzyklus. Das mitochondriale Genom umfasst 16.569 bp und wurde erstmalig 1981, als sog. *Cambridge reference sequence,* vollständig sequenziert (Anderson et al. 1981). Es wurden insgesamt 37 Gene gefunden, die für Untereinheiten von Enzymen der oxydativen Phosphorylierung kodieren wie für Cytochrom C, Oxidase-Untereinheiten I, II, III, ATPase Untereinheiten, Cytochrom b und 8, 12S- und 16S-RNA, 22 t-RNAs und andere Gene.

Im Vergleich zur zellulären DNA besitzt die mitochondriale DNA einige Besonderheiten wie beispielsweise einen vom Universalcode abweichenden genetischen Code, artspezifische Varianten und eine ausschließlich maternale Vererbung.

Obwohl sich das mitochondriale Genom nur durch wenige nicht-kodierende Regionen auszeichnet, gibt es eine sog. displacement (D) - loop-Region mit hochpolymorpher Sequenz, in der mehrere hypervariable Regionen (HV-Regionen) liegen. Für die Chimärismus-Diagnostik sind vor allem zwei dieser Regionen (HVR1 und HVR2) geeignet (Garritsen et al. 2001), wobei in dieser Arbeit ausschließlich die HV1-Region (Position 16105-16348), die 244 bp umfasst, verwendet wird. Garritsen et al. (1997) nutzten Polymorphismen der HV-Regionen, um zwischen Thrombozytenspender und -empfänger differenzieren zu können. Dazu sequenzierten sie die polymorphen Regionen der betroffenen Personen, etablierten verschiedene PCR-Methoden wie beispielsweise PCR-SSP und PCR-SSCP zum Nachweis der Polymorphismen (Garritsen et al. 1997, 2001) und konnten so Spenderzellen im Empfänger nachweisen.

Für die Isolierung der mitochondrialen DNA ist kein spezielles Verfahren notwendig; es können daher kommerzielle DNA-Isolierungskits verwendet werden. Das mitochondriale Genom ist wegen seiner Polymorphismen nicht nur für die Chimärismus-Diagnostik gut geeignet, sondern auch bei forensischen und archäologischen Untersuchungen (Alonso et al. 2004) gut einsetzbar, da sehr wenig Ausgangsmaterial benötigt wird. Einschränkungen für den Einsatz in der Chimärismus-Diagnostik ergeben sich jedoch aus der Tatsache, dass Mitochondrien maternal vererbt werden und somit bei Geschwistern kein Unterschied besteht.

1.4.3 Fcγ-Rezeptor IIIb

Der Fcγ-Rezeptor IIIb (FcRIIIb = CD16b) ist ein niedrigaffiner Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten für die Fc-Region komplexer IgG-Antikörper, der zur Immunglobulin-Superfamilie gehört und dessen Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 1 in der Position 1q23.31 liegt (Qiu et al. 1990). Das Fcγ-RIII1-Gen ist 8265 bp lang, enthält 5 Exons und kodiert für eine mRNA von 877 bp Länge. Pro Zelle werden etwa 190.000 Fcγ-Rezeptor IIIb-Moleküle exprimiert (Huizinga et al. 1989).

1999 wurde von der ISBT Granulocyte Working Party eine neue Nomenklatur der granulozytären Alloantigene - das so genannte HNA-System (*Human neutrophil antigens*), dass zur Zeit aus fünf Antigenen besteht (ISBT, Granulocyte Antigen Working Party, 1999), eingeführt. HNA-1a (früher NA1), HNA-1b (früher NA2) und HNA-1c (SH) befinden sich auf dem Fcγ-Rezeptor IIIb. Die entsprechenden Allele werden als FCGR3B*01, FCGR3B*02 und FCGR3B*03 bezeichnet (Shows et al. 1987), wobei die beiden ersten sich in fünf Nukleotiden unterscheiden, die alle in dem Exon 3 kodiert sind und in der distalen extrazellulären Domäne liegen.

Bei Typisierungsuntersuchungen gesunder, nicht-verwandter Blutspender wurde in der europäischen Bevölkerung eine durchschnittliche Genfrequenz von 0,35 für HNA-1a und 0,65 für HNA-1b (Bux et al. 1995) gefunden. Etwa 0,1% der europäischen Bevölkerung exprimieren keinen Fcγ-RIIIb auf ihren neutrophilen Granulozyten und besitzen deshalb auch keine NA1- und NA2-Antigene, weshalb dies als NA-Null Phänotyp bezeichnet wird (de Haas et al. 1995, Fromont et al. 1992).

Neben der Elimination kleiner Immunkomplexe aus der Blutzirkulation erfüllt der Fcγ-Rezeptor IIIb noch andere Funktionen: Er ist involviert in die IgG-abhängige Freisetzung (Exozytose) von granulären Proteinen und vermittelt zusammen mit dem Fcγ-RII die Lysozymfreisetzung (Huizinga et al.1990).

Klinisch bedeutsam sind diese Antigene, weil gegen sie gerichtete Alloantikörper neonatale Neutropenien (NAIN = *Neonatale Alloimmune Neutropenia*) sowie febrile und pulmonale Transfusionsreaktionen (TRALI = *Transfusion-Related Acute Lung Injury*) verursachen können (Bux et al. 2002).

Der HNA-1a/HNA-1b-Polymorphismus des Fcγ-Rezeptor IIIb ist als Genort für die Chimärismusdiagnostik aufgrund der ähnlichen Frequenzverteilung der Allele in der europäischen Bevölkerung gut geeignet. Damit besteht mit der Typisierung dieses Genortes eine gewisse Wahrscheinlichkeit, Differenzen bei Spender und Empfänger zu finden.

1.4.4 Duffy-Blutgruppensystem

Das Duffy-Blutgruppensystem (FY, Antigen Fyb) wurde 1950 entdeckt (Cutbush et al. 1950) und ist von klinischer Bedeutung bei dem Auftreten eines Morbus haemolyticus neonatorum (MHN), einer fetomaternalen Inkompatibilität (Hessner et al. 1999). Ferner spielt es eine Rolle als Rezeptor bei Malaria-Infektionen. Die Blutgruppenantigene Fy^a und Fy^b werden durch die kodominanten Allele FYA und FYB kodiert. Die Blutgruppenantigene Fy^a und Fy^b werden von Endothelzellen kapillärer und postkapillärer Venolen, Epithelzellen der renalen Sammelrohre, Lungenalveolen und von Purkinjezellen des Cerebellums exprimiert (Hadley et al.1984). Die Duffy-Antigene liegen auf einem Glykoprotein (gp-FY), einem Chemokinrezeptor der G-Protein gekoppelten Familie, welches ein 338 Aminosäuren umfassendes Peptid mit sieben transmembranären Domänen (Tournamille et al. 1995) sowie extrazellulärem N- und intrazellulärem C-Terminus ist. Je nach N-Glykosylierungsgrad hat das Duffy-Protein ein Molekulargewicht von 35-43 kDa (Hadley et al. 1984); das zugehörige Gen liegt auf Chromosom 1 in der Position 1q22-q23 (Donahue et al.1968). Der FYA/FYB-Polymorphismus wird durch einen einzelnen Basenaustausch (G131A) verursacht und bewirkt einen Aminosäurenaustausch an Position 44 des Glykoproteins D (Tournamille et al. 1995, Iwamoto et al. 1995).

Das Duffy-Blutgruppensystem umfasst vier Haupt-Phänotypen: Fy(a+b-), Fy(a+b+), Fy(a-b+) und Fy(a-b-), wobei der Fy(a-b-)-Phänotyp, verursacht durch ein stilles Gen FY, insgesamt selten ist, jedoch in der afrikanischen Bevölkerung mit einer Frequenz von 0,7-1(FYA = 0,3, FYB = 0,17) sehr häufig auftritt. Die Allelfrequenz in der weißen Bevölkerung beträgt für FYA 0,41 und für FYB 0,59 (Daniels et al. 2002). In anderen Bevölkerungsgruppen liegen jedoch teilweise erheblich abweichende Verteilungen der Allelfrequenzen vor (Hamblin et al. 2000, Tournamille et al. 1995). Olsson et al. (1998) veröffentlichten eine PCR-SSP-Methode zur Unterscheidung der drei FY-Allele: FYA, FYB sowie das stumme FY. Sie zeigten mit ihrer Studie, dass bei ethnisch verschiedenen Gruppen eine unterschiedliche Genotyp-Frequenzverteilung vorliegt.
Das Glykoprotein-FY ist an Entzündungsreaktionen beteiligt, spielt aber auch eine Rolle bei Malariainfektionen. Es gehört zur Superfamilie der Chemokinrezeptoren und dient akzidentell als Rezeptor für den Malariaerreger Plasmodium vivax (Miller et al. 1976). Fehlt der Rezeptor wie bei Duffy-negativen Fy(a-b-) Personen, besteht eine Resistenz gegen eine Malariainfektion (Livingstone, 1984).

Der FYA/FYB-Polymorphismus ist gut für die Chimärismus-Diagnostik in der europäischen Bevölkerung geeignet, da durch die nahezu gleichhäufige Frequenz der Allele eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass sich Spender und Empfänger unterscheiden. In anderen Bevölkerungsgruppen wäre der Einsatz des FYA/FYB-Polymorphismus in der Chimärismus-Diagnostik zu überdenken, da dort sowohl von der kaukasischen Bevölkerung abweichende Allelfrequenzen als auch andere Mutationen vorkommen. Da die Duffy-Antigene bei einer Reihe von Erkrankungen funktionell wichtig sind, wurden neben serologischen Typisierungsmethoden auch einige PCR-Methoden (Mullighan et al. 1998, Olsson et al. 1998) etabliert, die eine zuverlässige und einfache Typisierung zulassen.

1.4.5 Kidd-Blutgruppensystem

Das Kidd-Antigen (JK) liegt auf einem ca. 45 kDa schweren Glykoprotein, welches die Funktion eines Harnstoff-Transporters namens HUT11 bzw. SLC14A1 *(solute carrier family 14, member 1*) innehat. Das zugehörige Gen liegt auf Chromosom 18 in der Position 18q11-12 und enthält 11 Exons (Olives et al. 1995).

Die zwei kodominanten Allele des JK-Gens, JKA und JKB, kommen in allen Populationen, jedoch mit unterschiedlicher Frequenz, vor. Die Häufigkeit liegt in der kaukasischen Bevölkerung bei 0.51 respektive 0.49 (Daniels, 2002); es gibt vier verschiedene Phänotypen Jk(a+b-), Jk(a-b+), Jk(a+b+) und selten Jk(a-b-), auch Jk_{null} genannt, mit zahlreichen Varianten (Lucien et al. 1998 und 2002, Sidoux-Walter et al. 2000). Der JKA/JKB-Polymorphismus entsteht durch einen Basenaustausch (G838A) in Position 280 in Exon 9, der einen Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Asparagin zur Folge hat (Olives et al. 1997). Die den Phänotyp Jk_{null} besitzenden Personen haben keine Jk-Antigen-tragenden Moleküle und zeigen daher einen selektiven Mangel des Harnstofftransporters, der je nach Mutation auch klinisch stumm verlaufen kann, da der Verlust durch andere Transporter kompensiert werden kann (Heaton et al. 1982, Fröhlich et al. 1991). Er wird auf Erythrozyten und in der Nierenmarkregion, insbesondere auf den Endothelzellen der Vasa recta der inneren und äußeren Markregion (Xu et al. 1997, Promeneur et al. 1996), exprimiert.

Der Harnstoff-Transporter ist an der Harnkonzentrierung und der Harnstoffexkretion durch die Niere (Knepper et al. 1990, Gillis et al. 1993), aber auch an der osmotischen Stabilisierung und Verformbarkeit von Erythrozyten, beteiligt. Antikörper gegen Kidd-Antigene können bei inkompatibler Transfusion schwere hämolytische Transfusionsreaktionen bis hin zum Multiorganversagen auslösen (Pineda et al. 1999).

Auch dieser Genort eignet sich aufgrund seiner nahezu gleich häufigen Frequenzverteilung der Allele in der europäischen Bevölkerung gut für die Chimärismus-Diagnostik. Auch hier gibt es, durch seine klinische Relevanz begründet, neben serologischen Typisierungsmethoden eine Reihe molekulargenetischer Verfahren, die eine zuverlässige und exakte Typisierung des JKA/JKB-Polymorphismus ermöglichen.

1.4.6 Amelogenin-Gen

Das Amelogenin Gen (AMG) kodiert für ein Protein, welches von Ameloblasten sezerniert wird und mit über 90% den Hauptbestandteil der organischen extrazellulären Matrix des Zahnschmelzes bildet.

Die genomische Struktur des Amelogenin-Gens umfasst drei Exons und wird sowohl auf dem X- (AMLX) als auch auf dem Y-Chromosom (AMLY) kodiert. Das Amelogenin-Gen liegt auf dem Chromosom X an der Position Xp22.1-p22.3 l und Y bei Yq11 in der Nähe des Zentromers (Lau et al.1989). Die Exon-Intron-Struktur unterscheidet sich insbesondere im Intron 1, wobei das AMLX eine 177bp Insertion enthält (Nakahori et al. 1991).

Das Amelogenin-Protein umfasst 28kDa (Bailey et al. 1992, Catalano-Sherman et al. 1993). Das auf dem X-Chromosom kodierte Protein unterscheidet sich von dem auf dem Y-Chromosom kodierten durch ein Fehlen von Methionin an Position 29 (Salido et al. 1992).

Funktionell spielt das Protein eine Rolle im Rahmen der Regulation des kristallinen Wachstums der Zähne (Gibson et al. 2001). Southern-Blot Analysen zeigten einen Zusammenhang zwischen Deletionen bzw. Punktmutationen des Amelogenin-Gens auf dem X-Chromosom und der X-chromosomal vererbten Amelogenesis imperfecta und phänotypisch variabel auftretenden, hypoplastischen Defekten und Mineralisierungsstörungen (Lagerstrom et al. 1991).

Die Analyse des Amelogenin-Gens kann sowohl im Rahmen der Geschlechtsbestimmung archäologischer Funde (Faerman et al. 1995) als auch bei forensischen Untersuchungen (Alonso et al. 2004, Roccazzello et al. 2004) und in der pränatalen Diagnostik eingesetzt werden. Das Amelogenin-Gen als Genort wird bei geschlechtsdifferenten Spender-Empfängerpaaren in der Chimärismusdiagnostik verwendet.

2 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll eine weitere - neben der routinemäßig durchgeführten Short-Tandem-Repeats-Polymorphismus-Analyse (STR) - PCR-basierte Methode zur Mikrochimärismusdiagnostik nach allogener Stammzell-Transplantation (SZT), die mit hoher Sensitivität einfach und schnell durchführbar ist, entwickelt werden.

Es soll untersucht werden, ob und inwieweit der Nachweis mitochondrialer DNA sensitiver ist als der Nachweis nukleärer DNA. Menschliche Leukozyten enthalten etwa 10.000 Mitochondrien mit einem spezifischen Genom. Diese Tatsache lässt vermuten, dass unter Verwendung von mitochondrialen Sequenzpolymorphismen eine beträchtliche Sensitivitätssteigerung gegenüber dem Nachweis nukleärer Polymorphismen erreicht werden könnte. Hierzu sollen in vitro hergestellte Verdünnungsreihen unterschiedliche Grade an Mikrochimärismus simulieren. Diese sollen sowohl mittels PCR-SSP und als auch mittels LightCycler-PCR untersucht werden und die Sensitivität beider Verfahren verglichen werden. Weiter soll untersucht werden, ob der Nachweis mitochondrialer Polymorphismen in der Mikrochimärismusdiagnostik einsetzbar ist.

Im Weiteren soll an realen Spender-Empfängerpaaren die Eignung der genannten Auswahl an polymorphen Genorten zur Mikrochimärismusdiagnostik durch Vergleich mit der derzeitigen Standard-Methode (STR-Analyse) überprüft werden. Ferner soll untersucht werden, ob mit dieser Methode Aussagen hinsichtlich einer Rezidiverkennung frühzeitig getroffen werden können.

3 Material

3.1 Geräte

Analysen-Waagen: PT 150 (Sartorius, Göttingen)
AE 100 S (Mettler-Toledo, Gießen)
Brutschrank B5042 (Heraeus, Hanau)
Gelelektrophoresekammer (Keutz Laborgeräte, Reiskirchen)
Mikrowellenherd R220 A (Sharp-Electronics, G.B.)
Netzgerät Microcomputer electrophoresis power supply Consort E 452, E 863, E 443 (Keutz Laborgeräte, Reiskirchen)
Photoanlage Digit-Store duo concept intas® Gesamtsystem 95 KFE 103 (IBI, NewHaven, Connecticut, USA)
Pipetten:Vario-Mikroliterpipetten 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (Eppendorf, Hamburg)
Rüttler: REAX 2000 und REAX top (Heidolph, Kehlheim)
Speed Vac-Zentrifuge TZ H (Keutz Laborgeräte, Reiskirchen)
Spektralphotometer Spekol UV-Vis 3.01 (Zeiss, Jena)
Sequenzierautomat: ABI Prism 310 und 3100 Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt)
Thermocycler:- GeneAmp PCR System 2700 und 9600 (Perkin Elmer Cetus, Vaterstetten)
- PCR-Express HBPX 220 (Hybaid, Heidelberg)
- LightCycler ™ Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg)
TRIA-Thermoblock (Biometra, Göttingen)
Waschzentrifuge DiaCent2 (DiaMed AG, Cressier, Schweiz)
Zentrifugen: - Biofuge pico (Heraeus, Hamburg)
- Micro 20 und Rotixa A (Hettich, Tuttlingen)

3.2 Laborbedarf

Centri Sep Spin Columns (Applied Biosystems, Weiterstadt)
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml (Eppendorf, Hamburg)
LightCycler Capillaries (Fa. Boehringer, Mannheim)
PCR-Reaktionsgefäße:
- GenAmp Reaction Tubes, thin walled, 0,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
- PCR micro tubes 1x und 8x 0,2 ml (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA/USA)

- PCR tube caps (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA/USA)

Pipettenspitzen:

- 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Greiner, Nürtingen)
- Sterilfiltertips, gestopft, 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (Biozym Diagnostik,Ohlendorf)

Polaroidfilm Typ 667 (Hertfordshire, England)

Safelock-Aufbewahrungsröhrchen (Eppendorf, Hamburg)

Sequenzierungsgefäße, 0,5 ml; (ABI PRISM Genetic Analyzer, Perkin Elmer, Langen)

Zentrifugenröhrchen, Kunststoff, 15 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

3.3 Reagenzien

3.3.1 Immunologie

Seraclone Anti-JK^{a}, - JK^{b} und Anti-Duffy^{a}, -Duffy^{b} humane monoklonale Antikörper der Immunglobulinklasse IgM und Anti Human-Globulin Color (Antiglobulintest), monoklonales Anti-IgG (Biotest AG, Dreieich)

3.3.2 Molekularbiologie

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM) (Promega, Heidelberg)

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt und sind im Anhang unter 10.1 aufgeführt.

Taq-DNA-Polymerase-Puffer (= 10x, PCR-Puffer), Taq-DNA-Polymerase 5000 U/ml und AmpliTaq Gold® (Perkin Elmer Cetus, Vaterstetten)

TSR-Template Supression Reagent (Applied Biosystems, Weiterstadt)

3.4 Testkits

ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V.3.0 und V.3.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt)

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

QIAquick Gel-extraction Kit (Qiagene GmbH, Hilden)

Puregene DNA Purification System (Gentra systems, Minnesota, USA)

Ultra PCR Clean-Up Kit (ABgene, Surrey, U.K.)

PowerPlex®16 System (Promega, Heidelberg)

3.5 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in Analysenqualität bezogen.
Agarose NA (Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden)
Aqua ad iniectabilia, 10 ml-Ampullen (Braun, Heidelberg)
Bromphenolblau (Bio-Rad, München)

3.6 Computersoftware

ABI Prism Sequencing Software, Version 3.7 und Version 3.0 (Applied Biosystems, Weiterstadt)
LightCycler Roche Software, Version 3 (Roche Diagnostics, Mannheim)
Chromas Version 1.45 (32-bit) (Technelysium Pty Ltd., Queensland, AUS)
Genedoc Version 2.6.001 (GNU Free Software Foundation, Boston USA)

4 Methoden

4.1 DNA-Extraktion

Die Isolierung genomischer DNA ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Amplifikation mittels PCR.

Die hier beschriebene Methode ermöglicht die direkte Extraktion genomischer, mitochondrialer und viraler DNA aus Blut, buffy coat, Knochenmark, kultivierten Zellen, Tier- und Pflanzengewebe, gram-positiven und -negativen Bakterien und Hefen.

Das Verfahren basiert auf der Lyse in einem Pellet angereicherter, kernhaltiger Zellen mit anschließender Salzpräzipitation. Die DNA wird dann mit Isopropanol und Ethanol gefällt, gewaschen und in einem speziellen Puffer gelöst.

Isolierung von DNA mit dem Puregene DNA Purification System Kit

Reagenzien:

Bezeichnung	Funktion
RBC Lysis solution	Zell-Lysepuffer (Erythrozyten-Lysepuffer)
Cell Lysis solution	allgemeiner Zell-Lysepuffer
Protein Precipitation solution	Fällungspuffer für Proteine
Isopropanol 100 %	zur DNA-Fällung
Ethanol 70 %	zur Reinigung
DNA hydration Solution	Aufbewahrungslösung bzw. Puffer

Vorgehen :

Pro 3 ml EDTA Blutprobe wurden zwei 15 ml Röhrchen und 1 Aufbewahrungsröhrchen benötigt.

- 9 ml *RBC Lysis Solution* mit 3 ml Blut und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 2000 Upm Überstand vorsichtig entfernen, anschließend Pellet homogen aufmischen
- Zugeben von 3 ml *Cell Lysis Solution* und 1 ml *Protein Precipitation Solution*; heftiges Schütteln (*vortexen*) der Suspension für mindestens 20 Sekunden, bis braune Flocken ausfallen
- Erneutes Zentrifugieren 10 Minuten, 2000 Upm

- Überführen des Überstandes in neues Röhrchen und mit 3 ml *Isopropanol* waschen; Röhrchen vorsichtig schwenken, bis DNA Fäden sichtbar werden
- Zentrifugieren bei 2000 Upm für 5 Minuten, Verwerfen des Überstandes und das Pellet mit 3 ml *Ethanol* waschen
- Zentrifugieren bei 2000 Upm für 5 Minuten, Überstand erneut verwerfen; anschließend 15-minütige Trocknungsphase bei Raumtemperatur (RT)
- Pellet mit 800 µl DNA *Hydratation solution* resupendieren und Lösen bzw. Quellen der DNA über Nacht bei RT

4.2 Konzentrationsbestimmung und DNA-Qualitätskontrolle

Die Reinheit und Ausbeute der DNA Extraktion wird mit einem Photometer ermittelt. Desoxyribonukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, während Proteine eines bei 280 nm zeigen. So kann aus dem Quotienten der Wellenlängen (OD_{260nm}/OD_{280nm}) (OD, Optische Dichte) die Reinheit der DNA-Probe ermittelt werden. Um optimale Ergebnisse bei der Polymerase-Kettenreaktion erzielen zu können, sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen.
Die DNA-Probe wurde mit Aqua destillata (Aqua dest.) verdünnt und in einer Quarzküvette gemessen. Die Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:
Konzentration [µg/ml] = OD_{260mm} x 50 [µg/ml] x F x Probenvolumen ÷1000 [µl]
mit F = Verdünnungsfaktor der DNA in Aqua dest.
Die Konzentration der wässrigen DNA-Lösung wurde auf 33 ng/µl eingestellt.

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode mit der spezifische Genabschnitte eines DNA-Doppelstranges vervielfältigt werden können, welche von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden (Saiki et al. 1985, Mullis 1990).
Die DNA ist ein doppelsträngiges Molekül, bestehend aus Desoxyribonukleotid-Ketten. Diese tragen außen durch Phosphodiesterbindungen verknüpfte Zuckerreste und innen hydrophobe Purin- bzw. Pyrimidinbasen. Die Basen Adenin (A) und Thymidin (T) sowie Cytosin (C) und Guanin (G), welche jeweils komplementär zueinander sind, verknüpfen beide Stränge über Wasserstoffbrückenbindungen. So bildet sich durch Verdrillung des Doppelstranges eine stabile dreidimensionale Doppelhelix.
Für eine PCR braucht man Oligonukleotid-Primer, DNA-Polymerase, Desoxynukleotid-triphosphate (dNTPs), die zu amplifizierende DNA und Puffer.

Oligonucleotid-Primer sind kurze, aus etwa 18-25 Basen bestehende, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu einer bestimmten DNA-Sequenz sind. Sie lagern sich während der PCR an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt an und ermöglichen so der DNA-Polymerase ein Anlagern an die DNA, und damit den Beginn der DNA-Neusynthese.
Die DNA-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym, das von dem Bakterium Thermus aquaticus stammt (Taq-Polymerase). Sie lagert sich am Ende der Primer an den zu amplifizierenden einzelsträngigen DNA-Abschnitt an und synthetisiert mit Hilfe von dNTPs (Desoxyribonukleosid-Triphosphate) einem zum Original komplementärem DNA-Strang. Man braucht einen Vorwärtsprimer (sense-Primer) analog dem 5`-Ende des zu amplifizierenden Segmentes und einen Rückwärtsprimer (anti-sense Primer), der komplementär und revers zu der Sequenz am 3`-Ende ist. Die dNTPs sind dreifach phosphorylierte DNA-Basen bestehend aus jeweils einer der vier Basen, einem Zucker und drei Phosphatresten.
Am Anfang der PCR wird die DNA bei 95°C denaturiert, d.h. in ihre Einzelstränge geteilt. Nun wird das Gemisch auf etwa 60°C abgekühlt, was das Annealing ermöglicht. Dabei lagern sich die Oligonukleotid-Primer an eine komplementäre Sequenz der Einzelstränge. Nun werden in einem Elongationsschritt durch die DNA-Polymerase die Einzelstränge bei 72°C zum jeweiligen Doppelstrang ergänzt.
In einem Zyklus, der aus Denaturierung, Annealing und Elongation besteht, wird die Zahl der Matrizen-DNA verdoppelt. Auch die neu produzierten DNA-Abschnitte dienen in den folgenden Zyklen als Matrizen-DNA, so dass die Vermehrung der Ziel-Sequenz exponentiell erfolgt. Nach Abschluss der Reaktion kann die ungefähre Kopienzahl nach folgender Formel geschätzt werden:

$(2^n - 2n) \bullet x$

n = Anzahl der Zyklen

2n = Produkte des 1. und 2. Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist

x = die ursprünglich vorhandene Kopienzahl des zu vervielfältigenden Abschnittes

Nach ungefähr 35 bis 45 Zyklen kommt es zu einem Plateaueffekt. Dabei stellen meist die Bildung von Primer-Dimeren und dNTP-Mangel den begrenzenden Faktor für eine weitere Vermehrung der Ziel-DNA dar. Eine weitere Analyse der Amplifikate erfolgt meist mittels Agarose-Gelelektrophorese, s. Kap. 4.5.
Die für die Standard-PCR verwendete Taq-Gold-Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiv. Das Enzym kann deshalb ohne Kühlvorkehrungen, wie z.B. Ansatz auf Eis, bei Raumtemperatur zum Reaktionsansatz hinzugefügt werden. Ein der PCR vorgeschalteter

Vorheizschritt 10 Minuten bei 95°C, der sogenannte Hot-Start, aktiviert das blockierte Enzym.
Es muß während des Arbeitens exakt auf saubere Handschuhe und Pipettenspitzen geachtet werden, um DNA-Verunreinigungen zu vermeiden. Zudem ist eine Trennung von PCR-Ansatzplatz (prä-PCR) und weiterer Verarbeitung nach erfolgter PCR (post-PCR) notwendig, da PCR-Produkte Aerosole bilden können, die neue Ansätze kontaminieren könnten.

Primer-Design

Um während der PCR optimal funktionierende Oligonukleotidprimer einsetzen zu können, müssen beim Primerdesign verschiedene Eigenschaften berücksichtigt und optimiert werden:
So richtet sich die *Annealing-Temperatur* nach der Primer-Länge und dem Anteil der verschiedenen Basen (A, T, C, G), welche zusammen die Schmelztemperatur (T_m) bestimmen.
Eine einfache Gleichung berechnet näherungsweise die T_m aus dem GC-Gehalt des Primers:
T_m =4 x (Anzahl G bzw. C) + (Anzahl A bzw. T)
Nach der Höhe der Schmelztemperatur, die meist zwischen 45°C und 55°C liegt, muss nun experimentell die optimale Annealing-Temperatur, die etwa 3-5°C über der Schmelztemperatur liegt, gefunden werden. Je höher diese gewählt wird, desto höher wird die Spezifität, mit der sich die Primer an die für sie komplementäre Sequenz binden, desto geringer wird jedoch die Ausbeute der PCR.
Um die Wahrscheinlichkeit *falscher Hybridisierung* der Primer zu vermindern, sollten die Primer mindestens 18 Basenpaare lang sein. Ferner sollten 4 oder mehr G's oder C's direkt aufeinanderfolgend vermieden werden.
Beim Primerdesign sollten sich gegenseitig komplementäre Basenabfolgen (sog. Palindrome) vermieden werden, um die Bildung von sog. *Hairpins,* speziellen Verdrillungen, vorzubeugen. Ebenso sollten die Primer keine Nukleotidsequenzen enthalten, die ein Annealing eines Primermoleküls an sich selbst oder den anderen Primer, der der PCR-Reaktion zugesetzt worden ist, erlauben, um eine *Primer-Dimerbildung* zu vermeiden. Sowohl die *Hairpins* als auch die *Primer-Dimere* verhindern ein optimales Arbeiten der Primer und verringern die Ausbeute der PCR.
Auch die Basenreihenfolge insbesondere am *3'Ende des Primers* beeinflusst seine Spezifität. Der Primer sollte an seinem 5' Ende „klebriger" als am 3' Ende sein. Die „Klebrigkeit" wird durch einen hohen GC-Gehalt bestimmt und hat Auswirkungen auf die Spezifität des Primers. Ein GC-Paar am 5'oder 3'Ende des Oligonukleotids stabilisiert die Bindung bei höheren

Temperaturen wie sie beim Arbeiten mit der TaqDNA-Polymerase gebraucht werden. G und C-Ketten fördern jedoch inadäquate Baasenpaarungen und sollten deshalb vermieden werden.

4.3.1 Unterscheidung von Allelen: PCR-SSP

Allele sind unterschiedliche Ausprägungen der Sequenzen eines Gens, die auf homologen Chromosomen am gleichen Genort lokalisiert sind. Für den Nachweis bekannter Allele gibt es grundsätzlich zwei Methoden:
Bei dem allelspezifischen oder auch sequenzspezifischen Nachweis, der sog. PCR-SSP, die hier angewandt wurde, liegt der Primer mit seinem 3'Ende direkt auf der interessierenden Base, so dass er zwar mit dieser hybridisiert, jedoch nicht mit der Base des anderen Allels (s. Abb. 4.1). Eine Amplifikationsreaktion findet demnach nur dann statt, wenn das 3'Ende des Primers komplementär zur Zielsequenz ist. Die Differenzierung einzelner Allele bzw. Allelgruppen erfolgt über die Bildung spezifischer PCR-Produkte durch Primer-Kombinationen, die gemäß der Sequenzinformation gewählt werden.
Im Gegensatz zur unten genannten PCR-SSO erfolgt eine Differenzierung bereits während der Amplifikationsreaktion, so dass keine anschließende Indikatorreaktion nötig ist.

Probe A:

Primer
(5') - C T A C C A A T T **G** - (3') → **Verlängerung**
| | | | | | | | | |
(3') - G A T G G T T A A **C** C T A C G T A T - (5')
Matrizenstrang A

Probe B:

Primer
(5') - C T A C C A A T T **G** - (3') **keine Verlängerung**
| | | | | | | | | ⊥
(3') - G A T G G T T A A **G** C T A C G T A T - (5')
Matrizenstrang B

***Abb. 4.1: schematische Darstellung der Primerkonstruktion bei der PCR-SSP**: Bei **Probe A** entsteht ein Produkt, da das Ende des Primers komplementär zur Matrize ist. Der Primer lagert sich an die Sequenz an und kann abgelesen werden. Bei **Probe B** entsteht kein Produkt, da das letzte Nukleotid des Primers, nach dem verlängert werden soll, nicht komplementär ist.*

Als interne Qualitätskontrolle der PCR-SSP wird zusätzlich jedem Reaktionsansatz ein Primerpaar für das Humane Wachstumshormon-Gen (*Human Growth Hormone = HGH*) zugefügt, das mit den sequenzspezifischen Primern um dNTPs und Enzymaktivität

konkurriert. Dieses Primerpaar liefert bei ordnungsgemäßen Amplifikationsbedingungen, unabhängig von der Entstehung spezifischer Allelprodukte ein PCR-Produkt. So sieht man bei der Auswertung, die mittels Gelelektrophorese erfolgt, zwei Banden, eine interne Kontrollbande und, wenn das gesuchte Allel vorliegt, eine zweite Bande, die das spezifische Allelprodukt repräsentiert. Wenn diese fehlt, kann auf die Abwesenheit des betreffenden Allels geschlossen werden.

Zur Unterscheidung bekannter Allele gibt es zwei weitere Methoden: die Hybridisierung mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (PCR-SSO) bzw. die Differenzierung mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (PCR-RFLP).
Bei beiden Verfahren erfolgt zunächst mittels PCR eine Amplifizierung eines exon-spezifischen DNA-Abschnittes. Anschließend findet bei der RFLP-Analyse eine Differenzierung einzelner Allele bzw. Allelgruppen durch Spaltung des PCR-Produktes mittels Restriktionsendonukleasen, welche entweder aus Bakterien gewonnen oder gentechnisch hergestellt werden, und anschließender gelelektrophoretischer Analyse statt. Voraussetzung dieses Verfahrens sind allelspezifische Sequenzunterschiede mit unterschiedlicher Verteilung der Restriktionsenzym-Schnittstellen im Bereich der amplifizierten Sequenzregion.
Bei der PCR-SSO erfolgt die Differenzierung einzelner Allele bzw. -Allelgruppen nach der Genort-spezifischen PCR-Amplifizierung durch eine Hybridisierung mit sequenzspezifischen, kurzen Gensonden (Oligonukleotiden). Eine Hybridisierung findet statt, wenn die Oligonukleotide zur Zielsequenz komplementär sind. Die Oligonukleotidsonden müssen markiert sein, um die Bindung sichtbar machen zu können. Hierzu wird häufig Biotin-Streptavidin verwendet.
In der vorliegenden Arbeit wurde auschließlich die PCR-SSP-Methode zum Nachweis bekannter Allele verwendet.

4.4 PCR-SSP Typisierungen

4.4.1 HLA-DRB1-Typisierung

Einem Genlocus mit einer Kopie pro Zelle (bei heterozygoten Personen) entsprechend, wurden die genomischen Sequenzen des HLA-DRB1-Locus mittels gruppenspezifischer Vorwärtsprimer für HLA-DRB1*01, *03, *04, *07, *09, *11, *13, *15 und einem gemeinsamem Rückwärtsprimer (s. Anhang 11.1.1) amplifiziert. Dazu wurde DNA von

Personen mit bekannten HLA-DRB1-Merkmalen verwendet und in die PCR-SSP eingesetzt. Die Ergebnisse der Typisierung der HLA-DRB1 Allele sind im Anhang 11.5.1 abgebildet. Als Referenz wurden die von der American Society of Histocompatibility and Immunogenetics veröffentlichten Sequenzen (www.ashi-hls.org/) verwendet.

Reagenzien:

Reagenz	Zusammensetzung	Menge	Ausgangs-Konzentration	
Mastermix für	Taq-Puffer	2,00 µl		10x
1 Ansatz	dNTP-mix	0,4 µl		10 mM
	Primer 1 (*sense)*	2,00 µl	10,0 pmol/µl	
	Primer 2 (*antisense)*	2,00 µl	10,0 pmol/µl	
	HGH I-Primer	2,00 µl	1,25 pmol/µl	
	HGH II-Primer	2,00 µl	1,25 pmol/µl	
	Aqua dest.	2,44 µl		
	Taq-Polymerase	0,16 µl		
PCR-Ansatz	*Mastermix*	11,00 µl		
	DNA-Probe	9,00 µl	33 ng/ µl	

Vorgehen:

- PCR-Vormischung für jede Typisierung vorbereiten
- Vom PCR Ansatz „*Mastermix*“ je 11,0 µl in ein 0,2 ml PCR micro tube hineinpipettieren und 9,0 µl DNA- Probe (33 ng/µl Konzentration) hinzufügen
- micro tubes mit passenden Deckeln (micro caps) verschließen
- Proben in vorgeheizten Thermal Cycler GeneAmp PCR System 2700 stellen und bei 95°C, 10 Minuten DNA denaturieren
- Temperatur-Protokoll:

  95°C, 30 Sekunden (Denaturierung)
  65°C, 1 Minuten (Annealing + Elongation) } 10 Zyklen

- 95°C, 30 Sekunden (Denaturierung)
  61°C, 50 Sekunden (Annealing)
  72°C, 40 Sekunden (Elongation) } 30 Zyklen
- danach Abkühlen auf 20°C
- Durchführen einer Gelelektrophorese s.Kap. 4.4.

4.4.2 HVR1-Typisierung

Die HVR1-Typisierung erfolgt ähnlich der HLA-DRB1-Typisierung mittels PCR-SSP. Für den Nachweis mitochondrialer DNA wurde die HV1-Region derselben Personen sequenziert. Bei der HVR1-PCR werden sowohl spezifische Vorwärts- als auch spezifische Rückwärtsprimer verwendet. Als Referenz-Sequenz wurde die von Andrews et al. (1999) revidierte Sequenz (rCRS) #NC_001807.3/gi:13959823 verwendet. Die Primer werden folgendermaßen für jede Person gesondert konstruiert:

- DNA-Isolierung aus Blutprobe gesunder Spender (s. Kap.4.1)
- Sequenzierung der HVR1 jedes Spenders (s. Kap.4.9)
- Anschließender Vergleich mit der Consensussequenz, um charakteristische mt-Polymorphismen in der HVR1 für jede Person aufzuspüren (s. Anhang 11.5.2)
- Konstruktion spezifischer Vorwärts-und Rückwärtsprimer gemäß der gefundenen mt-Polymorphismen
- Einsetzen der spezifischen Primer in die PCR-SSP

Entsprechend der gefundenen Polymophismen der HV-Region 1 wurden 15 Primerpaare konstruiert. Für diese Primer wurden insgesamt vier Primer-abhängige-PCR-Protokolle, die sich in den Annealing-Temperaturen unterscheiden, erstellt. Die einzelnen Primer mit ihren jeweiligen PCR-Programmen sind im Anhang 11.1.2 und 11.2.1 aufgeführt. Das Protokoll ist in Kap. 4.4.1 aufgelistet.

In Abb. 4.2 sind beispielhaft die Sequenzen eines Spenderpaares samt jeweiliger Punktmutationen an unterschiedlichen Stellen der HV1-Region dargestellt (Consensussequenz sowie die Sequenzen aller untersuchten Personen s. Anhang 11.5.2). Sowohl Vorwärtsprimer als auch Rückwärtsprimer endeten jeweils auf einer Mutation.

Abb. 4.2: HVR1-Consensussequenz (oben) und Sequenzen eines Spenderpaares mit gefundenen Punktmutationen(darunter). *Die rechteckigen Kästen zeigen die Anlagerungsstellen der sequenzspezifischen Primer.*

In Abb. 4.3 wird der gelelektrophoretische Nachweis der spender-spezifischen Amplifikation aus Abb. 4.2 des Spenderpaares gezeigt. Die Kontrollprimer für das eingesetzte HGH-Gen (s. Kapitel 4.3.1) konkurrieren mit den sequenzspezifischen Primern um dNTPs und Enzymaktivität, daher ist die Kontrollbande nur deutlich zu sehen, wenn kein spezifisches Produkt entsteht.

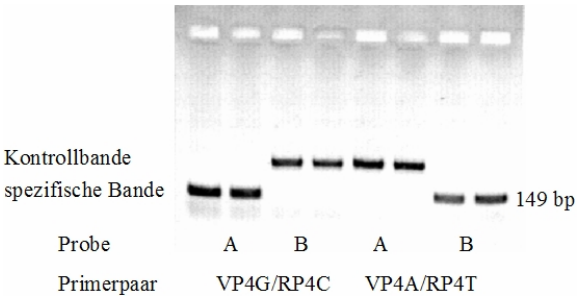

Abb. 4.3: gelelektrophoretischer Nachweis des in Abb. 4.2 gezeigten HVR1-Polymorphismus mittels PCR-SSP. *Die Primer HVR1VP4G und HVR1RP4G waren spezifisch für die Probe A, HVR1VP4A und HVR1RP4T für die Probe B. So zeigte die linke Seite eine spezifische Bande bei Probe A und lediglich die Kontrollbande des HGH (obere) bei Probe B. In der rechten Hälfte der Abbildung verhält es sich genau umgekehrt.*

4.4.3 Fcγ-Rezeptor IIIb-Typisierung

Auf dem Fcγ-Rezeptor IIIb (CD16b) findet man den HNA-1a-/HNA-1b-Polymorphismus (früher NA1/NA2), der mittels PCR-SSP nachgewiesen werden kann (s. Kap.1.4.3).

Die beiden Allele HNA-1a- und HNA-1b unterscheiden sich in 5 Nukleotiden. Die hier verwendeten HNA-1a-und HNA-1b- spezifischen Primer binden innerhalb des FCGR3B Gens im Exon 3 und wurden zur HNA-1a- und HNA-1b-Typisierung konstruiert und veröffentlicht (Bux et al. 1995). Die Primersequenzen sind unter 11.1.3 im Anhang aufgeführt. Die Referenzsequenz lautet AJ 581 669.

Reagenzien:

Reagenz	**Zusammen-Setzung**	**Menge**	**Ausgangs-konzentration**	
Mastermix für 1 Ansatz	Taq- Puffer	2,50 µl		10x
	dNTP-mix	0,50 µl		10mM
	Primer HNA-1a/1b (*sense)*	2,00 µl	10,00 pmol/µl	
	Primer consensus (*antisense)*	2,00 µl	10,00 pmol/µl	
	HGH I und II	5,00 µl	1,25 pmol/µl	
	Aqua dest.	9,75 µl		
	Taq-Polymerase	0,25 µl		
PCR-Ansatz	PCR Vormischung	22,00 µl		
	DNA-Probe	3,00 µl	33 ng/ µl	

Vorgehen: s. Kap. 4.4.1

Temperaturprotokoll: s. Anhang 11.2.2

4.4.4 Duffy- und Kidd-Typisierung

Duffy- und Kidd-Allele werden nach o.g. Schema (s. Kap. 4.4.1) amplifiziert, wobei die Primersequenzen unter 11.1.3 und die PCR-Bedingungen im Anhang unter 11.2.2 aufgeführt sind.

Die FYA/FYB-Typisierung erfolgt mit allelspezifischen Vorwärtsprimern und einem gemeinsamen Rückwärtsprimer gemäß der im Kap. 1.4.4 genannten Punktmutation und der 2489 bp langen Referenz-Sequenz *HSDARC* (X85785).

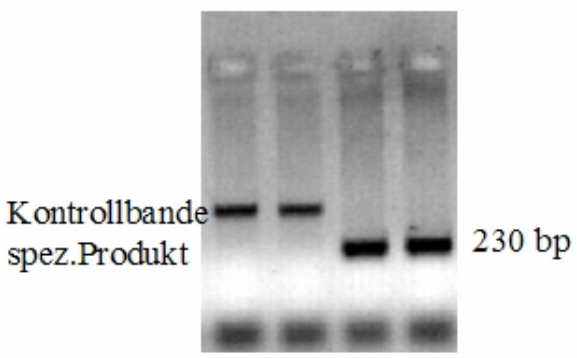

Abb. 4.4: gelelektrophoretische Auswertung einer FYA-Typisierung mittels PCR-SSP

Die Abbildung 4.4 zeigt eine FYA Typisierung mit der PCR-SSP. Entsprechend wurde die PCR-SSP für den FYB-Nachweis etabliert.

Für die PCR mit dem JKA- und JKB-Polymorphismus werden - ähnlich der FYA/FYB-Typisierung - allelspezifische Vorwärtsprimer und ein gemeinsamer Rückwärtsprimer verwendet (s. Anhang 11.1.3). Das bei der PCR entstehende, spezifische Produkt umfasst 113 bp. Als Referenzsequenzen dienten die Genbank-Einträge NT_028380 und NM_015865, welche ausschnittweise im Anhang unter 11.3.5 aufgeführt sind.
Gemäß der Referenz-Sequenz unter NT_028380 liegt der Vorwärtsprimer an Position 1145030-1145049. Er endet auf der Punktmutation (Basenaustausch A→G), der den JKA- und JKB -Polymorphismus verursacht. Der Rückwärtsprimer, am Exonende liegend, umfasst 19 Basen, wobei die letzten 4 Basen schon ins angrenzende Intron reichen.

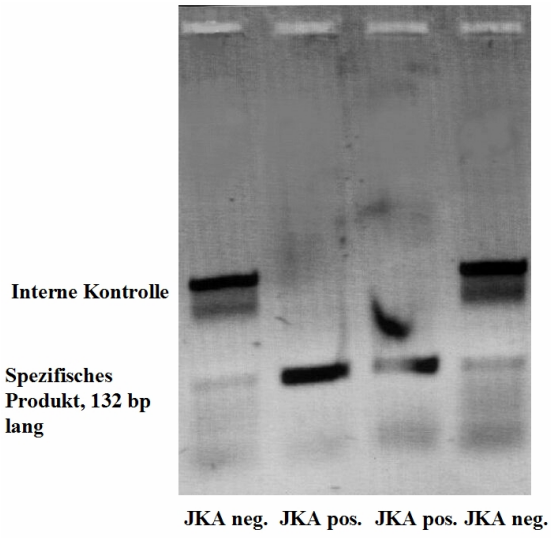

Abb. 4.5: gelelektrophoretische Auswertung einer JKA-Typisierung mittels PCR-SSP.

Reagenzien:

Reagenz	Zusammensetzung	Menge	Ausgangskonzentration	
Mastermix für 1 Ansatz	Taq-Puffer	2,00 µl		10 x
	dNTP-mix	0,40 µl		10 mM
	Primer I (*sense)*	2,00 µl	10,00 pmol/µl	
	Primer II (*antisense)*	2,00 µl	10,00 pmol/µl	
	HGH I und II	1,60 µl	1,25 pmol/µl	
	Aqua dest.	8,84 µl		
	Taq- Polymerase	0,16 µl		
PCR-Ansatz	PCR Vormischung	17,00 µl		
	DNA-Probe	3,00 µl	33 ng/ µl	

Protokoll: siehe 4.4.1

Temperaturprotokolle: siehe 11.2.2

Die PCR-SSP Etablierung der JKA-/JKB-Typisierung (s. Abb. 4.4 und 4.5) und der FYA/FYB-Typisierung wurde mittels serologischer Typisierung validiert.

4.4.5 Serologische Blutgruppenbestimmung für die Blutgruppen-Systeme Duffy und Kidd

Bei der serologischen Blutgruppenbestimmung werden Merkmale (sog. Antigene) auf der Oberfläche von Erythrozyten durch Reaktion mit humanen Antikörpern bekannter Spezifität nachgewiesen. Durch den anschließenden Einsatz von Anti-Humanglobulin-Antikörpern (Coombs-Serum) erreicht man eine Agglutination der antikörperbeladenen Erythrozyten. Findet also der spezifische Antikörper sein korrespondierendes Antigen auf der Zelloberfläche, so kommt es unter Zusatz von Coombs-Serum zur Agglutination, wodurch dann das Antigen definiert ist.

Reagenzien:

Seraclone Anti-Duffy[a], -Duffy[b] bzw. Anti- Kidd[a], -Kidd[b], Humane monoklonale Antikörper der Immunglobulinklasse IgM	Testserum
Seraclone Anti-Human-Globulin Color (Antiglobulintest), monoklonales Anti IgG	Coombs-Serum
Isotonische Kochsalzlösung	Aufschwemm-Lösung

Vorgehen:

- die zu untersuchenden Erythrozyten in 3-5%iger isotonischer Kochsalzlösung aufschwemmen
- 1-2 Tropfen Testserum und einen Tropfen der Erythrozyten-Suspension in ein Röhrchen geben und gut mischen
- 30 Minuten bei 37°C inkubieren
- Erythrozyten nach Inkubation dreimal mit isotonischer Kochsalzlösung waschen und dann Überstand abgießen
- 2 Tropfen Anti-Human-Immunglobulin- (Coombs-) Serum dazu geben und mischen
- 1 Minute bei 1000 Upm zentrifugieren
- unter vorsichtigem Aufschütteln Agglutination prüfen

4.4.6 Amelogenin-Typisierung

Das Amelogenin-Gen enthält unterschiedliche Intronsequenzen (s. Anhang 11.3.6) auf dem X und Y- Chromosom. Referenz-Sequenzen waren für AMGX (M55418) und für AMGY (M55419). Bei der PCR-Typisierung wird nur ein Primerpaar (s. Anhang 11.1.3) eingesetzt, wobei zwei mögliche Produkte entstehen können: X = 555 bp oder Y = 371 bp. Eine zusätzliche interne Positivkontrolle wird nicht benötigt, da zumindest ein X-Chromosom bei jedem Menschen vorhanden ist und damit als Positiv-Kontrolle dienen kann.

Reagenzien:

Reagenz	Zusammensetzung	Menge	Ausgangskonzentration	
Mastermix für	Taq-Puffer	2,00 µl		10x
1 Ansatz	dNTP-mix	0,40 µl		10 mM
	Primer I: AMG-3b	2,00 µl	10 pmol/µl	
	Primer II: AMG-4b	2,00 µl	10 pmol/µl	
	Aqua dest.	8,44 µl		
	Taq-Polymerase	0,16 µl		
PCR-Ansatz	PCR Vormischung	15,00 µl		
	DNA-Probe	5,00 µl	33 ng/ µl	

Protokoll: siehe 4.4.1

Temperaturprotokoll: siehe 11.2.2

4.5 Gelelektrophoretischer Nachweis amplifizierter DNA

Die PCR-Produkte werden mit Hilfe der Argarose-Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Zur „Färbung“ der PCR-Produkte wird Ethidiumbromid verwendet, das sich in DNA-Doppelstränge einlagert. So können die Banden unter UV-Licht (λ = 254 nm) sichtbar gemacht und mit einem Molekulargewichtsstandard die Größe der PCR-Produkte abgeschätzt werden.

Reagenzien:

Reagenz	Zusammensetzung	Menge
50x TAE-Puffer (Stock)	Tris-Puffer	242 g
	Eisessig 99,5%	57,1 ml
	EDTA 0,5 M	100 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml
1x TAE-Puffer	50X TAE-Puffer Stock	20 ml
	Aqua dest.	980 ml
Gel-Ladepuffer 10x	Saccharose (40 %)	4 g
	Bromphenolblau (0,25 %)	25 mg
	EDTA 0,5 M	900 µl
	Aqua dest.	9 ml

Vorgehen:

- Zur Erstellung eines 1,5%igen Argarosegels: 50 ml 1x-TAE Puffer mit 0,75 mg Agarose in einem Mikrowellenherd oder Kochplatte kochen
- nach kurzem Abkühlen 5,0 µl Ethidiumbromid-Lösung zugeben und Lösung vorsichtig schwenken
- Gel in einen vorbereiteten Gelkammer-Einsatz mit integriertem Kamm gießen und bei RT für mindestens 20 min erstarren lassen
- Gelkamm entfernen und Gelkammer-Einsatz in eine Elektrophoresekammer setzen
- Elektrophorese-Kammer mit TAE-Puffer befüllen, bis das Gel vollständig bedeckt ist
- 3,0 µl Gel-Lade-Puffer mit 20,0 µl Amplifikat mischen und 20,0 µl davon in Gel-Taschen pipettieren
- elektrisches Feld anlegen und ungefähr 10-20 Minuten bei 120 Volt auftrennen.
- Gel unter UV-Licht (λ = 254 nm) betrachten und fotografieren

4.6 Quantitative PCR mit dem LightCycler™

Bei der quantitativen PCR mit dem LightCycler® unter Verwendung von SYBR® Green als Farbstoff werden wie bei der klassischen PCR die amplifizierten DNA-Doppelstränge eingefärbt, jedoch kann hier die emittierte Fluoreszenz nach jedem Zyklus (Verdopplung der Menge an doppelsträngiger DNA) gemessen werden. Dabei interkaliert das SYBR® Green in die Doppelstrang-DNA und sorgt so für eine extreme Verstärkung der Eigen-Fluoreszenz. Nach einer bestimmten Zyklus-Zahl (abhängig von Zahl der Ausgangskopien) wird die Fluoreszenz schließlich messbar. Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge an Doppelstrang-DNA und steigt wie auch die Menge an DNA fast exponentiell mit der Zyklusanzahl bis zum Erreichen des Maximums an. Es findet hier eine Quantifizierung über die Fluoreszenzintensität statt im Vergleich zu Standards bekannter Ausgangskonzentrationen.

4.7 Der LightCycler™ Roche

Das LightCycler-Gerät benutzt zum Heizen und Kühlen Luft. Im Deckel des Gerätes findet sich ein Thermoelement, wodurch die eingesogene Umgebungsluft geheizt beziehungsweise gekühlt wird. Durch die sehr geringe Wärmekapazität der Luft und durch die in kleinen, dünnwandigen Glaskapillaren plazierten Proben mit sehr günstigem Verhältnis zwischen

Oberfläche und Volumen können Temperaturänderungen von 20 K pro Sekunde erreicht werden.

Im Vergleich zu einem normalen Thermocycler kann der LightCycler etwa zehnmal so schnell Heizen und Kühlen. Ein typischer LightCycler-Lauf mit 30 Zyklen dauert so nur etwa 30 bis 40 Minuten. Die in den Glaskapillaren enthaltenen Proben werden mit einem Karussell über ein Fluorimeter zur Messung rotiert. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt durch eine LED (*light emitting diode*) über die Spitze der Kapillare, welche als optische Einheit wirkt und anschließend die emittierte Fluoreszenz gebündelt in Richtung LED wieder abgibt. Ein Zusammenwirken von Teilerspiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern leitet die emittierte Strahlung zu drei Photosensoren (Empfindlichkeitsmaxima für 530 nm, 640 nm und 710 nm) weiter. Diese wandeln das optische Signal in ein elektrisches Signal um, welches digitalisiert und dem PC zur Weiterverarbeitung übermittelt wird. Man kann so den Verlauf der PCR ohne Zeitverzögerung am Computer verfolgen und bereits während des PCR-Laufs Aussagen über den Erfolg der Amplifikation machen.

Das *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit Roche* ist ein gebrauchsfertiges Reaktionsgemisch für Hot-Start-PCRs am LightCycler. Es enthält Magnesiumchlorid, steriles Wasser, FastStart Taq-DNA-Polymerase und SYBR Green I. Die FastStart Taq-DNA-Polymerase ist eine abgewandelte Form der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase, die ebenso erst durch 10-minütiges Vorheizen bei 95°C aktiviert wird, da hitzelabile Gruppen einige Aminosäuren des Enzyms blockieren und erst durch Hitze gelöst werden. Dadurch wird ein vorzeitiges Starten der Reaktion während des Ansetzens verhindert.

Am Ende jedes PCR-Laufes wird eine Schmelzkurve erstellt. Dazu findet eine kontinuierliche Fluoreszenz-Messung während einer schnellen Erwärmung der amplifizierten Proben von 70°C auf etwa 95°C statt, wobei ein 5-sekündiges Halten der optimalen Annealing-Temperatur zwischengeschaltet wird. Alle Amplifikate werden im Laufe der Erwärmung denaturiert, wobei das vorher in die neusynthetisierten DNA-Stränge eingebaute SYBRGreen freigesetzt wird; hierbei nimmt die Fluoreszenzintensität ab. Primer haben, da wesentlich kürzer, einen niedrigeren Schmelzpunkt als das Amplifikat. Um zwischen dem Amplifikat und Verunreinigungen unterscheiden zu können, muss zum einen bei Etablierung der PCR anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt werden, um zu zeigen, dass das Produkt die erwartete Länge besitzt und zur Schmelzkurve passt. Zum anderen müssen folgende Kontrollen immer mitgeführt werden: Positiv- und Negativkontrolle und eine Kontaminations-Kontrolle, in der statt DNA nur steriles Wassser zugegeben wird.

Zur Analyse der Amplifikate werden die Schmelzkurven benutzt, welche eine Unterscheidung zwischen Primer-Dimeren und spezifischen Produkten erlauben. Primer-Dimere bestehen aus zwei Primern, die sich wegen partieller Komplementarität zusammengelagert haben. Nach jeder Denaturierung sind sie jedoch wieder „frei".

Zur Erstellung der Schmelzkurven wird die Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen. Am unterschiedlichen Verlauf der Kurven und durch Vergleich mit den definierten Positiv- und Negativ-Kontrollen kann auf unterschiedliche Eigenschaften der amplifizierten Produkte geschlossen werden. Die erste negative Ableitung über die Zeit (-dF/dT) dieser Kurve zeigt die Unterschiede zwischen den Proben noch deutlicher. Die entstehenden Peaks zeigen bei niedrigen Temperaturen Primer-Dimere und kürzere Produkte an. Bei höheren Schmelztemperaturen finden sich meist viel höhere und schmalere Anstiege, welche die spezifischen Amplifikations-Produkte darstellen. Diese Anstiege werden geringer, je niedriger die Kopienanzahl der Matrizen-DNA ist. Proben ohne Amplifikate zeigen keinen Anstieg (s. Abb. 4.6).

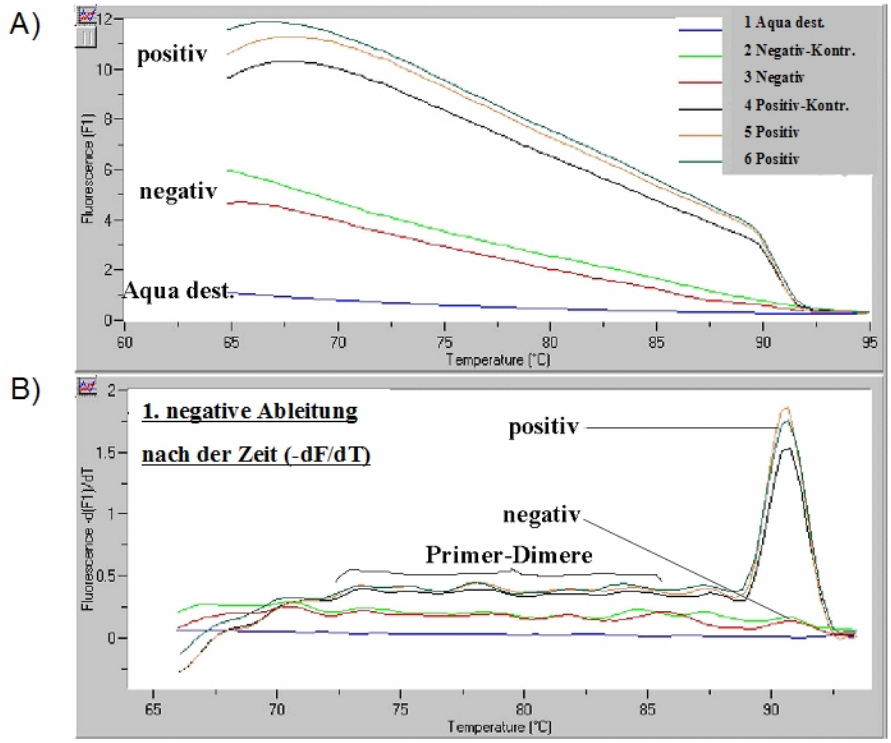

***Abb. 4.6: Schmelzkurven einer LightCycler-PCR mit drei Kontrollproben**, Negativ-, Positiv- und Aqua dest.-Kontrolle. Die „kleinen" Peaks auf der unteren Kurve (B) entsprechen Primer-Dimeren, unspezifischen Produkten oder Verunreinigungen, die kurz sind und daher eine niedrige Schmelztemperatur besitzen. Die schmalen und sehr steilen Kurvenanstiege stellen die spezifischen Amplifikations-Produkte bei einer höheren Schmelztemperatur (92°C) dar (mit „positiv" gekennzeichnet). Proben ohne spezifische Amplifikate zeigen an der zu erwartenden Stelle keinen Kurvenanstieg in der Schmelzkurve (mit „negativ" bezeichnet).*

Anforderungen an das Primer-Design

Grundsätzlich gelten hier die gleichen Regeln wie für das Primer-Design bei den klassischen PCR-Methoden (s. Kap. 4.3). Es ergeben sich jedoch einige Abweichungen:
Die letzten 5 Basen am 3'Ende sollten nicht mehr als 2 G's oder C's enthalten, da die Real-time PCR auf die schon genannte „Klebrigkeit", die durch den GC-Gehalt bestimmt wird, mit Verlust von Spezifität noch sensibler als die klassische PCR reagiert, verursacht durch die kürzeren Anpassungszeiten bei den unterschiedlichen Zykluszahlen. Die Schmelz-Temperaturen beider Primer sollten so nah wie möglich beieinander liegen. Vor Einsatz der Primer in die Real-time PCR sollten die Primer in einer klassischen PCR-Reaktion eingesetzt und getestet werden, um eine korrekte Amplifikation sicherzustellen.

4.8 Real-time PCR mittels LightCycler™

Reagenzien:

Reagenz	Zusammensetzung	Menge	Ausgangs-Konzentration	
Mastermix für 1 Ansatz	H_2O	12,0 µl		25mM
	$MgCl_2$	2,4 µl		32x
	LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	2,0 µl		
	Primer I (*sense)*	1,0 µl	10 pmol/µl	
	Primer II *(antisense)*	1,0 µl	10 pmol/µl	
PCR-Ansatz	Mastermix	18,0 µl		
	DNA-Proben	je 2,0 µl	33 ng/µl	
	Negativ-Kontrolle	2,0 µl	33 ng/µl	
	Positiv-Kontrolle	2,0 µl	33 ng/µl	
	Kontaminations-Kontrolle	2,0 µl	0 ng/µl	

Protokoll:

- Herstellen des *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I*: *LightCycler-FastStart Enzym* und *LightCycler-FastStart Reaction Mix SYBR Green I* zentrifugieren, *LightCycler-FastStart Reaction Mix SYBR Green I* in das *LightCycler-FastStart Enzym*-Röhrchen überführen und vorsichtig mischen; neues Gemisch lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahren und innerhalb einer Woche verbrauchen

- Mastermix in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis ansetzen und oben aufgeführte Reagenzien beifügen
- Vorsichtig schütteln und je 18,0 µl PCR-Vormischung in vorgekühlte LightCycler Kapillaren pipettieren, Zufügen von 2,0 µl DNA-Proben mit entsprechenden Kontrollen
- Jede Kapillare mit Deckel verschließen, in Adapter stellen und in Mikrozentrifuge bei 3000 Upm für 1 Minute zentrifugieren
- Kapillaren in Karussell des LightCycler Gerätes plazieren
- Die PCR starten und Ergebnisse auswerten

Die verwendeten PCR-Protokolle mit den verschiedenen Primern sind im Anhang 11.2.3 aufgeführt.

4.9 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die DNA-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der genauen Reihenfolge der Nukleotide in einem DNA-Abschnitt. Diese Feinanalyse der Genstruktur dient in erster Linie zur Aufklärung unbekannter Sequenzen, zum Aufspüren von Mutationen, jedoch auch zur Validierung einer neu etablierten PCR, d.h. um nachzuweisen, dass der gewünschte Sequenzabschnitt amplifiziert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sequenzierung angewandt, um neu etablierte PCRs für beispielsweise die HVR1-Polymorphismen zu validieren. Die hier eingesetzte Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977) beruht auf der Kettenabbruch-Methode.

Im Folgenden wird der Ablauf einer Sequenzierung kurz umrissen: Zuerst wird durch eine PCR mit generischen Primern eine möglichst hohe Kopienzahl des zu sequenzierenden DNA-abschnitts hergestellt. Die Amplifikate werden ggf. mittels Gelelektrophorese (nötig bei Entstehen mehrerer Produkte) aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Aufreinigung, d.h. die Amplifikate werden von überschüssigen Primern, dNTPs und Proteinen (Enzyme) mit speziellen Gel-Extraktion-Kits getrennt. Das aufgereinigte Produkt wird nun in eine Einzelstrang- bzw. asymmetrischen PCR mit entweder einem Vorwärts- oder einem Rückwärtsprimer eingesetzt. Es werden dem Reaktionsansatz alle zur DNA-Neusynthese benötigten Reagenzien zugefügt. Durch Zufügen der fluoreszenzmarkierten ddNTPs *ABI PRISM Big Dye ™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* entstehen viele Einzelstrang-Kopien gleicher 5'-Sequenz, jedoch mit unterschiedlicher Länge. 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTP) sind fluoreszenzmarkierte Nukleotide, die von der DNA-Polymerase in der üblichen Weise eingebaut werden können, danach jedoch keinen weiteren

Einbau an Nukleotiden zulassen, weil ihnen die 3´-OH Gruppe fehlt. Dies führt demnach zu einem Kettenabbruch. Es entstehen DNA-Stränge unterschiedlicher Länge, die am Ende fluoreszenz-markierte Nukleotide besitzen, die - je nach Base - unterschiedliche Farbstoffe aufweisen. Nach dieser Einzelstrang-PCR werden die entstandenen PCR-Produkte durch eine Ethanolfällung aufgereinigt. Erst dann sind die DNA-Fragmente versetzt mit Template Suppression Reagenz bereit für eine im Sequenziergerät stattfindenden Elektrophorese. Dabei werden die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt, wobei gleichzeitig ein Laser die verschiedenen Farbstoffe anregt und die Fluoreszenz-Emission gemessen wird. Der automatischen Analyse mittels ABI Prism 310 Sequencer folgt eine genauere Analyse mit Hilfe der Computerprogramme „Chromas“ und „Genedoc“. Mit letzterem können die analysierten Sequenzen untereinander und mit einer Konsensussequenz verglichen werden.
Die asymmetrische PCR ermöglicht einerseits eine Kontrolle, da die Sequenzen „*aufwärts“* und „*abwärts“* komplementär zueinander sein müssen, andererseits wird die Auswertung der Sequenzierung erleichtert, da sich beide Ergebnisse ergänzen, denn die Sequenzen in unmittelbarer Nähe der Primer sind im allgemeinen schwer zu interpretieren.

4.9.1 Amplifikation des gewünschten Genabschnitts:

Reagenzien:

Reagenz	Zusammensetzung	Menge	Ausgangs-konzentration	
M*astermix* für	Taq-Puffer	2,0 µl		10 x
1 Ansatz	dNTP-mix	0,4 µl		10 mM
	Primer 1	2,0 µl	10 pmol/µl	
	Primer 2	2,0 µl	10 pmol/µl	
	Aqua dest.	10,4 µl		
	Taq-Gold-Polymerase	0,16 µl		
PCR-Ansatz	*Mastermix*	17,0 µl		
	DNA	3,0 µl	(33 ng/µl)	

Protokoll: s. Kap. 4.4.1

Temperaturprotokoll:

- 95°C, 10 Minuten
- 95 °C, 30 Sekunden
  65 °C, 1 Minuten
  } 10 Zyklen

- 95 °C, 30 Sekunden
  61 °C, 30 Sekunden
  72 °C, 40 Sekunden
  } 22 Zyklen
- Abkühlen bei 20 °C

4.9.2 Aufreinigung der PCR- Produkte:

Die Aufreinigung wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt:

Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem *QIAquick Gel-extraction Kit*

Nach der PCR werden die Produkte mittels Gelelektrophorese (s. Kap. 4.5) aufgetrennt. Für die Aufreinigung werden niedrigprozentige Agarosegele (1%) verwendet, da sich die Agarose so leichter entfernen läßt. Bei der Arbeit unter UV-Licht muss zügig gearbeitet werden, da zu langes Einwirken von UV-Licht die DNA zu stark schädigt.

Reagenzien:

Buffer QG	Lösungspuffer
Isopropanol 100%	Wasch-Lösung
Buffer PE	Waschpuffer
Buffer EB oder Aqua dest.	Lösungspuffer: 10mM Tris-Cl, pH 8,5

- Ausschneiden der spezifischen Banden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht
- ausgeschnittene Gelstücke in vorbereitete und gewogene Eppendorfgefäße geben und nach erneutem Wiegen 3-faches Gelvolumen an Lösungspuffer zufügen
- bei 50 °C für 10 Minuten in Wasserbad inkubieren, evtl. 2-bis 3-mal kräftig mischen
- nach kompletter Gel-Auflösung sollte das Gemisch gelb sein
- 1-faches Gelvolumen an Isopropanol zugeben und mischen, anschließend Probe auf eine in der Vakuumpumpe plazierte *QIAQuick* Säule pipettieren, Vakuum anlegen und nach Säulenpassage der Lösung die Vakuumpumpe ausschalten.
- 0,75 ml *Buffer PE* in *QIAquick* Säule geben, 2-3 Minuten stehen lassen, anschließend Vakuum anlegen
- *QIAquick* Säule in ein 1,5 ml-Aufbewahrungs-Gefäß stellen und 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugieren, um Ethanolrückstände zu entfernen

- *QIAquick* Säule in ein sauberes 1,5 ml Aufbewahrungsröhrchen plazieren
- Zum Lösen der DNA-Fragmente 50 µl Aqua dest. zufügen, 5 Minuten stehen lassen und 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugieren
- Erneut 50 µl Aqua dest. in die Säule geben, 5 Minuten stehen lassen und 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugieren
- Das aufgereinigte PCR-Produkt befindet sich jetzt in dem Aufbewahrungsröhrchen

Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem *Ultra PCR Clean-Up Kit*

Die Methode basiert auf Spezialfiltern aus Silica, die unerwünschte Enzyme, Primer, dNTPs und Puffer herausfiltern. Das aufgereinigte Produkt wird anschließend in 50 µl Tris-Puffer oder Aqua dest. gelöst.

Reagenzien:

Binding Solution (SB)	GuanidinHCL/ Isopropanol Gemisch
Wash Solution (SW)	Ethanol Lösung
Elution buffer (SE)	10mM Tris pH 8.0 (DNAse frei)

Protokoll:

- 5-fache Menge *Binding Solution* zum PCR-Produkt zugeben (Bsp. 50 µl PCR-Reaktion + 250 µl *Binding Solution*) und gut mischen
- Gemisch auf Filter geben und 10-30 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugieren
- Flüssigkeit aus dem Sammelgefäß unerhalb des Filters abgießen, verwerfen und Filter wieder auf dasselbe Sammelgefäß stecken
- 300 µl *Wash Solution* auf Filter geben und 2 Minuten bei 13000 Upm zentrifugieren
- Flüssigkeit aus Sammelgefäß abgießen und Filter wieder auf dasselbe Sammelgefäß stecken
- 30-60 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugieren und Filter auf sauberes Sammelgefäß stecken
- 50 µl *Elution buffer* oder Aqua dest. auf Filter geben und 30-60 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugieren
- Filter wegwerfen, im Sammelgefäß befindet sich das aufgereinigte PCR-Produkt

4.9.3 Einzelstrang-PCR:

Reagenzien:

Reagenz	Zusammensetzung	Menge
DNA Sequencing Kit	A-Dye Terminator C-Dye Terminator G-Dye Terminator T-Dye Terminator dNTPs AmpliTaq DNA Polymerase $MgCl_2$ Tris-HCl-Puffer (pH 9)	Keine Angaben der Firma erhältlich
PCR-Ansatz (2 Ansätze pro DNA-Probe)	PCR-Vormischung aufgereinigtes PCR-Produkt Primer 1 oder 2 Aqua dest.	4,0 µl 3,0 µl 1,0 µl 12,0 µl

Protokoll : s. Kap. 4.4.1

Temperatur-Protokoll:

- 96°C, 10 Minuten
- 50°C, 5 Sekunden
- 60°C, 4 Minuten

} 25 Zyklen

- Bei 20°C abkühlen lassen

4.9.4 Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels Ethanolfällung:

- PCR-Produkte in Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml überführen
- 80,0 µl Aqua dest., 10,0 µl 3M Natriumacetat pH 4,6 und 250,0 µl 100 % Ethanol (-20 °C) zu PCR-Reaktion hinzufügen
- 15 Minuten bei 13000 Upm zentrifugieren, dann Ethanol mit Wasserstrahlpumpe entfernen
- mit 250 µl 70 % Ethanol waschen und 5 Minuten bei 15 000 Upm zentrifugieren
- Ethanol entfernen und Pellet 5 Minuten in Vakuumzentrifuge trocknen
- Pellet in 25,0 µl *Template Suppression Reagent* (TSR) aufnehmen und 10 Minuten lichtgeschützt inkubieren

- Lösung in Sequenzierungs-Gefäße überführen
- 2 Minuten bei 90°C denaturieren, dann bis zur Sequenzierung auf Eis lagern

4.10 Short Tandem Repeats-PCR

In der STR (Short Tandem Repeats)-Analyse werden mittels PowerPlex®16 16 STR-Loci untersucht. Das System amplifiziert die Loci Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 sowie Amelogenin. Dabei werden alle 16 STR-Loci einer DNA-Probe gleichzeitig einer PCR unterzogen und mit verschiedenen farblichen Markern gekennzeichnet. Hierfür werden Fluorescein (FL), Carboxy-tetramethylrhodamin (TMR) und 6-carboxy-4´,5´-dichloro-2´,7´-dimethoxy-fluorescein (JOE) eingesetzt. Nach der PCR werden die Proben mit deionisiertem Formamid und einem internen Längenstandard (vierter Marker) versehen und in einem Sequenziergerät (ABI Prism 310 Sequencer) analysiert. Der interne Längenstandard (ILS600) enthält 22 unterschiedlich lange DNA Fragmente zwischen 60 und 600 bp. Jedes Fragment ist mit dem Farbstoff Carboxy-X-rhodamin markiert und muss in jeder DNA-Probe enthalten sein, um so eine vergleichbare Analyse der STR-Loci zu gewährleisten. Neben einer Positiv-Kontrolle, in der bekannte STR-Loci enthalten sind, wird auch immer eine Negativ-Kontrolle ohne DNA (zwecks Kontaminations-Kontrolle) in die Analyse eingebracht.

4.10.1 DNA-Amplifikation und weitere STR-Analyse mit dem PowerPlex®16 System

Es werden 0,5-1,0 ng/µl der Ziel-DNA in ein 25,0 µl Reaktionsvolumen in den GeneAmpPCRSystem 9600 Thermocycler eingesetzt.

Reagenzien:

Reagenz	Zusammensetzung	Menge
Mastermix	Nuclease-freies Wasser	16,7 µl
für 1 Ansatz	Taq-Puffer	2,5 µl
	PowerPlex 16	
	10x Primer Paar Mix	2,5 µl
	AmpliTaq Gold DNA Polymerase	0,8 µl
PCR-Ansatz	PCR-Vormischung	22,5 µl
	Matrizen-DNA	2,5 µl
1 Positivkontrolle	9947A DNA-Probe	
(im Kit mitgeliefert)	zu 1,0 ng/µl verdünnen	2,5 µl
1 Negativkontrolle	Nucleasefreies Wasser anstatt von	
	DNA-Proben verwenden	2,5 µl

Protokoll: s. Standard-Protokoll Kap. 4.4.1

Temperatur-Protokoll:

- 95 °C, 11 Minuten
- 96°C, 1 Minute
- 94°C, 30 Sekunden
- in 68 Sekunden auf 60°C heizen und 30 Sekunden Temperatur halten
  in 50 Sekunden auf 70°C heizen und 45 Sekunden Temperatur halten } 10 Zyklen
- 90°C für 30 Sekunden
  in 60 Sekunden auf 60°C heizen und 30 Sekunden Temperatur halten
  in 50 Sekunden auf 70°C heizen und 45 Sekunden Temperatur halten } 18-22 Zyklen
- 60°C, 30 Minuten
- bei 4°C kühlen

Das Sequenziergerät und die Proben werden gemäß der Gebrauchsanweisung vorbereitet und untersucht. Anschließend erfolgt die Analyse der Ergebnisse.

4.11 Schaffung chimärer Verhältnisse

Durch Kombination von jeweils zwei DNA-Proben wurden künstliche „Chimären“ mit bekannten Konzentrations-Anteilen hergestellt, um den nach allogener Stammzelltransplantation enstehenden Mikrochimärismus nachzuahmen. Die Spender-Proben wurden für die Merkmale des HLA-DRB1-Systems typisiert und die HVR1-Region des mitochondrialen Genoms sequenziert. Nachdem die Merkmale der Proben bekannt waren, wurde die DNA-Lösung des Spenders „A“ in derjenigen DNA des Spenders „B“ gemischt

und gleichzeitig verdünnt, wobei die Paare so angeordnet wurden, dass sie unterschiedliche Merkmale im HLA-DRB1-System und in der HVR1-Region aufwiesen, man sie also an beiden Genorten unterscheiden konnte. Die Verdünnungs-Reihen wurden nach folgendem Schema erstellt:

DNA von Spender „A“ mit einer Konzentration von 33 ng/µl wurde mit einer DNA-Lösung des Spenders „B“, die als „Hintergrund-DNA“ diente, verdünnt. Die Konzentration der „Hintergrund-DNA“ betrug ein Zehntel der Konzentration der zu verdünnenden DNA. Es wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt, beginnend mit „A/B“= 1:1, „A/B“ 1:10, „A/B“ 1:100, A/B 1:1.000 weiter fortlaufend bis „A/B” 1: 10^7 (siehe Tab. 4.1).

Nr.	Verdünnung	Proben-name	Verdünnungs-Verhältnis	Verdünnung	DNA-Menge Für A	Zelläqui-valente
1	1 ml A + 9 ml B	A1	1:2	50% A	33 ng	4000
2	1 ml A1 + 9 ml B	A2	1:10	10% A	3,3 ng	400
3	1 ml A2 + 9 ml B	A3	1:100	1% A	330 pg	40
4	1 ml A3 + 9 ml B	A4	1: 10^3	0,1% A	33 pg	4
5	1 ml A4 + 9 ml B	A5	1: 10^4	0,1‰ A	3,3 pg	0,4
6	1 ml A5 + 9 ml B	A6	1: 10^5	0,01‰ A	0,33 pg	0,04
7	1 ml A6 + 9 ml B	A7	1: 10^6	0,001‰ A	0,033 pg	0,004
8	1 ml A7 + 9 ml B	A8	1: 10^7	0,0001‰ A	0,0033 pg	0,0004

Tab. 4.1:rechnerische Darstellung des Verdünnungs-Schema unter Angabe der Anzahläquivalente.

Die DNA-Lösungen mit jeweils 3,3 ng/µl von Spender „A“ und „B“ wurden jeweils als Positiv- und Negativ-Kontrollen eingesetzt. Die Analyse dieser Verdünnungsreihen erfolgte mit PCR-SSP (s. Kap. 4.4.1 u. 2) und der LightCycler-PCR. Die Angabe der Zelläquivalente kommt folgendermaßen zustande: Ein diploides Genom wiegt 7,5 pg. Bei einer DNA-Menge von 33 pg sind demnach 4 Zelläquivalente enthalten. Rein rechnerisch ergibt sich daraus die Angabe der Zelläquivalente in der letzten Spalte von Tab. 4.1 bezogen auf das HLA-DRB1-Allel.

5 Ergebnisse

Zunächst werden die Ergebnisse des Vergleichs zwischen dem Nachweis nukleärer und mitochondrialer DNA mittels PCR-SSP und LightCycler-PCR dargestellt. Anschließend folgen Auswertungen an realen Spender- und Empfängerpaaren hinsichtlich der Eignung verschiedener polymorpher Genorte für die Mikrochimärismusdiagnostik.

5.1 Vergleich zwischen dem Nachweis nukleärer und mitochondrialer DNA mit PCR-SSP

Mitochondriale DNA zeichnet sich durch hochvariable Regionen aus (s. Kap. 1.4.2). Auf Grund dieser Tatsache erkannten Garritsen et al. (1997), dass ein Nachweis von mt-DNA im Bereich der Transfusionsmedizin sinnvoll zur Unterscheidung zwischen Spender und Empfänger eingesetzt werden kann. Basierend auf diesen Studien wurde eine vergleichende Untersuchung mit nukleären und mitochondrialen Genorten durchgeführt.
Um chimäre Bedingungen nachzuahmen, wurden DNA-Gemische 5 verschiedener Paare, die hinsichtlich HLA-DRB1 und HVR1 different waren, hergestellt. Gleichzeitig wurden dabei, um Aussagen über die Sensitivität treffen zu können, standardisierte Verdünnungsreihen (s. Kap. 4.11) erstellt. Um nukleäre DNA nachzuweisen, wurden polymorphe Merkmale des HLA-DRB1- Genlocus genutzt; für den Nachweis mitochondrialer DNA wurde, basierend auf den Versuchen von Garritsen et al. (1997, 2001), die HV1-Region, eingesetzt (s. Kap 4.4.1 und 4.4.2). Die Versuche wurden zunächst mit der PCR-SSP, dann mit der LightCycler-PCR durchgeführt.

Praktischer Vergleich

Die folgende Abbildung 5.1 zeigt repräsentativ die Ergebnisse der PCR-SSP. Im oberen Teil (A) ist der gelelektrophoretische Nachweis nukleärer und im unteren Teil (B) der Nachweis mitochondrialer Merkmale dargestellt.

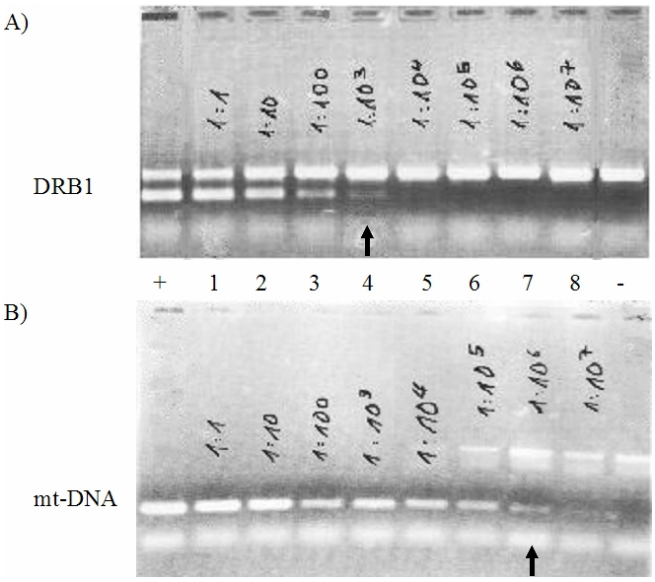

Abb. 5.1: gelelektrophoretischer Nachweis nukleärer und mt-DNA mittels PCR-SSP

Abb. A zeigt eine Verdünnungsreihe mit dem Nachweis von HLA-DRB1, Abb. B den Nachweis von HVR1. Die spezifischen Produkte sind bei DRB1 358bp und bei HVR1 149bp lang. Für beide Versuchsreihen wurde dieselbe Verdünnungsreihe verwendet. Beschriftung (s. Kapitel 4.11, Tab.4.1): + = Positivkontrolle (nur A, 3,3 ng/µl), 1 = A/B = 1:1, 2 = A/B 1:10, 3 = A/B 1:100, 4 = A/B 1:10^3, fortlaufende Verdünnung bis 8 = A/B 1: 10^7, - = Negativkontrolle (nur B, 3,3 ng/µl). Die jeweils obere Bande stellt die Kontrollbande (detaillierte Beschreibung s. Kap. 4.3.1) dar; die jeweils untere Bande ist das spezifische PCR-Produkt. Im Vergleich zur spezifischen HLA-DRB1-Bande kann die mt-DNA-Bande in einer um etwa drei Potenzen stärkeren Verdünnung nachgewiesen werden.

Die HLA-DRB1-Merkmale von Spender „A“ konnten bis zu einer Verdünnung von 1:10^3 nachgewiesen werden. Dies entsprach bei einer DNA-Menge von 33 pg etwa 4 Zelläquivalenten (detaillierte Berechnung s. Kap. 4.11). Im Gegensatz dazu wurden die mitochondrialen HVR1-Merkmale des Spenders „A“ bis zu einer Verdünnung von 1:10^6 nachgewiesen (entspricht ca. 0,004 Zelläquivalenten). Diese Steigerung der Sensitivität konnte bei allen untersuchten Paaren gefunden werden.

5.2 Nachweis nukleärer und mitochondrialer DNA mit LightCycler-PCR

Analoge Versuche (Kap. 5.1) wurden mit der LightCycler-PCR durchgeführt: Die Verdünnungsreihen wurden wie unter Kapitel 4.11 beschrieben erstellt. Im Gegensatz zur PCR-SSP wurde bei der LightCycler-PCR zur Kontaminationskontrolle jeweils ein Probenansatz mit Aqua dest. eingesetzt. Ansonsten wurden dieselben Verdünnungsreihen und Primer verwendet. Die Amplifikationsprotokolle der hier abgebildeten LightCycler-PCR Schmelzkurven sind im Anhang unter 11.2.3 aufgeführt.

5.2.1 Nachweis von HLA-DRB1

Zunächst erfolgte der Nachweis der DRB1-Allele (s. Abb. 5.2) unter Verwendung des LightCycler Fast Start Versuchsprotokolls, wie in Kapitel 4.8 beschrieben.

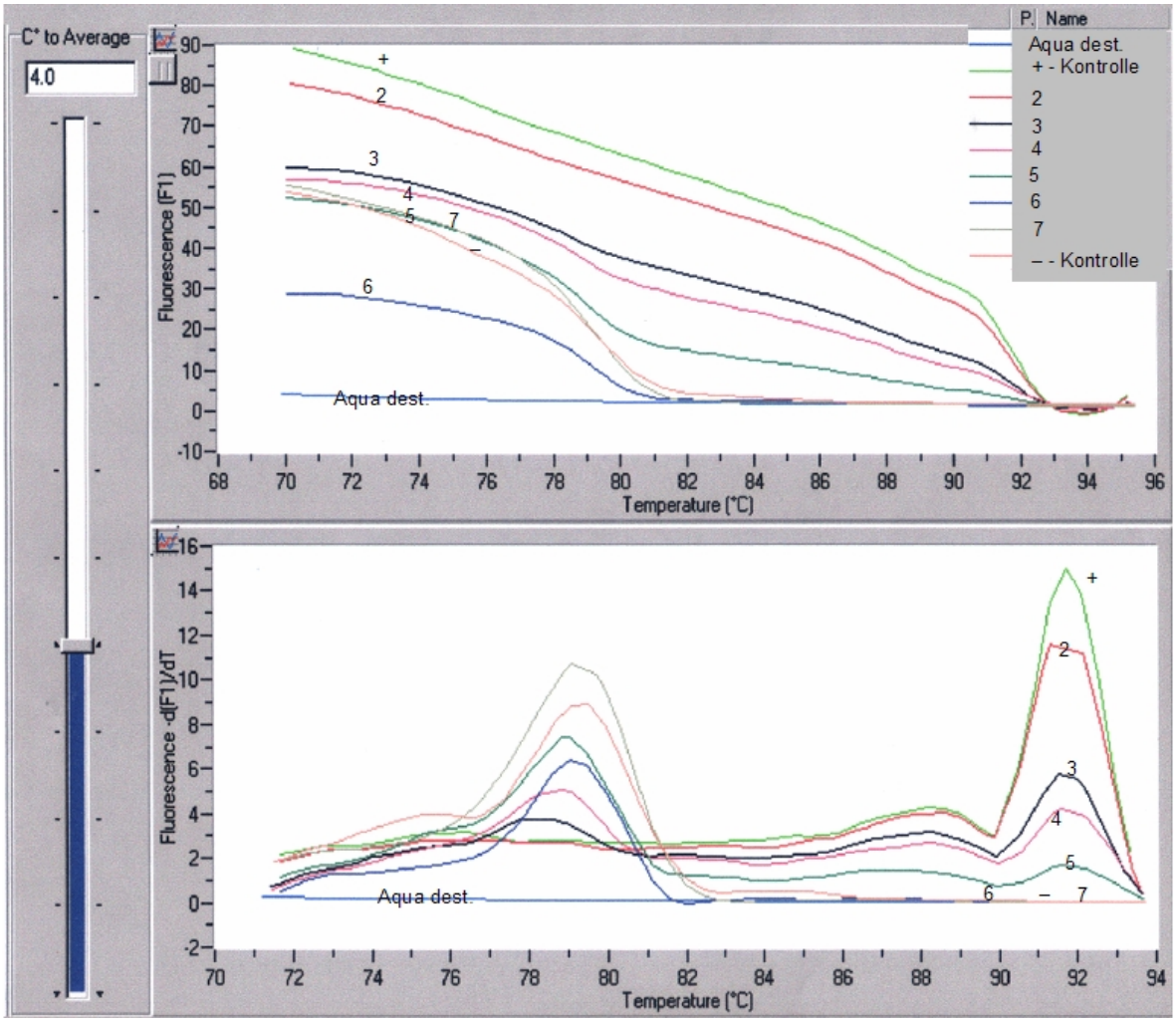

***Abb. 5.2: Schmelzkurve der LightCycler-PCR**: Amplifikation von DRB1*15 mit der oben verwendeten Verdünnungsreihe (s. Abb. 5.1). Es wurden ein sequenzspezifischer Vorwärtsprimer DRB13R und der gemeinsame Rückwärtsprimer DRB87E verwendet. Der Schmelzkurven-Peak bei 91.5°C zeigt das spezifische Produkt an. Unspezifische Amplifikationsprodukte, sog. Primer-Dimere, bei 79,0°C resultieren aus der Komplementarität der Primer. Die Proben sind folgendermaßen beschriftet: 1 = Aqua dest.-Kontrolle; + = Positivkontrolle (nur A, 3,3 ng/µl), 2 = A/B 1:10, 3 = A/B 1:100, 4 = A/B 1:10^3, fortlaufende Verdünnung im Verhältnis A zu B bis 7 = A/B 1:10^6, – = Negativkontrolle (nur B, 3,3 ng/µl).*

Um hier ein spezifisches Produkt zu erzielen, reichte hier ein DNA-Äquivalent von 1,3 Zellen aus. Dies entspricht etwa 1-2 Kopien des DRB1-Allels.

Dasselbe Experiment wurde mit zwei verschiedenen sequenzspezifischen Primern durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Sensitivität ansteigt. Es wurde ein spezifisches Produkt

bis zu einer Verdünnung von 1:10^5 gebildet. Im Gegensatz zu dem vorangegangenen Versuch wurden kaum Primer-Dimere gebildet (s. Abb. 5.3).

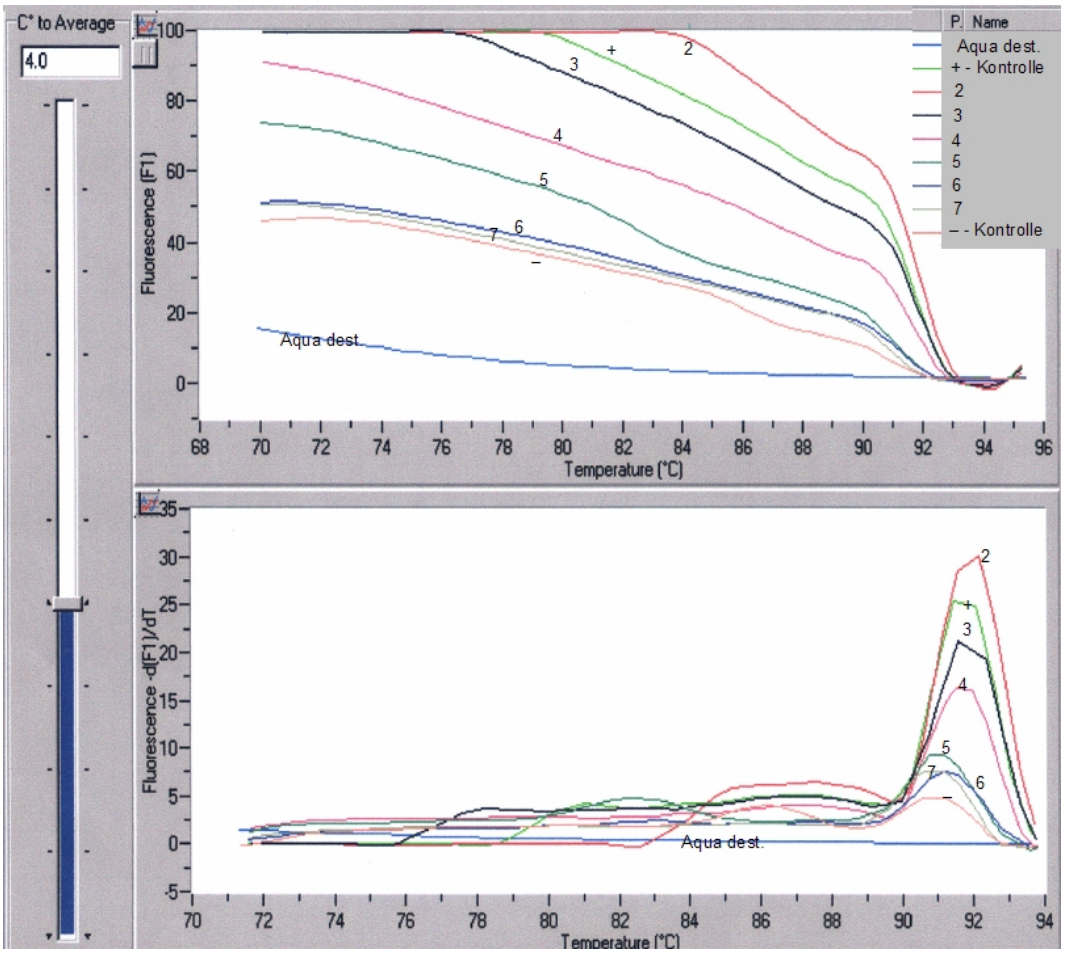

***Abb. 5.3: Schmelzkurve der LightCycler-PCR**: Amplifikation von DRB1*15 mit der oben verwendeten Verdünnungsreihe (siehe Abb. 5.1): Der Schmlezkurven-Peak bei 90,6°C zeigt das spezifische Produkt an. Es wurden zwei sequenzspezifische Primer (DRB13R und DRB71A) verwendet. Primer-Dimere sind hierbei nicht entstanden. Die Schmelzkurve 7 zeigt im Vergleich zu der in Abb.5.2 hier einen charakteristischen Peak, so dass hier ein Sensitivitätsanstieg gezeigt werden konnte. Die Proben sind folgendermaßen beschriftet: 1 = Aqua dest.-Kontrolle; + = Positivkontrolle (nur A, 3,3 ng/µl), 2 = A/B 1:10, 3 = A/B 1:100, 4 = A/B 1:10^3, fortlaufende Verdünnung im Verhältnis A zu B bis 7 = A/B 1:10^6, – = Negativkontrolle (nur B, 3,3 ng/µl).*

5.2.2 Nachweis von HVR1

Mit der PCR-SSP konnte eine Sensitivitätssteigerung um das 1000-fache bei Amplifikation mitochondrialer Sequenzen im Vergleich zum Nachweis nukleärer Polymorphismen in den vorangegangenen Abschnitten (s. Kap. 5.1) gezeigt werden. Es sollte geprüft werden, ob ein quantitativer Nachweis mitochondrialer Polymorphismen mit dem Einsatz der oben eingesetzten Verdünnungsreihe gelingt. Dazu wurden Primer unterschiedlicher Spezifität eingesetzt.

HVR1-Nachweis mit einem Consensus-Primer und einem sequenzspezifischen Primer

Es wurden zunächst ein gruppenspezifischer Vorwärtsprimer (HVR1VP1) und ein sequenzspezifischer Rückwärtsprimer (HVR1 RP4C) in die LightCycler-PCR eingesetzt. Abb. 5.4 zeigt die LightCycler-Schmelzkurve. Hier wurde ein spezifisches Produkt bei 84,0°C bis zu einer Verdünnung von $1:10^4$ gebildet. Bei der Negativkontrolle war jedoch auch eine deutliche Amplifikation (unspezifisches Produkt mit Schmelzpunkt bei 83,5°C) erkennbar.

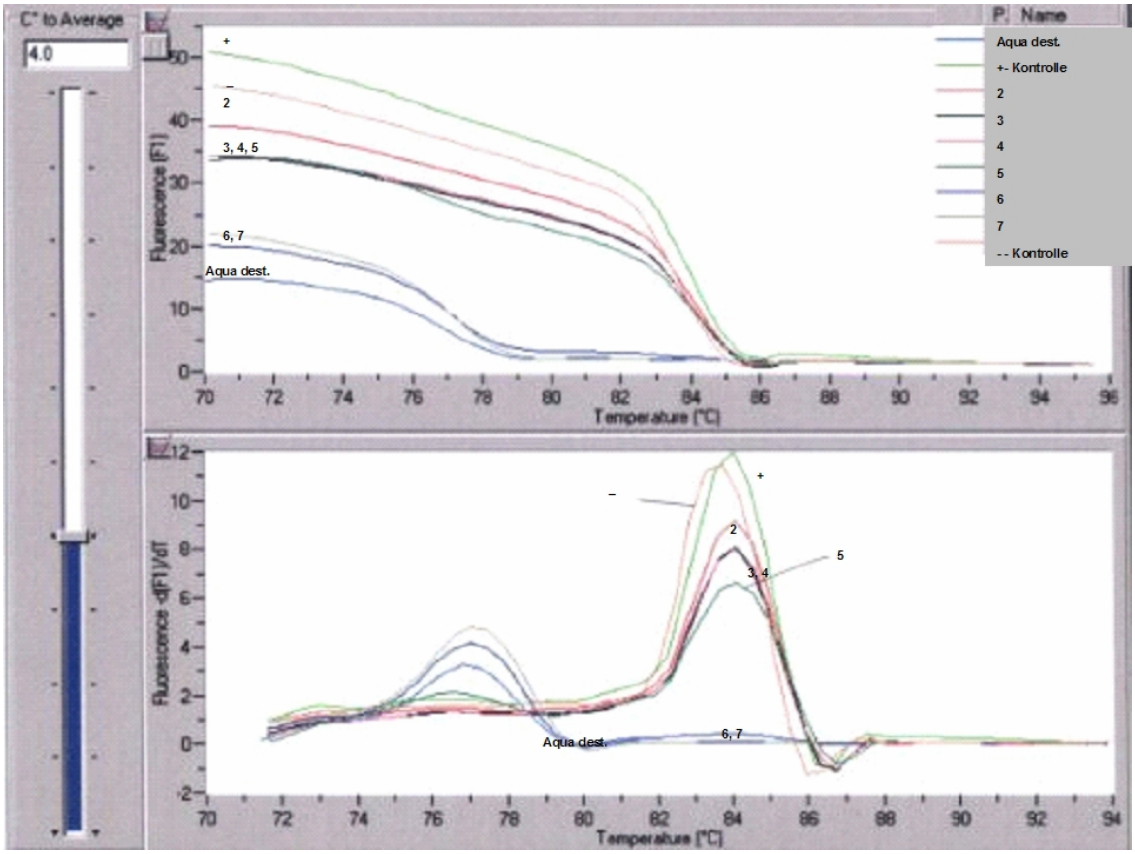

***Abb. 5.4: Schmelzkurve der LightCycler-PCR**: Amplifikition von HVR1 mit der oben verwendeten Verdünnungsreihe (s. Abb. 5.1). Es wurden ein Consensus-Primer (HVR1VP1) und ein sequenzspezifischer Rückwärtsprimer (HVRRP4C) verwendet. Bis zu einer Verdünnung von $1:10^4$ (Probe 5) kam es zur Bildung eines spezifischen Produktes bei 84,0°C. Bei stärkerer Verdünnung (Probe 6, 7) und der Kontaminationskontrolle wurde kein spezifisches Produkt mehr gebildet. Der Schmelzkurven-Peak der Negativ-Kontrolle (–) zeigte die Bildung eines Produktes bei einem niedrigeren Schmelzpunkt (83,5°C). Die Proben sind folgendermaßen beschriftet: 1 = Aqua dest.-Kontrolle; + = Positivkontrolle (nur A, 3,3 ng/µl), 2 = A/B 1:10, 3 = A/B 1:100, 4 = A/B $1:10^3$, fortlaufende Verdünnung im Verhältnis A zu B bis 7 = A/B $1:10^6$, – = Negativkontrolle (nur B, 3,3 ng/µl).*

HVR1-Nachweis mit zwei sequenzspezifischen Primern

In einem Folgeversuch wurden zwei sequenzspezifische Primer für die PCR eingesetzt. Abb. 5.5 zeigt das Ergebnis der LightCycler-PCR. Die Schmelzkurven zeigten bei 84,0°C das spezifische Proudukt an. Hier war ein Nachweis bis zu einer Verdünnung von $1:10^5$ möglich, d.h. es ist eine DNA-Menge von mindestens 0,01pg notwendig, um ein spezifisches Produkt bilden zu können. Dies entsprach einem Zelläquivalent von 0,0013 Zellen. Bei diesem Versuch trat nur eine schwache Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten auf. Auch die Negativkontrolle bildete hier - im Gegensatz zum vorangegangenen Versuch (Abb. 5.4) - kein Produkt.

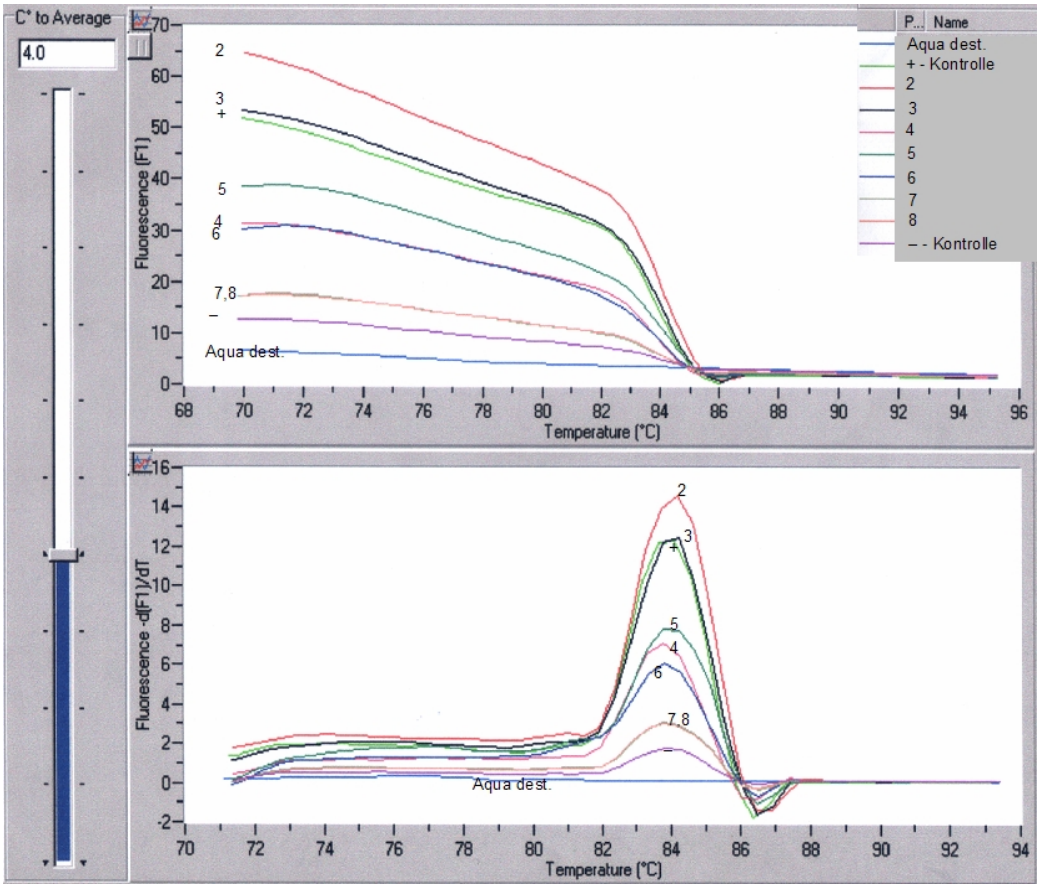

Abb. 5.5: Schmelzkurve LC-PCR: Amplifikation von HVR1*. Der Schmelzkurven-Peak bei 84,0°C zeigt das spezifische PCR-Produkt. Es wurden zwei sequenzspezifische Primer verwendet (HVR1VP4G und HVR1RP4C). Legende: 1 = Aqua dest. Kontrolle; + = Positivkontrolle (nur A, 3,3 ng/µl), 2 = A/B 1:10, 3 = A/B 1:100, 4 = A/B $1:10^3$, fortlaufende Verdünnung im Verhältnis A zu B bis 8 = A/B $1:10^7$, – = Negativkontrolle (nur B, 3,3 ng/µl).*

5.3 Mikrochimärismusstudie

Es wurden an insgesamt acht realen Spender-Empfängerpaaren die praktische Eignung bestimmter polymorpher Genorte (s. Kap. 1.4.3-1.4.6) zur Mikrochimärismusdiagnostik mit qualitativen Methoden untersucht und die Ergebnisse der routinemäßig durchgeführten STR-Diagnostik miteinbezogen. In den folgenden Abschnitten werden vier repräsentative Paare vorgestellt. Anschließend folgt eine allgemeine Darstellung der möglichen Empfänger- und Spender-Konstellationen und ihre praktische Bedeutung für die Diagnostik.

5.3.1 KMT-Chimärismusstudie: 1. Spender-Empfänger-Paar

	Tage nach KMT	**HNA-1a**	**HNA1-b**	**FYA**	**FYB**	**JKA**	**JKB**
Empfänger	*vor KMT*	**neg**	**pos**	pos	pos	pos	**pos**
Spender	*vor KMT*	**pos**	**neg**	pos	pos	pos	**neg**
Empfänger	36	**pos**	**neg**				**neg**
Empfänger	67	**pos**	**neg**				**neg**
Empfänger	75	**pos**	**neg**				**neg**
Empfänger	82	**pos**	**neg**				
Empfänger	95	**pos**	**neg**				**neg**
Empfänger	119	**pos**	**neg**				**neg**
Empfänger	123	**pos**	**neg**				
Empfänger	218	**pos**	**neg**				

Tab. 5.1: 1. Paar mit Darstellung der verschiedenen Genortkonstellationen

Das KMT-Paar wurde hinsichtlich HNA-1a, HNA-1b, FYA/B und JKA/B-Merkmale mittels der im Kap. 4.4.3-5 beschriebenen PCR-SSP Methoden typisiert. Es fanden sich für die Mikrochimärimusdiagnostik geeignete Differenzen hinsichtlich des Fcγ- Rezeptor IIIb und dem Kiddblutgruppensystem.

Der Empfänger war homozygot für HNA-1b, der Spender homozygot für HNA-1a. In den nach Transplantation untersuchten DNA-Proben des Empfängers konnte jeweils nur das HNA-1a Allel nachgewiesen werden. Der Empfänger zeigte heterozygote Merkmale für JK, der Spender war homozygot für JKA. Nach der Transplantation fehlte dem Empfänger das JKB-Merkmal.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieses Paares für den Nachweis der HNA-1a und HNA-1b-Allele dargestellt: Nach KMT wurden die DNA-Proben von Spender und Empfänger zunächst mittels PCR-SSP (s. Kap. 4.4.3 und Abb. 5.6) analysiert. Anschließend wurde eine LightCycler-PCR (s. Kap. 4.8 und Abb. 5.7) durchgeführt. Die Konzentration der DNA-Proben betrug jeweils 33 ng/µl. Nach der KMT wurden die spendertypischen Merkmale nachgewiesen.

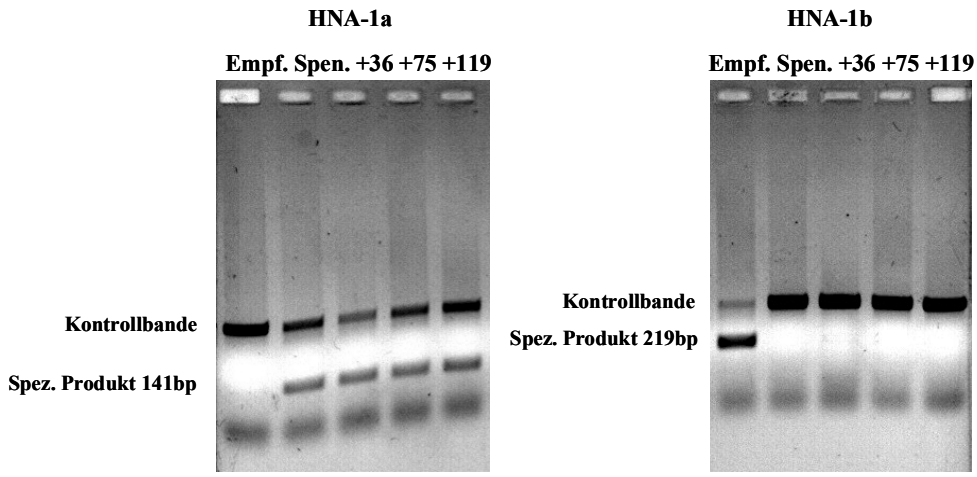

Abb. 5.6: Nachweis des HNA-1a- und HNA-1b-Allels nach KMT*: Der Empfänger ist homozygot für HNA-1b, der Spender für HNA-1a. Im linken Bild ist der HNA-1a-Allelnachweis gezeigt. Alle nachfolgenden an Tag 34, 64 und 119 nach KMT untersuchten Blutproben sind - genau wie der Spender - HNA-1a positiv. Die im rechten Bild dargestellte HNA-1b-Typisierung desselben Paares ist genau umgekehrt: Der Empfänger ist homozygot positiv, der Spender ist negativ. Alle nach KMT untersuchten Proben sind ebenfalls negativ, d.h. es wurde kein spezifisches Produkt amplifiziert. Als Kontrolle wurde wiederum das HGH-Gen verwendet (s. Kap. 4.3.1).*

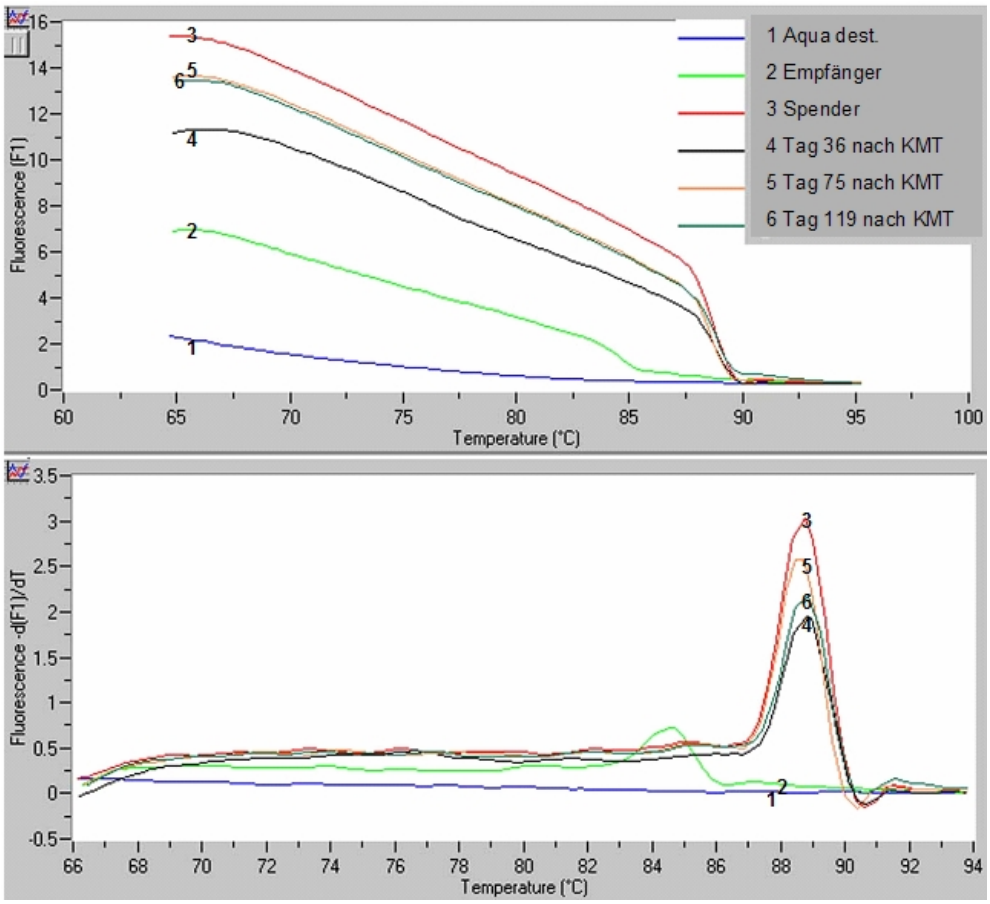

Abb. 5.7: Schmelzkurven einer LightCycler-PCR mit Nachweis von HNA-1a nach KMT*: Empfänger homozygot für HNA-1b, Spender für HNA-1a. Entscheidend sind bei der Analyse die unterschiedlichen Positionen der Peaks, die - je nach amplifiziertem Produkt - bei charakteristischen Temperaturen liegen. So zeigten sich hier beim Empfänger (HNA-1b) bei 84,5°C wahrscheinlich Primer-Dimere. Beim Spender (HNA-1a)*

zeigte sich bei etwa 88,5 °C das spezifische Produkt für HNA-1a. Alle post - KMT - Proben sind positiv für HNA-1a.

Bei diesem Transplantationspaar waren die Genorte Fcγ-Rezeptor IIIb und JK gut für die Chimärismusdiagnostik geeignet. Die Merkmale HNA-1b und JKB waren nach KMT nicht mehr nachweisbar. Eine exakte Quantifizierung zur Mikrochimärismusdiagnostik ist hier nicht erforderlich, da ein Wiederauftreten eines der verschwundenen Merkmale bereits ein Rezidiv bedeuten würde.

5.3.2 KMT-Chimärismusstudie: 2. Spender-Empfänger-Paar

	Tage nach KMT	**XY-PCR**	**HNA-1a**	**HNA1-b**	**FYA**	**FYB**	**JKA**	**JKB**
Empfänger	vor KMT	**XY**	neg	pos	**neg**	pos	**neg**	**pos**
Spender	vor KMT	**XX**	neg	pos	**pos**	pos	**pos**	**neg**
Empfänger	26	**XX**			**pos**		**pos**	**neg**
Empfänger	118 (KM)	**XX**					**pos**	**neg**
Empfänger	118						**pos**	**neg**
Empfänger	144 (KM)						**pos**	**neg**

Tab. 5.2: 2. Paar mit Darstellung der verschiedenen Genortkonstellationen

Dieses Spender-Empfängerpaar unterschied sich in drei Genorten: Amelogenin-Gen, Duffy- und Kiddblutgruppensystem.

Der Empfänger (XY) war vor der KMT homozygot für FYB und JKB. Die Spenderin (XX) war heterozygot für FYA/FYB und homozygot für JKA. Nach der KMT konnten jeweils die Spendermerkmale nachgewiesen werden. Das JKB-Merkmal verschwand, nachweisbar war hingegen JKA. Neben FYB war nach der KMT auch FYA nachweisbar. Bei dem Nachweis des Amelogenin-Gens fehlte jetzt das Y-Merkmal. Nachstehend sind beispielhaft die Ergebnisse dargestellt:

Im unten abgebildeten gelelektrophoretischen Nachweis (s. Abb. 5.8) sieht man, dass der Empfänger männlich (XY) und die Spenderin weiblich (XX) ist. In der am Tag 26 nach KMT untersuchten Blutprobe sind nur Zellen mit X-Chromosomen nachweisbar. Es ist also hier ein Chimärismus hämatopoetischer Zellen nach Transplantation erkennbar. Bei der Amelogenin-PCR werden bei männlicher DNA zwei unterschiedlich große Amplifikate mit unterschiedlichem Verhältnis zueinander gebildet: das spezifische Produkt beträgt beim X-Chromosom 544bp und beim Y-Chromosom 371bp (Primer und Sequenzen: s. Anhang 11.1.3 bzw. 11.3.6). Das exakte Entstehungsverhältnis der beiden Produkte zueinander ist nicht bekannt, so dass mit der Amelogenin-PCR keine quantitativen Analysen möglich sind. Als

interne Positivkontrolle diente der Nachweis der X-Sequenz, die immer vorhanden ist (s. Kap. 4.4.6).

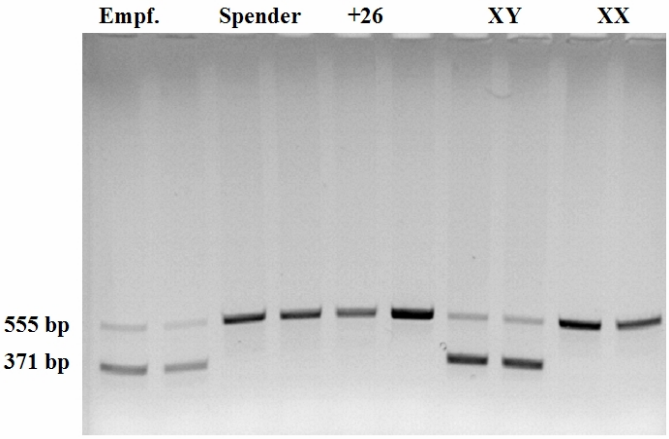

Abb. 5.8: gelelektrophoretischer Nachweis des Amelogenin-Gens nach KMT mittels PCR-SSP. *Für das weibliche Merkmal (XX) erhält man ein Produkt von 555bp Länge, für das männliche Merkmal (XY) erscheinen zwei Banden mit Längen von 555bp und 371bp. Der Empfänger ist männlich, Spenderin weiblich, nach KMT trägt der männliche Empfänger nur Blutzellen mit X-Chromosomen. Das Y-Merkmal ist nicht mehr nachweisbar.*

Bei dem Blutgruppensystem Kidd besaßen Empfänger und Spender folgende Allele: Der Empfänger war homozygot für JKB, die Spenderin homozygot für JKA. Nach der KMT konnte beim Empfänger JKA nachgewiesen werden, es fehlte JKB. Nachfolgend ist das Ergebnis der PCR-SSP (s. Abb. 5.9) dargestellt.

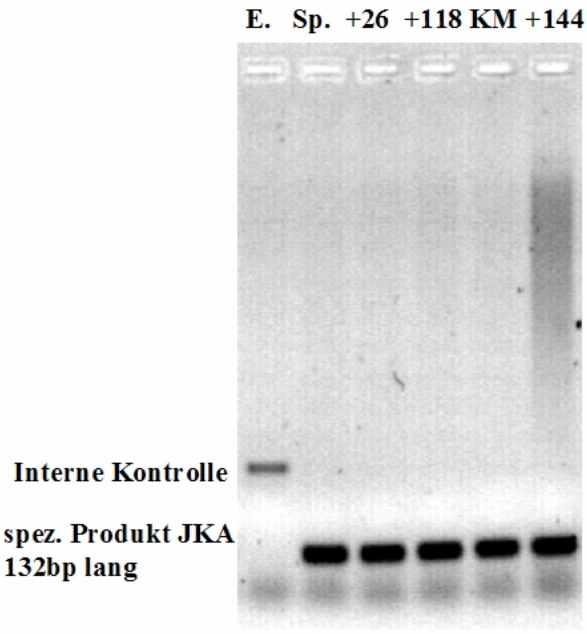

Abb. 5.9: Gelelektrophoretischer Nachweis des JKA-Merkmals mittels PCR-SSP*: Verlauf nach KMT, Empfänger homozygot für JKB, Spenderin homozygot für JKA. Der Empfänger zeigt die interne Kontrollbande, Spender und alle nach KMT untersuchten Proben sind positiv für JKA. Am Tag 118 nach KMT wurde, neben*

einer Blutprobe, auch eine Knochenmarks-Gewebeprobe (KM) untersucht. Auch hier konnte das JKA-Merkmal nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente das HGH-Gen (s. Kap.4.3.1).

Bei diesem Transplantationspaar waren die Genorte JK und das Amelogenin-Gen für die Chimärismus-Diagnostik am günstigsten. Bei beiden Genorten konnten jeweils homozygote Merkmale bei Spender und Empfänger nachgewiesen werden. Nach KMT waren die für den Empfänger typischen Merkmale nicht mehr nachweisbar. Da bereits ein erneutes Auftreten dieser Merkmale ein Rezidiv bedeutet, ist eine exakte Quantifizierung nicht erforderlich.
Andere Verhältnisse ergeben sich beim Duffyblutgruppensystem als Genort. Hier war der Patient homozygot für FYB, die Spenderin heterozygot für FYA/FYB. In den nach KMT untersuchten DNA-Proben konnten nun beide Merkmale nachgewiesen werden. Hier wäre zur Rezidiverkennung, d.h. Detektion eines minimalen Abfalls bzw. Anstiegs von FYA, eine exakte quantitative Analyse mittels LightCycler-PCR mit einer Kalibrierungskurve nötig.

5.3.3 KMT-Chimärismusstudie: 3. Spender-Empfänger-Paar

Patient	Tage nach KMT	**XY-PCR**	HNA-1a	HNA1-b	FYA	FYB	**JKA**	JKB
Empfänger	vor KMT	**XX**	pos	pos	neg	pos	**pos**	pos
Spender	vor KMT	**XY**	pos	pos	neg	pos	**neg**	pos
Empfänger	16	**XY**					**neg**	
Empfänger	62	**XY**					**neg**	

Tab. 5.3: 3. Paar mit Darstellung der verschiedenen Genortkonstellationen

Dieses Paar wies Unterschiede bei dem Amelogenin-Gen und dem Kiddblutgruppensystem auf:

In Abb. 5.10 sieht man, dass die Empfängerin vor Transplantation Zellen mit X-Chromosomen aufwies. Bei den Spenderzellen waren X- und Y-Chromosomen nachweisbar. In der am Tag 16 nach KMT untersuchten Blutprobe wurden beide bei der Empfängerin nachgewiesen.

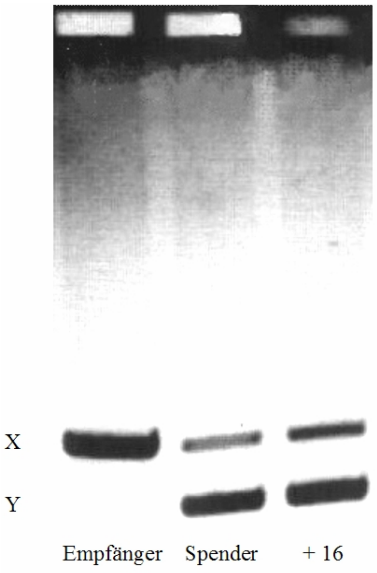

Abb. 5.10: gelelektrophoretischer Nachweis des Amelogenin-Gens nach KMT mittels PCR-SSP. *Für das weibliche Merkmal (XX) erhält man ein Produkt von 555bp Länge, für das männliche Merkmal (XY) erscheinen zwei Banden mit Längen von 555bp und 371bp. Die Empfängerin ist weiblich, der Spender ist männlich. Nach KMT trägt die Empfängerin sowohl Zellen mit X- als auch Y-Chromosomen.*

Bei der PCR mit dem Amelogenin-Gen entstanden zwei unterschiedlich große Produkte, von denen das kleinere (niedrigeres Molekulargewicht) offenbar bevorzugt hergestellt wurde. So wies beim gelelektrophoretischen Nachweis das kürzere Produkt mit 371bp Länge eine deutlichere, das längere Produkt (555bp) eine viel schwächere Bande auf, woraus man

schließen muß, daß bei einem Verhältnis von X:Y =1:1 dennoch die PCR-Produkte im Verhätltnis von etwa 30:70 entstehen können. Bei diesem Paar konnte durch Bildung beider Produkte nach KMT zwar Spenderchimärismus nachgewiesen werden, es können jedoch keine Aussagen zu einem möglichen Absinken des Y-Merkmals bzw. Anstieg des X-Merkmals, also der Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs, getroffen werden, da die Entstehung der PCR-Produkte hier nicht nur von der zugrundeliegenden Gendosis, sondern auch von der Reaktionskinetik maßgeblich mitbestimmt wird. Somit ist das Amelogenin-Gen als Genort für Chimärismus-Diagnostik bei diesem Tranplantationspaar wenig geeignet.

Anderes ergibt sich beim Kiddblutgruppensystem als Genort: Die Empfängerin war heterozygot für JKA/JKB, der Spender homozygot für JKB. Nach KMT war bei der Empfängerin das JKB-Merkmal nachweisbar und das JKA-Merkmal nicht mehr. Hier konnte Spenderchimärismus nachgewiesen werden. Bei erneutem Nachweis von JKA müsste von einem Rezidiv ausgegangen werden. Eine quantitative Analyse ist hier nicht erforderlich, es reicht der alleinige Nachweis durch PCR-SSP. Bei diesem Spender-Empfängerpaar ist das Kiddblutgruppensystem als Genort zur effektiven Rezidivdiagnostik gut geeignet.

5.3.4 KMT-Chimärismusstudie: 4. Spender-Empfänger-Paar

	Tage nach KMT	**HNA-1a**	**HNA1-b**	**FYA**	**FYB**	**JKA**	**JKB**
Empfänger	vor KMT	pos	pos	pos	**neg**	pos	neg
Spender	vor KMT	pos	pos	pos	**pos**	pos	neg
Empfänger	37				**pos**		
Empfänger	41				**pos**		

Tab. 5.4: 4. Paar mit Darstellung der verschiedenen Genortkonstellationen

Spender und Empfänger unterschieden sich im Duffyblutgruppensystem: Der Patient war homozygot für FYA und der Spender heterozygot für FYA/FYB. Der Nachweis erfolgte mittels PCR-SSP (s. Abb. 5.11) und LC-PCR (s. Abb. 5.12). Neben den in der PCR-SSP untersuchten DNA-Proben wurde in der LightCycler-PCR noch eine weitere Blutprobe von Tag 41 nach KMT untersucht.

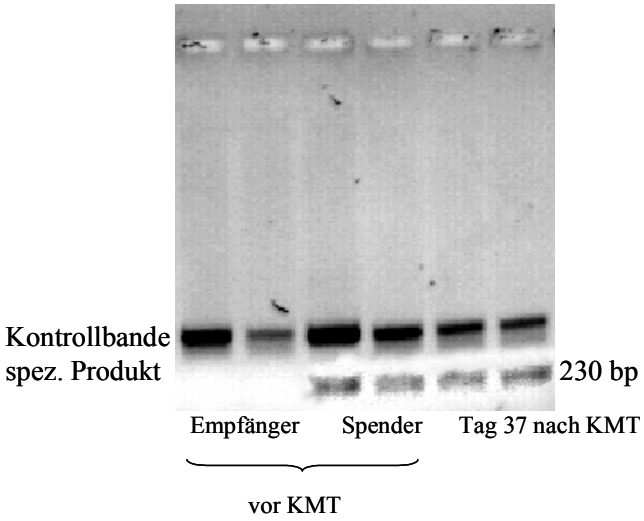

Abb. 5.11: Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-SSP mit Nachweis des FYB-Merkmals nach KMT: *Die Probe des Empfängers (homozygot für FYA) zeigt die interne Kontrollbande, während die Spenderprobe, heterozygot, die spezifische Bande für das FYB-Gen aufweist. In der am Tag 37 nach der KMT untersuchten Probe zeigt der Empfänger das FYB-Merkmals des Spenders.*

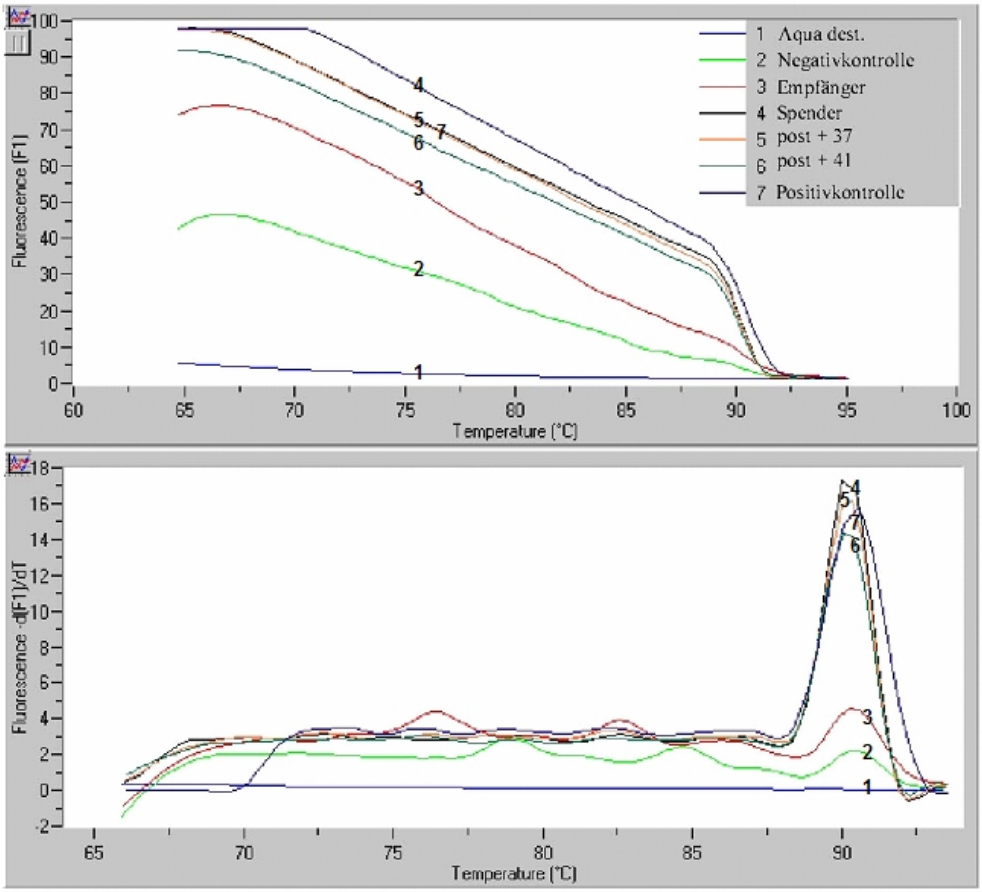

Abb. 5.12: Schmelzkurven der LightCycler-PCR mit Nachweis des FYB-Merkmals nach KMT**:** *Die nach KMT untersuchten Blutproben des Empfängers zeigen den Nachweis des FYB-Allels des Spenders. Der Empfänger (2) vor KMT und die Negativkontrolle (3) zeigen einen flachen Schmelzkurvenverlauf bei 92,0°C, während die Kurven des Spenders (4) und die nach KMT des Empfängers (5+6), genau wie die Positivkontrolle (7), bei 92,0°C einen hohen Peak aufweisen und somit ein spezifisches Produkt (FYB) amplifiziert worden ist.*

Mit beiden PCR-Methoden konnte das FYB-Merkmal bei dem Empfänger nach KMT nachgewiesen werden, es können jedoch keine weiteren Aussagen zur Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs getroffen werden. Hierzu wäre eine exakte quantitative Analyse der beiden FY-Merkmale notwendig.

Allgemeine Darstellung der möglichen Empfänger- und Spender-Konstellationen und die praktische Bedeutung für die Diagnostik

Bei allen untersuchten KMT-Paaren konnte Spenderchimärismus anhand von polymorphen Genorten nachgewiesen werden, da sich die Paare in mindestens einem Genort unterschieden. Im Anhang 11.5.3 findet sich eine tabellarische Darstellung aller untersuchten Paare. Diese Ergebnisse wurden mit der gemäß Studienprotokoll durchgeführten STR-Diagnostik (s. Kap. 4.10) verglichen. Bei allen drei Methoden zeigten sich übereinstimmende Befunde. Eine weitergehende quantitative Analyse des nach KMT entstandenen Mikrochimärismus der Spender-Empfänger-Paare wurde nicht durchgeführt, da nach den myeloablativen Konditionierungsprotokollen der KMT-Paare ein vollständiger hämatopoetischer Mikrochimärismus erreicht wurde.

Insgesamt konnten verschiedene Konstellationen zwischen Spender und Empfänger hinsichtlich der differenten Merkmale gefunden werden, die sich für die Chimärismusdiagnostik als mehr bzw. weniger geeignet herausstellten:

1) Der Empfänger ist homozygot für Merkmal A, der Spender heterozygot für A und B. Nach der SZT bzw. KMT können beide Merkmale nachgewiesen werden. Bei dieser Konstellation ist das Vorhandensein von Merkmal A ohne Bedeutung. Ein Rezidiv, d.h. ein Absinken des Merkmals B, kann nur durch eine exakte quantitative Analyse mit einer LightCycler PCR, bei der kleinste Veränderungen präzise registriert werden können, erkannt werden. Somit ist diese Konstellation für eine einfache und leicht in die Praxis umsetzbare Chimärismusdiagnostik nicht geeignet.

2) Wenn der Empfänger homozygot für Merkmal A, der Spender homozygot für Merkmal B ist, dann ist dieser Genort gut für die Chimärismusdiagnostik geeignet. Hier kann ein Rezidiv einfach mit bloßem Wiederauftreten des Empfängermerkmals registriert werden. Eine Quantifizierung ist bei dieser Konstellation nicht erforderlich. Hier ist eine einfache Chimärismusdiagnostik mittels PCR-SSP zur Frage eines Rezidivs ausreichend.

3) Bei der letzten möglichen Konstellation bei der Empfänger heterozygot (AB), der Spender homozygot (AA) ist, ist es ähnlich, wie bei der 2. Konstellation. Nach KMT bzw. SZT zeigt der Empfänger also Merkmal A, Merkmal B ist nicht mehr nachweisbar. Ein Rezidiv kann hier qualitativ durch erneuten Nachweis des Merkmals B mittels PCR-SSP ohne weitere Quantifizierung registriert werden.

6 Diskussion

Die allogene SZT mit verwandten und unverwandten Spendern wird bei Leukämien und anderen hämatologisch-onkologischen Erkrankungen als Therapie eingesetzt. Die Wahrscheinlichkeit für eine Heilung korreliert mit dem *Engraftment* der Spenderzellen im Empfängerorganismus (Bader et al. 1997). Kennzeichnend für ein Rezidiv sind maligne autologe Zellen, die entweder die vor der Transplantation durchgeführte Knochenmark-zerstörende Konditionierung im Sinne einer MRD überlebt haben oder nach Transplantation gebildet worden sind und von allogenen Immun-Effektorzellen nicht angegriffen werden.
Die Charakterisierung von Spender- und Empfänger-Merkmalen im Sinne der Mikrochimärismusdiagnostik nach SZT verfolgt verschiedene Ziele: Sie gibt Auskunft über das *Engraftment* der Spenderzellen oder das Risiko einer Abstoßung, die Persistenz maligner Zellen sowie über ein aufkommendes Rezidiv. Die Mikrochimärismusdiagnostik muß also hochsensitiv sein, um Rezidive so früh wie möglich diagnostizieren zu können. Zum anderen kann eine Analyse des Chimärismus bei der Anpassung einer Risiko-adaptierten Immuntherapie, Abschätzung der Rezidiv-Gefahr und Früherkennung einer MRD nach erfolgter Transplantation hilfreich sein (Bader et al. 1999, Formankova et al. 2000, Serrano et al. 2000). Hierzu bietet sich eine hochsensitive Mikrochimärismus-Analyse an, die sicher und zuverlässig Veränderungen des entstandenen Mikrochimärismus aufzeigen kann.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze zur Analyse des Spenderchimärismus erarbeitet. In der Vergleichsstudie (s. Kap. 5.1) wurde mit dem Nachweis nukleärer und mitochondrialer Polymorphismen unter nachgeahmten mikrochimären Bedingungen eine Möglichkeit zur Sensitivitätssteigerung aufgezeigt.
Für den Nachweis nukleärer Polymorphismen wurde in der genannten Vergleichsstudie das HLA-DRB1 Gen verwendet. Es existiert eine Vielzahl kommerzieller Testkits zur Typisierung der HLA-Allele, da die unterschiedlichen Allele dieser Gene routinemäßig bei potentiellen Knochenmarkspendern typisiert werden. Das HLA-System dient bei der Knochenmarkspendersuche als Haupt-Matchkriterium. Voraussetzung für eine erfolgreiche Knochenmarktransplantation ist es, eine möglichst hohe Übereinstimmung der HLA-Allele bei Spender und Empfänger (Petersdorf et al. 1995) zu finden, da das HLA-System eines der polymorphesten Systeme im Organismus darstellt und an essentiellen immunologischen Funktionen des Organismus beteiligt ist. Diese Genorte sind deshalb für die eigentliche Chimärismusdiagnostik nicht geeignet, da hierfür differente Merkmale zwischen Spender und Empfänger Vorausssetzung sind. So diente für die Vergleichsstudie, bei der chimäre

Bedingungen nachgeahmt wurden, das HLA-System hauptsächlich als polymorpher Genort stellvertretend für nukleäre DNA-Polymorphismen.

Für den Nachweis mitochondrialer Polymorphismen wurde die HV1-Region verwendet. Das mitochondriale Genom ist für molekulargenetische Untersuchungen in vielerlei Hinsicht interessant: Mitochondriale DNA unterliegt maternaler Vererbung, somit findet keine Rekombination statt. Die d-loop-Region ist hochvariabel und nicht-kodierend. Mögliche Erklärungen für die hohe Variabilität sind eine hohe Mutationsrate (Wallace et al. 1995) und limitierte Reparatur-Mechanismen (Clayton et al. 1974) während der DNA-Replikation. Mitochondrien besitzen eine eigene zirkuläre DNA und sind als Zellorganellen in einem Leukozyten etwa 10.000-fach enthalten. Es liegt daher nahe, dass für einen spezifischen, molekulargenetischen Nachweis von mt-DNA sehr viel weniger Zell-Äquivalente nötig sind als für den Nachweis von Kern-DNA einer Zelle. Diese Eigenschaft wird für mitochondriale DNA-Analysen auch in Bereichen wie Anthropologie und Forensik genutzt (Alonso et al. 2004).
Auf dem Gebiet der Transfusionsmedizin und Transplantations-Immunologie ist der diagnostische Einsatz mitochondrialer DNA-Polymorphismen bisher nicht weit verbreitet. Es gibt einzelne Studien, die sich mit Verträglichkeiten von Thrombozyten- oder Lymphozyten-Transfusionen und der Detektion von Mikrochimärismus auseinandergesetzt haben. Grundlegend ist dabei, dass ein molekulargenetischer Nachweis von mt-DNA von allen Zellen, die auch Mitochondrien enthalten, möglich ist. Die hochpolymorphen HV-Regionen bieten eine hohe Wahrscheinlichkeit, individuelle Polymorphismen zu finden. So fanden Garritsen et al. (2001) später bezüglich der mitochondrialen HV1- und HV2-Region von 100 Thrombozyten-Spendern keine mit der Cambridge-Referenzsequenz exakt übereinstimmende mt-DNA, sondern immer einzelne oder mehrere Mutationen. Basierend auf den oben genannten Arbeiten scheint die HV1-Region des mitochondrialen Genoms mit ihren polymorphen Sequenzen ohne immunologische Relevanz zunächst ein geeigneter Genort für die Mikrochimärismusdiagnostik zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Vergleichstudie (s. Kap. 5.1) mit künstlich erzeugten „Spenderchimären“ vorgestellt. Dabei wurden nukleäre und mitochondriale Polymorphismen mit der PCR-SSP durch standardisierte Verdünnungsreihen verglichen. Es zeigte sich, dass der Nachweis mitochondrialer Polymorphismen der HV1-Region eine Detektion von 1 unter $1:10^6$ Zellen ermöglicht, was 1000-fach sensitiver war als die Detektion nukleärer DNA. Die

Ergebnisse lassen darauf schließen, dass qualitative Mikrochimärismus-Analysen mittels PCR-SSP mit hoher Sensitivität durchgeführt werden können.
Grund für diese Sensitivitätssteigerung sind die „unterschiedlichen“ Mengen an nukleärer und mitochondrialer DNA in den verschiedenen Verdünnungsstufen. Ein diploides Genom wiegt 7,5 pg, so dass bei einer DNA Menge von 33 pg etwa 4 Zelläquivalente vorhanden sind. Bei einer Verdünnung von $1:10^3$ sind 4 Zelläquivalente, die für eine spezifische Amplifikation von HLA-DRB1, also nukleärer DNA, notwendig sind, enthalten. Bei stärkerer Verdünnung sind weniger als 4 Zelläquivalente vorhanden, so dass eine spezifische Amplifikation nukleärer DNA-Merkmale nicht mehr möglich ist. Der Nachweis mitochondrialer Merkmale ist sensitiver. In einer Zelle sind etwa 1000 Mitochondrien enthalten, so dass hier eine wesentlich geringere Menge an DNA ausreicht, um noch ein spezifisches Produkt bilden zu können. Hier reicht ein Zelläquivalent von 0,004 aus.
Einschränkend ist jedoch zu bemerken, dass diese Methode nur angewendet werden kann, wenn zwei Primer eingesetzt werden, die jeweils spezifisch für einen Polymorphismus sind. Diese Polymorphismen müssen zudem in einem Abstand von etwa 70 bp lokalisiert sein, um eine ausreichend großes PCR-Produkt zu ergeben. Dies gilt insbesondere für den quantitativen Nachweis mittels LightCycler-PCR, da hier mit Einsatz nur eines sequenzspezifischen Primers keine ausreichende Spezifität erreicht werden kann.

Der Einsatz der Verdünnungsreihen im Rahmen der LightCycler-PCR (s. Kap. 5.2) zeigte überraschende Ergebnisse. Bei dem Einsatz eines spezifischen und eines gemeinsamen Rückwärtsprimers zum Nachweis der HLA-DRB1 Gene wurde bis zu einer Vedünnung von $1:10^4$ ein spezifisches Amplifikat gebildet. Gleichzeitig wurden störende Primer-Dimere gebildet. In einem Folgeversuch wurden nun zwei sequenzspezifische Primer in die PCR eingesetzt, wobei es dann zur Bildung eines spezifischen Produktes bis zu einer Verdünnung von $1:10^5$ kam. Es konnte also eine Sensitivitätssteigerung gezeigt werden. Die Bildung von Primer-Dimeren sank. Daraus lässt sich schließen, dass mit dem Einsatz zweier sequenzspezifischer HLA-DRB1-Primer eine ausreichend sensitive und quantitative Analyse mit dieser PCR durchführen lässt. Inwieweit die gebildete Menge an Primer-Dimeren durch den unterschiedlichen GC-Gehalt der Primer zustande kommt, wäre zu prüfen.

Im Vergleich zu der in dieser Arbeit etablierten Methode können routinemäßig eingesetzte Verfahren zur Detektion des Chimärismus (wie die XY-FISH- oder STR-Analyse) im Durchschnitt nur 1 unter 1.000 bis 1 unter 10.000 Zellen nachweisen. Eine weitere

hochsensitive Methode zur Detektion mitochondrialer Polymorphismen stellten Garritsen et al. (2001) mit der PCR-SSCP (*single strand conformational polymorphism*) vor. Sie wird allgemein als Screening-Methode für einzelne pathologische Mutationen eingesetzt (Garritsen et al. 2001). Der besondere Vorteil ist, dass sie sowohl bei bekannten als auch bei unbekannten Sequenzvarianten durch Nachweis amplifizierter DNA-Fragmente anwendbar ist. Das Verfahren basiert auf der einzigartigen Faltstruktur einzelsträngiger DNA-Fragmente, die durch intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb der DNA-Sequenz determiniert sind. Schwierigkeiten ergaben sich jedoch bei der Optimierung der Versuchsbedingungen, wie beispielsweise der Temperatur-Einstellung und der Analyse der vielen hochvariablen mitochondrialen Polymorphismen.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte PCR-SSP mit dem Nachweis mitochondrialer Polymorphismen weist nicht nur im Vergleich zum Nachweis nukleärer Polymorphismen sondern auch im Vergleich zu dem in der Routine eingesetzten Verfahren wie beispielsweise die STR-Diagnostik eine weitaus höhere Sensitivität beim Nachweis des Spenderchimärismus auf. Durch den Einsatz in die LightCycler-PCR konnte eine weitere Sensitivitätssteigerung gezeigt werden.

Nachteile im Einsatz der mitochondrialen DNA-Polymorphismen ergeben sich für die Chimärismus-Diagnostik aufgrund der eingeschränkten Einsetzbarkeit. Die maternale Vererbung ist vorteilig für die Durchführung von Abstammungsanalysen. Für die Chimärismus-Diagnostik ist sie jedoch von Nachteil, da es in der mütterlichen Linie keine Unterschiede gibt, Geschwister also dieselbe Sequenz der mt-DNA aufweisen. Bei der Suche nach geeigneten Spendern für eine allogene Stammzelltransplantation ist die Spende unter Geschwistern häufiger, da hier durch gleiche genetische Abstammung eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, größere Übereinstimmungen der Matchkriterien, insbesondere im HLA-System, zu finden, weshalb der Einsatz mitochondrialer Polymorphismen nicht immer möglich ist.

Eine weitere Schwierigkeit beim Einsatz mitochondrialer Polymorphismen besteht darin, dass zunächst eine Sequenzierung der HVR1-Sequenz erforderlich ist, um individuelle Polymorphismen finden zu können. Anschließend müssen entsprechend den gefundenen Mutationen Primer konstruiert werden. Weiter müssen speziell angepasste PCR-Protokolle entwickelt werden, um optimale Ergebnisse erzielen zu können. Es muß also vor dem eigentlichen Einsatz in die Chimärismusdiagnostik eine zeitaufwendige Vorarbeit zum Aufspüren differenter Merkmale zwischen Empfänger und Spender geleistet werden. Ist diese

Vorarbeit jedoch einmal geleistet, ist eine PCR-SSP innerhalb von wenigen Stunden durchgeführt und ein Ergebnis in kurzer Zeit vorhanden. Die PCR-SSP stellt somit insgesamt eine zuverlässige und einfach zu handhabende Methode dar, die damit in der klinischen Routine gut einsetzbar ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Auswahl polymorpher Genorte hinsichtlich ihrer Eignung zur Beobachtung des nach allogener SZT entstandenen Mikrochimärismus geprüft und anschließend praktische Einsatzmöglichkeiten an den Spender-Empfänger-Paaren nachgewiesen. Dabei wurden zwei unterschiedliche PCR-Methoden eingesetzt: die PCR-SSP und die LightCycler-PCR (LC-PCR). Die PCR-SSP bietet eine qualitative Analyse mit einer Endpunktbestimmung mittels Amplifikation eines spezifischen Produktes. Ein wichtiger Vorteil der LC-PCR gegenüber der klassischen PCR-SSP besteht in einem wesentlich schnelleren und weniger aufwendigeren Verfahren.

Bei der Suche nach geeigneten Genorten kommen polymorphe Genorte in Frage, bei denen eine möglichst homogene Frequenz-Verteilung der Polymorphismen in der Bevölkerung vorliegen sollte, da so die Wahrscheinlichkeit am höchsten ist, dass sich Spender und Empfänger unterscheiden. Durch die Auswahl mehrerer Genorte kann die Wahrscheinlichkeit weiter erhöht werden, wenigstens für einen Genort unterschiedliche Merkmale bei einem Transplantations-Paar zu finden. So bietet der Fcγ-RIIIb bei Typisierungsuntersuchungen in der europäischen Bevölkerung eine durchschnittliche Genfrequenz-Verteilung von 0,35 für HNA-1a, 0,65 für HNA-1b und etwa 0,03 für den HNA-1c, so dass häufig Unterschiede gefunden werden können (Bux et al. 1995). Bei den Blutgruppen-Systemen für Duffy und Kidd liegt mit nahezu identischen Häufigkeiten der jeweiligen Allele in der kaukasischen Bevölkerung ein noch günstigeres Verhältnis vor (s. Kap. 1.4.4 u. 1.4.5). In anderen Populationen finden sich zum Teil zusätzliche Phänotypen, wie beispielsweise das stumme Gen FY bei Duffy und im Kidd-System viele weitere Mutationen, so dass der Einsatz dieser Genorte in der Chimärismus-Diagnostik für andere Bevölkerungsgruppen (in der hier vorgestellten Form) nur bedingt sinnvoll ist. Die Verwendung des Amelogenin-Gens als Genort für die Chimärismusdiagnostik ist einerseits von Vorteil, da bereits der Phänotyp leicht erkennbar ist. Aufwendige Genort-Typisierungen könnten also bei diesem Genort entfallen. Das Geschlecht ist jedoch ein minor-Matchkriterium, so dass eine Analyse-

taugliche Situation de facto seltener vorkommt, als wenn ein Genort eingesetzt wird, der bei der Spendersuche keine Bedeutung hat.

Bei der Mikrochimärismusstudie (s. Kap. 5.3) konnte für alle untersuchten Spender-Empfängerpaare mindestens ein polymorpher Genort gefunden werden. Sowohl bei der PCR-SSP als auch bei der LC-PCR zeigten sich übereinstimmende Ergebnisse mit dem qualtitativen Nachweis von hämatopoetischem Spenderchimärismus. Diese Ergebnisse stimmten mit der routinemäßig durchgeführten STR-Diagnostik überein. Bei der LC-PCR konnte eine Quanitifzierung nicht gezeigt werden, da alle Paare aufgrund ihres Konditionierungs-Protokolls mit myeloablativer Therapie einen kompletten Spenderchimärismus aufwiesen und so nur eine Effektivität der Behandlung gezeigt werden konnte. Alle spezifischen PCR-Amplifikate konnten anhand ihres charakteristischen Schmelzkurven-Verlaufes, der abhängig von der individuellen Länge der DNA-Fragmente ist, von unspezifischen Produkten und Primer-Dimeren unterschieden werden.

Bei den Spender-Empfänger-Paaren konnten unterschiedliche Konstellationen der differenten Merkmale hinsichtlich Homo- und Heterozygotie gefunden werden. Es ergaben sich für die Chimärismusdiagnostik geeignete und weniger geeignete Konstellationen. So stellte sich bei der Auswertung der Ergebnisse heraus, dass für die Chimärismusdiagnostik nicht nur die polymorphen Genorte und ihre Frequenzverteilung in der Bevölkerung von Bedeutung sind. Ebenso wichtig ist die Konstellation der differenten Merkmale, weil sie direkte Konsequenzen für eine mögliche Rezidivbeurteilung nach sich zieht. Im Kapitel 5.3 wurden die möglichen Konstellationen bereits vorgestellt. Eine Rezidivbeurteilung ist dann einfach möglich, wenn das nach KMT verschwundene Merkmal wieder auftritt. Diese Konstellation ist am günstigsten, da keine aufwendige quantitative Analyse der Menge an gebildetem spezifischem Produkt erforderlich ist. Hier reicht die hier in der Arbeit vorgestellte qualitative Diagnostik mittels PCR-SSP bzw. LC-PCR für eine effektive Chimärismusdiagnostik aus. Zeigt der Patient hingegen nach der KMT beide Allele, ist also heterozygot geworden, kann ein Absinken des „Spendermerkmals“ von beispielsweise 100% auf 90% bzw. ein Anstieg des „Patientenmerkmals“ von beispielsweise 0% auf 10% nur durch exakte quantitative Analyse rechtzeitig und präzise bemerkt werden. Findet man also bei der obengenannten Auswahl an Genorten bei einem KMT-Paar keine günstige Konstellation bezüglich Homo- und Heterozygotie, sollte entweder über eine Erweiterung der Gruppe an Genorten nachgedacht

werden bis eine günstige Konstellation gefunden wird, oder es müsste eine Rezidivbeurteilung mittels quantitativer Analyseverfahren durchgeführt werden.

In den folgenden Abschnitten wird die hier vorgestellte PCR-Methode mit anderen Verfahren zur Mikrochimärismusdiagnostik verglichen:
Ein häufig bei Geschlechts-verschiedenen Paaren angewandtes Verfahren ist die *fluorescence-in-situ-Hybridisierung* (s. Kap. 1.3.2.1) für Geschlechts-Chromosomen (XY-FISH). Nach allogener SZT kann hier eine frühe Detektion des gemischten Chimärismus erfolgen. So konnten Tamura et al. (2000) mittels Interphase-FISH-Analyse und zweifach-markierter XY-Sonden einen gemischten Chimärismus bis zu einem Empfängerzell-Anteil von weniger als 1% nachweisen. Dieses Verfahren kann jedoch nur bei Geschlechts-verschiedenen Transplantationspaaren angewandt werden, wodurch sich das Einsatzgebiet dieser Methode eingeschränkt.

Die häufigste routinemäßig eingesetzte Methode ist die STR-Diagnostik (s. Kap. 1.3.1 und 4.10), welche auf dem Nachweis einer Gruppe polymorpher Mikrosatelliten-Gene basiert, mit der Spender und Empfänger - ähnlich einem genetischen Fingerabdruck - unterschieden werden können. Die STR-Diagnostik bietet ein gutes, zuverlässiges Verfahren zur Detektion des Engraftments oder eines Rezidivs nach allogener SZT (Senitzer et al. 2001), eine exakte Quantifizierung ist jedoch nicht möglich. Eine STR-Analyse ist, vom Erhalt der Post-SZT-Probe an, binnen 24 Stunden möglich, dauert jedoch in der Praxis meist länger, da die STR-Diagnostik nur in speziellen Zentren mit geschultem Personal durchgeführt werden kann. Demgegenüber kann eine Chimärismus-Analyse mittels LightCycler-PCR erheblich schneller, d.h. in etwa 2 h, durchgeführt werden. Die PCR-SSP dauert ca. 2,5-3,5 h und kann in jedem molekulargenetischen Labor mit relativ geringem Arbeits- und Kostenaufwand durchgeführt werden.

Eine von Bader et al. etablierte quantitative PCR mit *variable number of tandem repeat* (VNTR)-Sequenzen (s. Kap. 1.3.1), ähnlich den STR-Loci, hat eine maximale Sensitivität von 80% (Bader et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass in regelmäßigen Abständen durchgeführte quantitative Analysen des gemischten Mikrochimärismus bei ALL die schnelle und zuverlässige Aufdeckung eines potentiellen Rezidivs ermöglichen und dass ferner ein ansteigender autologer Chimärismus ein signifikant höheres Rezidiv-Risiko beinhaltet. Eine Quantifizierung erfolgte in der oben genannten Studie mittels kompetitiver PCR sowie

standardisierten DNA-Gemischen bekannter Konzentrationen von Spender und Empfänger vor Transplantation zwecks individueller Standardkurvenetablierung.
Dieses Verfahren ist insgesamt aufwendig, da hier ähnlich der STR-Diagnostik zunächst eine Sequenzierung erforderlich ist. Ferner müssen zur exakten Quantifizierung individuell angepasste Standardkurven erstellt werden. Dieses Verfahren ist aufgrund des technischen und zeitlichen Aufwandes speziellen Zentren mit geschultem Personal vorenthalten.

Im Gegensatz zu den oben genannten Methoden sind die in dieser Arbeit vorgestellte PCR-SSP und insbesondere die LightCycler-PCR eine zuverlässige, sichere und im Gegensatz zur STR-Diagnostik schnellere Nachweismethode für die Mikrochimärismus-Analyse. Sollten sich die Paare in keinem der hier untersuchten Genorte unterscheiden oder eine für die Diagnostik primär ungünstige Konstellation der differenten Merkmale aufweisen, so kann mit geringem Aufwand ein „neuer“ polymorpher Genort mit einer entsprechenden Mutation bei geeigneter Frequenz-Verteilung gesucht und eine neue PCR etabliert werden. So könnte die Gruppe der hier vorgestellten Genorte erweitert werden und vor Transplantation routinemäßig eine einfache Typisierung zur Detekion von Polymorphismen bei den unterschiedlichen Spender-/Empfängerpaaren erfolgen. Findet man dort polymorphe Merkmale mit günstiger Konstellation, kann dann sicher und schnell nach erfolgter SZT mittels der LC-PCR eine Mikrochimärismus- Diagnostik innerhalb kürzester Zeit zur Rezidivberurteilung auch in der täglichen Krankenhausroutine erfolgen.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine weitere - neben der routinemäßig durchgeführten Short-Tandem-Repeats-Polymorphismus-Analyse (STR) - PCR-basierte Methode zur Mikrochimärismus-diagnostik nach allogener Stammzell-Transplantation, die mit hoher Sensitivität einfach und schnell durchführbar ist, entwickelt und anhand von klinischen Beispielen überprüft.

Es wurde gezeigt, dass der Nachweis mitochondrialer DNA sensitiver ist als der Nachweis nukleärer DNA. Mittels PCR-SSP wurde unter Verwendung mitochondrialer Sequenzpolymorphismen eine Sensitivitätssteigerung gegenüber dem Nachweis nukleärer Polymorphismen um den Faktor 1000 erreicht. Diese Sensitivitätssteigerung konnte mittels PCR-SSP bei allen standardisierten Verdünnungsreihen künstlich erstellter „Chimären“ durch einen Wechsel von nukleären zu mitochondrialen DNA-Polymorphismen gezeigt werden. Allerdings hat die erhöhte Sensitivität beim Nachweis mitochondrialer DNA-Polymorphismen eine geringere Spezifität der Reaktion zur Folge und erfordert daher mindestens zwei Sequenzunterschiede zwischen Spender und Empfänger. So ist der Nachweis mitochondrialer DNA-Polymorphismen mit Beachtung oben genannter Voraussetzungen hochsensitiv. Beim Vergleich zwischen der klassischen PCR-SSP und der Light-Cycler PCR war zum Nachweis desselben Polymorphismus die Sensitivität beider Verfahren gleich.

Im Weiteren wurde an realen Spender-Empfängerpaaren die Eignung verschiedener polymorpher Genorte zur Mikrochimärismusdiagnostik durch Vergleich mit der routinemäßig durchgeführten STR-Analyse überprüft. Bei allen untersuchten Paaren wurde ein hämatopoetischer Spenderchimärismus nachgewiesen und es zeigte sich eine völlige Übereinstimmung der Ergebnisse. Durch frühzeitige Bestimmung des geeignesten Polymorphismus kann eine Rezidivbestimmung mittels der hier vorgestellten PCR-SSP bzw. LightCycler-PCR erfolgen.

Insgesamt konnte eine neue, breit einsetzbare PCR-basierte sensitive Nachweis-Methode für die Mikrochimärismusdiagnostik erarbeitet werden, die, wie im zweiten Teil der Arbeit gezeigt wurde, auch in der klinischen Routine problemlos eingesetzt werden kann.

8 Summary

In this thesis, an additional to the in routine-used Short-tandem-repeats-polymorphism-analysis PCR-based high sensitive method for the detection of microchimerism after allogenic stemcell-transplantation was investigated. This simple and quick method was validated using clinical examples.

It was shown that the detection of mitochondrial DNA is more sensitive than the detection of nucleic DNA. By means of PCR-SSP under utilization of mitochondrial sequencepolymorphisms an increasing sensitivity (factor 1000) in contrast to nucleic gene polymorphisms was received. This increase in sensitivity could be found by using PCR-SSP in all standardized dilution series of artificially produced “donor chimeras” because of a change from nucleic to mitochondrial DNA-polymorphisms. However, the higher sensitivity by detection of mitochondrial DNA-polymorphisms has shown a lower specifity of the reaction and requires at least two differences of the sequences between donor and receiver sequences. The detection of mitochondrial DNA-polymorphisms considering the named conditions is high-sensitive. In comparison between using the classical PCR-SSP and the Light-Cycler PCR for the detection of the same polymorphism the sensitivity was equal.

The suitability of a selection of polymorphic gene locus for the qualitative analysis of microchimerism to real donor-receiver pairs was studied in comparison with the Short-tandem-repeats diagnostic, which was done in clinical routine. In all investigated pairs a haematopoetic donor chimerism was demonstrated and a total congruency of the results was found. By early determination of the most suitable polymorphism the detection of relapse can be carried out with the represented PCR-SSP and LC-PCR method.

In conclusion, a new PCR-based method for the analysis of microchimerism was demonstrated. This can be applied without any difficulty in daily clinical routine as shown in the second part of this thesis.

9 Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphozytische Leukämie
AMG	Amelogenin-Gen
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
bp	Basenpaar(e)
CD	Differenzierungs-Marker (*cluster of differentiation*)
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
DARC	Duffy-Antigen-Rezeptor für Chemokine
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'- Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DLI	Spender-Lymphozyten-Infusion (*donor lymphocyte infusion*)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FcγRIIIb	Fcγ-Rezeptor IIIb (CD16b)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G-CSF	Granulozyten-stimulierender Faktor (*granulocyte-colony stimulating factor*)
Gp-Fy	Duffy-Blutgruppen-Glykoprotein D
GPI-Anker	Glykosylphosphaditylinositol-MembranAnker
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit *(Graft-versus-Host-disease)*
h	Stunde(n)
MHN	Morbus haemolyticus neonatorum
HVOD	Lebervenenverschlusskrankheit (*hepatic-veno-occlusive disease*)
HGH	Humanes Wachstums-Hormon (*human growth hormone*)
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HNA	Humanes Neutrophiles Antigen
HVR-1	Hypervariable Region 1
Ig	Immunglobulin

ILS 600	Interner Längenstandard 600
kb	Kilobase(n)
kD / kDa	Kilodalton
K	Kelvin
KMT	Knochenmark-Transplantation
LC-PCR	LightCycler-PCR
LED	Licht emittierende Diode (*light emitting diode*)
MC	gemischter Chimärismus (*mixed chimerism*)
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (*major histocompatibility complex*)
min	Minute(n)
MRD	minimale Resterkrankung (*Minimal Residual Disease)*
mt-DNA	mitochondriale DNA
mRNA	*messenger-RNA*
NIN	neonatale Immunneutropenie
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PCR-SSO	PCR mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden
PCR-SSP	PCR mit Sequenz-spezifischen Primern
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus/-men
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SLC14A1	*solute carrier family 14, member 1*
STR-PCR	Short Tandem Repeats-PCR
SZT	Stammzell-Transplantation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	*Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase
TRALI	Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (*transfusion related acute lung injury*)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSR	*Template suppression reagent*
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Einheit(en) (*unit(s)*)

Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VNTR	variable number of tandem repeat-Analyse

10 Literaturverzeichnis

Abid S, Zili M, Bouzid L, Kibech R, Foudhaili N, Joudi K, Ren Regaya Z, Abdennaji B, Mrad R, Boukef K Gene frequencies of the human neutrophil antigens in the Tunesian blood donors and Berbers. Tissue Antigens 58, 90-92 (2001)

Alonso A, Martin P A real-time PCR protocol to determine the number of amelogenin (x-y) gene copies from forensic DNAsamples. Methods Mol Biol 297, 31-44 (2004)

Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia P, Garcia O, de Simon LF, Garcia-Hirschfeld J, Sancho M, de La Rua C, Fernandez-Piqueras J Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. Forensic Sci Int 28, 141-9 (2004)

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG
Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. Nature 290, 457-465 (1981)

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbell DM, Howell N Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nature genetics 23, 147 (1999)

Armitage J Bone marrow transplantation. New Engl J Med 330, 827-838 (1994)

Bader P, Hölle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel P, Niethammer D, Beck J Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse in graft rejection in children.
BMT 19, 697-702 (1997)

Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D, Klingebiel T Serial and quantitative analysis of mixed chimerism hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. BMT 21, 487-495 (1998)

Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger P, Lang P, Niethammer D, Beck JF Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated an the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. Leukemia 13, 2079-2086 (1999)

Bader P, Stoll K, Huber A, Geiselhardt A, Handgretinger R, Niemeyer C, Einsele H, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J, Klingebiel T Characterization of lineage-specific chimaerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse. British Journal of Haem 108, 761-768 (2000)

Bailey DM, Affara NA, Ferguson-Smith MA The X-Y homologous gene amelogenin maps to the short arms of both the X and Y chromosomes and is highly conserved in primates. Genomics 14, 203-205 (1992)

Barrett AJ, van Rhee F. Graft-versus-leukaemia. Baillieres Clin Haematol 10, 337-355 (1997)

Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J, Storb R, Buckner CD Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. Blood 85, 1655-1658 (1995)

Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, Pannunzio A, Gadner H, Schrappe M, Kamps WA, Bartram CR, van Dongen JJ, Panzer-Grumayer ER. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. Leukemia 14, 1939-1943 (2000)

Blazar BR, Orr HT, Arthur DC, Kersey JH, Filipovich AH Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. Blood 66, 1436-1444 (1985)

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC Three-dimensional strucure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 364, 33-39 (1993)

Bunce M, O'Neill CM, Barnado MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI Phototyping : Comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 &DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence specific primers (PCR-SSP). Tissue Antigens 46, 355 (1995)

Bux J, Hartmann C, Mueller-Eckhardt C Alloimmune neonatal neutropenia resulting from immunization to a high-frequency antigen on the granulocyte Fc gamma receptor III. Transfusion 34, 608-611(1994)

Bux J, Stein EL, Santoso S, Mueller-Eckhardt C NA frequencies in the German population by polymeric chain reaction with sequence specific primers. Transfusion 35, 54-57(1995)

Bux J Molecular nature of granulocyte antigens. Transfus Clin Biol 8, 242-247(2001)

Bux J Molecular nature of Antigens implicated in immune neutropenias. J Hematol 76 Suppl 1, 399-403(2002)

Catalano-Sherman J, Palmon A, Burstein Y, Deutsch D Amino acid sequence of a major human amelogenin protein employing Edman degradation and cDNA sequencing. J Dent Res 72, 1566-1572 (1993)

Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, Read EJ, Carter C, Bahceci E, Young NS, Barrett AJ Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. Blood 94, 3234-3241 (1999)

Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. Proc Nat Acad Sci USA 71, 2777-2781 (1974)

Cutbush M, Mollinson PL, Parkin DM A new human blood group. Nature 165, 188-189 (1950)

Daniels G Human blood groups, Blackwell Science Ltd. London, 327 + 343 (2002)

Donahue R.P, Bias WB, Renwick JH, McKusick VA Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. Proc Natl Acad Sci USA 61, 949-955 (1968)

Eckert C, Scrideli CA, Taube T, Songia S, Wellmann S, Manenti M, Seeger K, Biondi A, Cazzaniga G Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. Leukemia 17, 2517-2524 (2003)

Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt CL, Smith P, Oppenheim A Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. Gene 29, 327-332 (1995)

Flowers ME, Kansu E, Sullivan KM. Pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease. Hematol Oncol Clin North Am 13, 1091-1112, viii-ix (1999)

Formánková R, Honzátková L, Moravcová J, Sieglová Z et al. Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukaemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. Leukemia Research 24, 339-347 (2000)

Fröhlich O, Macey RI, Edwards-Moulds J, Gargus JJ, Gunn RB Urea transport deficiency in Jk(a-b-) erythrocytes. Am J Physiol 260, C778-83 (1991)

Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, Floch C, Poulet E, Duedari N, Bierling P Frequency of the polymorphonuclear FcγRIII deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia. Blood 79, 2131 (1992)

Fukuda T, Hackman RC, Guthrie KA, Sandmaier BM, Boeckh M, Maris MB, Maloney DG, Deeg HJ, Martin PJ, Storb RF, Madtes DK. Risks and outcomes of idiopathic pneumonia syndrome after nonmyeloablative and conventional conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood 15, 2777-27785 (2003)

Garritsen HSP, Szuflad P, Sibrowski W, Dzik WH A sequence- specific polymerase chain reaction assay for mitochondrial DNA polymorphism in human platelets and white cells. Transfusion 37, 1012-1019 (1997)

Garritsen HSP, Hoerning A, Hellenkamp F, Cassens U, Mittmann K, Sibrowski W Polymorphism in the non-coding region of the human mitochondrial genome in unrelated plateletapharesis donors. BJH 112, 995-1003 (2001)

Gillis AG, Sands JM Urea transport in the kidney. Semin Nephrol 13, 146-154 (1993)

Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, Sreenath T, Wright JT, Decker S, Piddington R, Harrison G, Kulkarni AB Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. J Biol Chem 24, 31871-31875 (2001)

Gittinger F.S, Schindler-Wuepper L, Kissel K, Bux J Quantitative determination of Fcγreceptor Genes by means of fluorescence-based real-time polymerase chain reaction. Tissue Antigens 60, 64-70 (2002)

de Haas M, Kleijer M, van Zwieten R, Roos D, von dem Borne AE Neutrophil FcγRIIIb deficiency nature and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. Blood 86, 2403 (1995)

Hadley TJ, David PH, McGinniss MH, Miller LH Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fya antigen. Science 10, 597-599 (1984)

Hamblin MT, Di Rienzo A Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus. Am J Hum Genet 66, 1669-1679 (2000)

Heaton DC, McLoughlin K Jk(a-b-) red blood cells resist urea lysis. Transfusion 22, 70-71 (1982)

Hessner MJ, Pircon RA, Johnson ST, Luhm RA Prenatal genotyping of the Duffy blood group system by allele specific polymerase chain reaction. Prenatal Diag 19, 41-45 (1999)

Huizinga TW, Kerst M, Nuyens JH, Vlug A, von dem Borne AE, Roos D, Tetteroo PA Binding characteristics of dimeric IgG subclass complexes to human neutrophils. J Immunol 142, 2359-64 (1989)

Huizinga TW, Dolman KM, van der Linden NJ, Kleijer M, Nuijens JH, von dem Borne AE, Roos D Phosphatidylinositol linked FcγRIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins but does not mediate initiation of the respiratory burst. J Immunol 144, 1432-7 (1990)

ISBT Granulocyte Antigen Working Party Nomenclature of granulocyte Alloantigens. Vox Sang 77, 251 (1999)

Iwamoto S, Omi T, Kajii E, Ikemoto S Genomic Organization of the Glycoprotein D Gene: Duffy Blood Group Fy^a/Fy^b Alloantigen System Is Associated With a Polymorphism at the 44-Amino Acid Residue. Blood 85, 622-626 (1995)

Junghanss C, Marr KA Infectious risks and outcomes after stem cell transplantation: are Nonmyeloablative transplants changing the picture? Curr Opin Infect Dis 15, 347-53 (2002)

Knepper MA, Star RA The vasopressin-regulated urea transporter in renal inner medullary collecting duct. Am J Physiol 259, 393-401 (1990)

Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, Landegren U, Pettersson U A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). Genomics 10, 971-975 (1991)

Lau EC, Mohandas TK, Shapiro LJ, Slavkin HC, Snead ML Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. Genomics 4, 162-168 (1989)

Lawler SD, Harris H, Millar J, Barrett A, Powles RL Cytogenetic follow-up studies of recipients of T-cell depleted allogeneic bone marrow. Br J Haematol 65, 143-150 (1987)

Li AH, Forestier E, Rosenquist R, Roos G Minimal residual disease quantification in childhood acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction using the SYBR green dye. Exp Hematol 30, 1170-1177 (2002)

Livingstone FB The Duffy blood groups, vivax malaria, and malaria selection in human populations: a review. FB Hum Biol 56, 413-425 (1984)

Lucien N, Sidoux-Walter F, Oives B, Moulds J, Le Pennec P-Y, Cartron J-P, Bailly P Characterization of the Gene Encoding the Human Kidd Blood Group/Urea transporter Protein. J Biol Chem 273, 12973-12980 (1998)

Lucien N, Chiaroni J, Cartron JP, Bailly P Partial deletion in the JK locus causing Jk(null) phenotype. Blood 99, 1079-81 (2002)

Mackinnon S, Barnett L, Heller G. Polymerase chain reaction is highly predictive of relapse in patients following T cell depleted allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. BMT 17, 643-647 (1996)

Mathe G, Amiel JL, Schwartzenberg L, Cattan A, Schneider M, Devries MJ, Tubiana M, Lalanne C, Binet JL, Papiernik M, Seman G, Matsukura M, Mery AM, Schwarzmann V, Flaisler A Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism, unduced specific tolerance and possible anti-leukemic effects. Blood 25, 179-196 (1965)

Mickelson EM, Petersdorf E, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Hansen JA. HLA matching in haematopoietic cell transplantation. Hum Immunol. 61, 92-100 (2000)

Microsoft® Encarta® Enzyklopädie Professional 2003, © 1993-2002 Microsoft Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med 295, 302-304 (1976)

Mullighan CG, Marshall SE, Fanning GC, Briggs DC, Welsh KI Rapid haplotyping of mutations in the duffy gene using the polymerase chain reaction and sequence specific primers. Tissue Antigens 51, 195-199 (1998)

Mullis KB Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. Ann Biol Clin (Paris) 48, 579-582 (1990)

Nakahori Y, Takenaka O, Nakagome Y A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". Genomics 9, 264-269 (1991)

Olerup O, Zetterquist H HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR-typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 39, 225-235 (1992)

Olives B, Mattei MG, Huet M, Neau P, Martial S, Cartron JP, Bailly P Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein. J Biol Chem 270, 15607-15610 (1995)

Olives B, Merriman M, Bailly P,Bain S, Barnett A, Todd J, Cartron JP, Marriman T The molecular basis of the Kidd blood group polymorphism and its lack of association with the type 1 diabetes susceptibility. Hum Molec Genet 6, 1017-1020 (1997)

Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Åkesson IE, GreenCA, Daniels GL A clinically applicable method for determining the three major allels at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele specific primers. Transfusion 38, 168-173 (1998)

Parikh CR, Sandmaier BM, Storb RF, Blume KG, Sahebi F, Maloney DG, Maris MB, Nieto Y, Edelstein CL, Schrier RW, McSweeney P. Acute renal failure after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. J Am Soc Nephrol 15, 1868-1876 (2004)

Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, Hansen JA The Significance of HLA-DRB1 Matching on Clinical Outcome after HLA-A, B, DR Identical Unrelated Donor Marrow Transplantation. Blood 86, 1606-1613 (1995)

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)

Pineda AA, Vamvakas EC, Gorden LD, Winter JL, Moore SB Trends in the incidence of delayed hemolytic and delayed serologic transfusion reactions. Transfusion 39, 1097-1103 (1999)

Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJHM, Tibbe GJM, Wijkhuijs AJM, de Haas V, Rovers E, van der Schoot CE, van Dongen JJM Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in the acute leukemia using junctional region specific TaqMan probes. Leukemia 12, 2006-2014 (1998)

Promeneur D, Rousselet G, Bankir L, Bailly P, Cartron JP, Ripoche P, Trinh-Trang-Tan MM Evidence for distinct vascular and tubular urea transporters in the rat kidney. J Am Soc Nephrol 7, 852-860 (1996)

Provenzano M, Rossi CR, Mocellin S The Usefulness of Quantitative Real-Time PCR in Immunogenetics. ASHI Quarterly 25, 89-91(2001)

Pulsipher MA, Woolfrey A Nonmyeloablative Transplantation in Children. Hem Onc Clin North Am 15, 809-34, vii-viii (2001)

Qiu WQ, de Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch JV Organization of the human and mouse low- affinity Fc gamma R genes: Duplication and Recombination. Science 248, 732-735 (1990)

Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, Vicario JL, Madero L Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. BMT 18, 1161-1165 (1996)

Roccazzello AM, Tringali G, Barbaro A, Cormaci P, Barbaro A, Insirello E Simultaneous estimation of a Y-specific fragment, an X-specific fragment and sex determination of forensic studies in real-time PCR. Forensic Sci Int 146, Suppl: S165-6 (2004)

Roux E, Helg C, Chapius B, Jeannet M, Roosnek E Mixed chimerism after bone marrow transplantation and the risk of relapse. Blood 84, 4385-4386 (1994)

Roy DC, Tantravahi R, Murray C, Dear K, Gorgone B, Anderson KC, Freedman AS, Nadler LM, Ritz J Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow : a stable equilibrium. Blood 75, 296-304 (1990)

Salido EC, Yen PH, Koprivnikar K, Yu LC, Shapiro LJ The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. Am J Hum Genet 50, 303-316 (1992)

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sicke cell anemia. Science 230, 1350-4 (1985)

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)

Senitzer D, Gaidulis MS Short Tandem Reapeat (STR) Analysis of Engraftment in Alligeneic Stem Cell Transplantation. ASHI Quarterly 25, 49-53 (2001)

Serrano J, Roman J, Sanchez J, Jimenez A, Castillejo JA, Herrera C, Gonzalez MG, Reina L, Rodriguez MdC, Alvarez MA, Moldonado J, Torres A Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210 BRC-ABL and p190 BRC-ABL after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190 BRC-ABL detection precede cytogenetic relapse. Blood 95, 2659-26585 (2000)

Shows TB, McAlpine PJ, Boucheix C, Collins FS, Conneally PM, Frezal J, Gershowitz H, Goodfellow PN, Hall JG, Issitt P, Jones CA, Knowles BB, Lewis M, McKusick VA, Meisler M, Morton NE, Rubenstein P, Schanfield MS, Schmickel RD, Skolnick MH, Spence MA, Sutherland GR, Traver M, Van Cong N, Willard HF. Guidelines for human gene nomenclature. Cytogenet Cell Genet 46, 11-28 (1987)

Sidoux-Walter F, Lucien N, Nissinen R, Sistonen P, Henry S, Moulds J, Cartron JP, Bailly P Molecular heterogeneity of the Jk-null phenotype : expression analysis of the Jk(S291P) mutations found in Finns. Blood 96, 1566-1573 (2000)

Szczepanski T, Orfao A, Velden VH van der, San Miguel JF, Dongen JJ van Minimal residual disease in leukemia patients. Lancet Incol 2; 409-417 (2001)

Sparkes MC, Christ ML, Sparkes LS, Gale RP, Feig SA Gene markers in human bone marrow transplantation. Vox Sang 33, 202-205 (1977)

Tabbara IA, Zimmermann K, Morgan C, Nahleh Z Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Arch Intern Med 162, 1558-1566 (2002)

Tamura S, Saheki K, Takatsuka H, Wada H, Fujimori Y, Okamoto T, Takemoto Y, Hashimoto-Tamaoki T, Furuyama JI, Kakishita E Early detection of relapse and evaluation of treatment for mixed chimerism using fluorescence in situ hybridization following allogeneic hematopoietic cell transplant for haematological malignancies. Ann Hematol 79, 622-626 (2000)

Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. Nat Genet 10, 224-228 (1995)

Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartron J-P, Colin Y Molecular Basis and PCR-DNA typing of the Fy^a/Fy^b blood group polymorphism. Hum Genet 95, 407-410 (1995)

Wallace DC, Lott MT, Brown MD, Houponen K, Torroni A Report of the committee on human mitochondrial DNA. In: Human Gene Mapping 1995: a Compendium (ed. By A.J. Cuticchia), Johns Hopkins University Press, Baltimore, 910-954 (1995)

Witherspoon RP, Schanfield MS, Storb R, Thomas ED, Giblett ER Immunoglobulin production of donor origin after marrow transplantation for acute leukemia or aplastic anemia. Transplantation 26, 407-408 (1978)

Xu Y, Olives B, Bailly P, Fischer E, Ripoche P, Ronco P, Cartron JP, Rondeau E Endothelial cells of the kidney vasa recta express the urea transporter HUT11. Kidney Int 51, 138-146 (1997)

Zinkernagel RM, Doherty PC Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 19, 701-702 (1974)

11 Anhang

11.1 Primer

11.1.1 HLA-DRB1 Primer

Die Namen der Primer leiten sich von der Aminosäure und ihrer Position in der β-Kette ab, auf deren Codon im Exon 2 der Primer mit seiner freien 3'-Hydroxy-Gruppe endet. Der Primer 14 K endet also im Codon für Lysin in Position 14 der DR-β-Kette.

Tab. 11.1: Sequenzen der Primer für die HLA-DRB1-Typisierung

Primer	**Basensequenz**	**HLA-Merkmal**
Allelspezifische Primer		
13F, DR 9	5'-CGT TTC TTG AAG CAG GAT AAG TT-3'	DRB1*09
28DR9	5'-AGC GGG TGC GGT ATC TGC A-3'	DRB1*09
DR13F	5'-GTT TCT TGT GGC AGC TTA AGT T-3'	DRB1*01
DR13S	5'-GTT TCT TGG AGT ACT CTA CGT C-3'	DRB1*03,*11,*15
DR13H	5'-CGT TCC TTG GAG CAG GTT AAA C-3'	DRB1*04
DR13G	5'-GTT TCT TGG AGT ACT CTA CGG-3'	DRB1*08
DR13R	5'-GTT TCC TGT GGC AGC CTA AGA-3'	DRB1*15
DR71A	5'-TCC ACC GCG GCC CGC G-3'	DRB1*15
DR14K	5'-TCC TGT GGC AGG GTA AGT ATA-3'	DRB1*07
Konsensus-Primer		
RP 87 E	5'-GCT GCA CTG TGA AGC TCT C-3'	

11.1.2 HVR1-Region Primer

Die Namen der Primer leiten sich von der komplementären Einzelstrang-DNA, an die sie hybridisieren können, ab:

- HVR1 VP1cons und HVR RP1cons sind die Primer, die für die Sequenzierung der gesamten, 244bp umfassenden HVR1 Region benutzt wurden.
- HVR1 VP X Buchstabe bzw. HVR1 RP X Buchstabe sind jeweils allelspezifische Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, die für die gefundenen Punktmutationen der HVR-Regionen, die sequenziert wurden, generiert worden sind.
- HGH I/II = Primer für das humane Wachstumshormon-Gen

Tab. 11.2: Sequenzen der Primer für die HVR1-Typisierungen*: die unter PCR-Programm stehenden Ziffern beziehen sich auf die siehe Anhang 9.2.1 aufgeführten unterschiedlichen Termperatur-Protokolle.*

Name	Basensequenz	PCR-Programm
HVR1-Allelspezifische Vorwärtsprimer		
HVR1VP1 cons	5'-TGC CAG CCA CCA TGA ATA TTG-3'	
HVR1VP2C	5'-CAC ATC AAA ACC CCC TCC C-3'	1, 2, 3,4
HVR1VP2T	5'-CAC ATC AAA ACC CCC TCC T-3'	1,2,3
HVR1VP2G	5'-CAC ATC AAA ACC CCC TCC G-3'	2,4
HVR1VP4A	5'-ACT TGA CCA CCT GTA GTA CAT AA-3'	1,2
HVR1VP4G	5'-CTT GAC CAC CTG TAG TAC ATA G-3'	1,2
HVR1VP22T	5'-GCC AGC CAC CAT GAA TAT TGT-3'	
HVR1VP22C	5'-GCC AGC CAC CAT GAA TAT TGC-3'	1,2
HVR1VP120C	5'-CAA GTA CAG CAA TCA ACC CC-3'	3
HVR1VP120T	5'-CAA GTA CAG CAA TCA ACC CT-3'	2,3
HVR1VP42T	5'-GTA CGG TAC CAT AAA TAC TTG T-3'	4
HVR1VP42A	5'-GTA CGG TAC CAT AAA TAC TTG A-3'	4
HVR1VP115A	5'-TAC AAG CAA GTA CAG CAA TCA-3'	4
HVR1VP115G	5'-ACA AGC AAG TAC AGC AAT CG-3'	4
HVR1-Allelspezifische Rückwärtsprimer		
HVR1RP1 cons	5'-GAC TGT AAT GTG CTA TGT ACG-3'	
HVR1RP2C	5'-CTA TGT ACT GTT AAG GGT GG-3'	4

HVR1RP2T	5’-CTA TGT ACT GTT AAG GGT GA-3’	4
HVR1RP3C	5’-TAC TAT GTA CTG TTA AGG GTG G-3’	3,4
HVR1RP3T	5’-GTA CTA TGT ACT GTT AAG GGT GA-3’	4
HVR1RP4C	5’-GGT AGG TTT GTT GGT ATC CTA G-3’	1,2
HVR1RP4T	5’-GGT AGG TTT GTT GGT ATC CTA-3’	1,2,3
HVR1RP5C	5’-GTA CGG TAA ATG GCT TTA TGT G-3’	1,2,4
HVR1RP5T	5’-GTA CGG TAA ATG GCT TTA TGT A-3’	1,2
HVR1RP189A	5’-TGT ACT ATG TAC TGT TAA GGA T-3’	4
HVR1RP189G	5’-GTA CTA TGT ACT GTT AAG GGC-3’	4
HGH-Primer		
HGH I	5’-CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A-3’	Interne Positivkontrolle
HGH II	5’-ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C-3’	

11.1.3 Primer-Sequenzen für die Duffy- und Kidd-Blutgruppen-, die FCγRIIIb-Typisierung und das Amelogenin-Gen

Die Namen der Primer bezeichnen den jeweiligen Polymorphismus, der durch allelspezifische Primer und einen jeweils gruppenspezifischen Primer unterschieden wird.

Tab. 11.3: Sequenzen der Primer für die Duffy- und Kidd-Blutgruppen- sowie der FCγRIIIb-Typisierung

Name	**Basensequenz**
HNA-1a/HNA-1b - Primer:	
NA1-spez.	5'-CAG TGG TTT CAC AAT GTG AA-3'
NA2-spez.	5'-CAA TGG TAC AGC GTG CTT-3'
NA-cons	5'-ATG GAC TTC TAG CTG CAC-3'
Duffyblutgruppen-Primer	
FYA	5'-TTC CCA GAT GGA GAC TAT GG -3'
FYB	5'-TTC CCA GAT GGA GAC TAT GA-3'
FY RP cons	5'- ACA ATG CTG AAG AGG GCA CT-3'
Kiddblutgruppen-Primer	
JKA	5'-TCT TTC AGC CCC ATT TGA GG-3'
JKB	5'-TCT TTC AGC CCC ATT TGA GA-3'
JK RP cons	5'-TCA CCA CAG CCA AGA GCC A-3'
Amelogenin-Gen-Primer	
AMG-3b	5'- CTT CCC AGT TTA AGC TCT GAT- 3'
AMG-4b	5'- CTT GCT CAT ATT ATA CTT GAC AAA -3'

11.2 PCR-Programme

11.2.1 PCR-SSP Temperaturprotokolle für HVR1- Typisierungen

Programm 1	**Programm 2**
• 95°C, 10 min • 95°C, 30 sec 65°C, 1 min } 10 Zyklen • 95°C, 30 sec 61°C, 50 sec 72°C, 40 sec } 30 Zyklen	• 95°C, 10 min • 95°C, 30 sec 65°C, 30 sec 72°C, 30 sec } 10 Zyklen • 95°C, 30 sec 63°C, 30 sec 72°C, 30 sec } 30 Zyklen
Programm 3	**Programm 4**
• 95°C, 10 min • 95°C, 30 sec 65°C, 30 sec 72°C, 30 sec } 10 Zyklen • 95°C, 30 sec 62°C, 30 sec 72°C, 30 sec } 30 Zyklen	• 95°C, 10 min • 95°C, 30 sec 62°C, 30 sec 72°C, 30 sec } 10 Zyklen • 95°C, 30 sec 59°C, 30 sec 72°C, 30 sec } 30 Zyklen

11.2.2 Temperaturprotokolle für die sonstigen Genorte

1) Programm für Fcγ-RIIIb	**2) Programm für Amelogenin-Gen**
• 96°C, 10 min • 95°C, 30 sec 57°C, 60 sec } 35 Zyklen 72°C, 30 sec • 72°C, 5 min	• 96°C, 10 min • 95°C, 30 sec 57°C, 30 sec } 35 Zyklen 72°C, 30 sec • 72°C, 5 min
3) Programm für JK A und FY A	**4) Programm für JK B und FY B**
• 95°C, 10 min • 95°C, 30 sec 64°C, 30 sec } 10 Zyklen 72°C, 30 sec • 95°C, 30 sec 61°C, 30 sec } 20 Zyklen 72°C, 30 sec	• 95°C, 10 min • 95°C, 30 sec 62°C, 30 sec } 10 Zyklen 72°C, 30 sec • 95°C, 30 sec 59°C, 30 sec } 20 Zyklen 72°C, 30 sec

11.2.3 LightCycler Programme

Es ergaben sich teilweise geringfügige Abweichungen bezüglich der Denaturierungs-Zeit und Annealing-Temperatur bei den PCR-Programmen für FYA, JKA und JKB. Diese sind in der Tabelle kursiv gekennzeichnet.

PHASEN	**SEG.**	**HVR1**	**HLA-DRB1 (Abb.5.3)**	**HLA-DRB1 (Abb.5.2)**	**FYA**	**FYB**	**JK A**	**JK B**	**NA 1**	**NA 2**
Denaturierung		95°C 10 min	95°C 9 min	95°C 7min	95° C 11 min	95° C 10 min	95° C *8 bzw.* 11 min	95° C *10 bzw.* 11 min	95° C 11 min	95° C 11 min
Amplifizierung	1.	95 ° C 0 sec								
	2.	*66°C 5 sec*	*65°C 5 sec*	*62°C 7 sec*	*67° bzw.* 69° C 7 sec	64° C 7 sec	70° C 5 sec	65° C 5 sec	62° C 7 sec	62° C 7 sec
	3.	72°C 10 sec								
Zyklen		38	50	50	45	45	40	40	50	45
Schmelzkurve		10 sec bei 65°C, dann kontinuierliche Erwärmung auf 95 °C, 0,2°C/sec								
Abkühlung		40 °C 1 min								

11.3 Sequenzen

11.3.1 HLA-DRB1, Exon 2, Aminosäuresequenz 1-100

Die vollständige Sequenz für das HLA-DRB1-Gen kann unter der Gen-Datenbank unter www.ashi-hls.org/ eingesehen werden. Für die hier verwendete DRB1-Gen Polymorphismen sind insbesondere das HLA-DRB1, Exon 2 mit seinen ersten 100 Aminosäuren von Bedeutung.

11.3.2 mitochondriale HVR1- Region

Ausschnitt aus dem GenBank-Eintrag #NC_001807.3 [gi:13959823], Position 16081-16569; die HVR1-Region (unterstrichen) liegt in der Position 16105-16348

```
16081 accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataaat
16141 acttgaccac ctgtagtaca taaaaaccca atccacatca aaacccctc cccatgctta
16201 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc
16261 cctcacccac taggatacca acaaacctac ccacccttaa cagtacatag tacataaagc
16321 catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtccccatgg atgacccccc
16381 tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgct
16441 actctcctcg ctccgggccc ataacacttg ggggtagcta aagtgaactg tatccgacat
16501 ctggttccta cttcagggtc ataaagccta aatagcccac acgttccccc taaataagac
16561 atcacgatg
```

11.3.3 Fcγ RIII-1-Gen

Ausschnitt aus GenBank-Eintrag X16863 [gi:31321], Position 1-360; Die Amplifikationsprodukte betragen jeweils für HNA-1a 141bp und für HNA-1b 219 bp.

Vorwärtsprimer: NA1-spez. und NA2-spez.; Rückwärtsprimer: NAcons

```
   1 tctttggtga cttgtccact ccagtgtggc atcatgtggc agctgctcct cccaactgct
  61 ctgctacttc tagtttcagc tggcatgcgg actgaagatc tcccaaaggc tgtggtgttc
 121 ctggagcctc aatggtacag cgtgcttgag aaggacagtg tgactctgaa gtgccaggga
 181 gcctactccc ctgaggacaa ttccacacag tggtttcaca atgagagcct catctcaagc
 241 caggcctcga gctacttcat tgacgctgcc acagtcaacg acagtggaga gtacaggtgc
 301 cagacaaacc tctccaccct cagtgacccg gtgcagctag aagtccatat cggctggctg
```

11.3.4 FYA-/ FYB-Polymorphismus

Ausschnitt aus dem GenBank-Eintrag X85785. [gi:929624], Position 1021-1380

Das Kästchen markiert den FYA- / FYB-Polymorphismus. Primer sind fett markiert.

```
1021 tcaactgaga actcaagtca gctggacttc gaagatgtat ggaattcttc ctatggtgtg
1081 aatgattcct tcccagatgg agactatgat gccaacctgg aagcagctgc cccctgccac
1141 tcctgtaacc tgctggatga ctctgcactg cccttcttca tcctcaccag tgtcctgggt
1201 atcctagcta gcagcactgt cctcttcatg cttttcagac ctctcttccg ctggcagctc
1261 tgccctggct ggcctgtcct ggcacagctg gctgtgggca gtgccctctt cagcattgtg
1321 gtgcccgtct tggccccagg gctaggtagc actcgcagct ctgccctgtg tagcctgggc
```

11.3.5 JKA-/ JKB-Polymorphismus

Auschnitt aus dem GenBank-Eintrag NT_028380.5 [GI:18589591], Position 14940- 15480
Exon 7 und 8 sind fett markiert. Das Kästchen markiert den JKA-/ JKB-Polymorphismus. Die Primer sind unterstrichen.

```
14941 gcctcatttt tcttaaattt cttttgcagt tgttgaaatc tataccagtg ggagttggtc
15001 agatctatgg ctgtgataat ccatggacag ggggcatttt cctgggagcc atcctactct
15061 cctccccact catgtgcctg catgctgcca taggatcatt gctgggcata gcagcgggtg
15121 agcacaagag cccttaccaa atattgagca cctcctccat cccatgcatt gcctcaggca
15181 tcttctgtgc tccagatctt ccttgagatc ttggcttcct agggaccaat gggagttccc
15241 gggatgcttc ctgctaactt tcaatcccac cctcagtttc cttccagaac atcctgcctt
15301 tagtcctgag ttctgacccc tcctgtctta acaggactca gtctttcagc cccatttgag
15361 gacatctact ttggactctg gggtttcaac agctctctgg cctgcattgc aatgggagga
15421 atgttcatgg cgctcacctg gcaaacccac ctcctggctc ttggctgtgg tgagtctccc
  ...
```

11.3.6 Amelogenin-Gen

Chromosome Xp22.31-p22.1.

Ausschnitt aus dem GenBank-Eintrag M55418.[gi:178526], Position 361-960

```
361 cctaccacca gcttcccagt ttaagctctg atggttggcc tcaagcctgt gtcgtcccag
421 cagcctcccg cctggccact ctgactcagt ctgtcctcct aaatatggcc gtaagcttac
481 ccatcatgaa ccactactca gggaggctcc atgatagggc aaaaagtaaa ctctgaccag
541 cttggttcta acccagctag taaaatgtaa ggattaggta agatgttatt taaaactctt
601 tccagctcaa aaaactcctg attctaagat agtcacactc tatgtgtgtc tcttgcttgc
661 ctctgctgaa atattagtga ctaagtggta taggagagac tccgcagaac agcggaatgc
721 atgagttttg gacgtcgggt ttgaggttct cctcaacctc ttactaactt tgtgattttg
781 ggcaaatcat ttcctctttc tggaaccctg gtttcctcat ctggagaaag gaaataatta
841 taataaccat atttcaaaat attgtttgga gagtaatata gttaatgaat atgaaaagtg
901 ctttgtcaag tataatatga gcaaggttac tgattatttt ttgtatcgat taaatgccgt
```

Chromosome Yq11

Ausschnitt aus dem GenBank Eintrag M55419 [gi:178524], Position 361-780

```
361 acagttccta ccatcagctt cccagtttaa gctctgatgg ttggcctcaa gcctgtgttg
421 ctccagcacc ctcctgcctg accattcgga ttgactcttt cctcctaaat atggctgtaa
481 gtttattcat tcatgaacca ctgctcagga aggttccatg aaagggcaaa aagtcaactc
541 tgactgacca gcttggttct atcccatccg gtaaaatgta aagattaggt aaaattacta
601 actttgggca aataatttcc tctctttgga accctggttt tctcatttgg acaagggaaa
661 ttactgtaat attcacattt caaaatattg gagaataata tagttaacaa ttataaaaac
721 tgctttgtca agtataatat gagcaaggta actgattttt tattgattac atcgtgtatt
```

11.4 Nukleinsäuren-Datenbank

Molecular Biology Databases des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg)

mtDNA database: http://www.gen.emory.edu/mitomap.html

http://www.mitomap.org/mitomap/mitoseq.html

www.ashi-hls.org/

11.5 Tabellarische Darstellung von Ergebnissen

11.5.1 Tabellarische Darstellung der HLA-DRB1-Merkmale der Sensitivitätsstudie

Tab. 11.3: Tabellarische Darstellung der Typisierungen für HLA-DRB1-Merkmale

Proband	HLA-DRB1-Merkmale	Proband	HLA-DRB1-Merkmale
A	DRB1*09,13	F	DRB1*01,07
B	DRB1*04,15	G	DRB1*14,15
C	DRB1*01,03	I	DRB1*03,11
D	DRB1*07,08	J	DRB1*07,13
E	DRB1*01,13		

11.5.2 Sequenzen des HVR1- Alignment der Sensitivitätsstudie

Hier sind die Cambridge-Referenzsequenz und die Sequenzen mit jeweiligen Polymorphismen der untersuchten Personen abgebildet.

```
                *        20         *        40         *        60
HVR1 : tgccagccaccatgaatattgtacggtaccataaatacttgaccacctgtagtacataaaa :  61
A    : ......................C.....................................G.. :  61
B    : ............................................................... :  61
C    : ............................................................... :  61
D    : ............................................................... :  61
E    : ............................................................... :  61
F    : ............................................................... :  61
G    : ........................................T...................... :  61
H    : ............................................................... :  61
I    : ............................................................... :  61
J    : ............................................................... :  61

               *        80         *       100         *       120
HVR1 : acccaatccacatcaaaacccccctccccatgcttacaagcaagtacagcaatcaaccctca : 122
A    : ......................T..C..................................... : 122
B    : ............................T..................................... : 122
C    : ............................................................... : 122
D    : ...............................................................C.. : 122
E    : ............................G..................................... : 122
F    : ..........T.............................................G....... : 122
G    : ............................................................... : 122
H    : ............................................................... : 122
I    : ............................................................... : 122
J    : ............................................................... : 122

              *       140         *       160         *       180
HVR1 : actatcacacatcaactgcaactccaaagccacccctcacccactaggataccaacaaacc : 183
A    : ............................................................... : 183
B    : ...............................T.............T................. : 183
C    : ............................................................... : 183
D    : ............................................................... : 183
E    : ............................................................... : 183
F    : ............................................................... : 183
G    : ............................................................... : 183
H    : ........G...................................................... : 183
I    : ............................................................... : 183
J    : ............................................................... : 183

             *       200         *       220         *       240
HVR1 : tacccacccttaacagtacatagtacataaagccatttaccgtacatagcacattacagtc : 244
A    : ......T....................................................... : 244
B    : ...T.......................................................... : 244
C    : ............................................................... : 244
D    : ........................C...................................... : 244
E    : ........................C...................................... : 244
F    : ............................................................... : 244
G    : .....G........................................................ : 244
H    : ...T.......................................................... : 244
I    : ............................................................... : 244
J    : ............................................................... : 244
```

11.5.3 Tabellarische Darstellung aller acht untersuchten Transplantationspaare mit den unterschiedlichen Genorten:

Paar		Blutproben nach KMT	XY-PCR	HNA-1a	HNA1-b	FYA	FYB	JKA	JKB
1	Empfänger	vor KMT		neg	pos	pos	pos	pos	pos
	Spender	vor KMT		pos	neg	pos	pos	pos	neg
	Empfänger	Tag +36		pos	neg				neg
	Empfänger	Tag + 60							
	Empfänger	Tag + 67		pos	neg				neg
	Empfänger	Tag + 75		pos	neg				neg
	Empfänger	Tag + 82		pos	neg				
	Empfänger	Tag + 95		pos	neg				neg
	Empfänger	Tag + 119		pos	neg				neg
	Empfänger	Tag + 123		pos	neg				
	Empfänger	Tag + 218		pos	neg				
2	Empfänger	vor KMT	XY	neg	pos	neg	pos	neg	pos
	Spender	vor KMT	XX	neg	pos	pos	pos	pos	neg
	Empfänger	Tag + 26	XX			pos		pos	neg
	Empfänger	Tag + 118	XX					pos	neg
	Empfänger	Tag + 118						pos	neg
	Empfänger	Tag + 144						pos	neg
3	Empfänger	vor KMT	XX	pos	pos	neg	pos	pos	pos
	Spender	vor KMT	XY	pos	pos	neg	pos	neg	pos
	Empfänger	Tag + 16	XY					neg	
	Empfänger	Tag + 62	XY					neg	
4	Empfänger	vor KMT		pos	pos	pos	neg	pos	neg
	Spender	vor KMT		pos	pos	pos	pos	pos	neg
	Empfänger	Tag + 37					pos		
	Empfänger	Tag + 41					pos		
5	Empfänger	vor KMT	XX	neg.	pos.	pos.	pos	pos.	neg.
	Spender	vor KMT	XY	neg.	pos.	neg.	pos	neg.	pos.
	Empfänger	Tag + 125	XY	neg.	pos.	neg.	pos	neg.	pos.
6	Empfänger	vor KMT		pos	pos	pos	pos	pos	pos
	Spender	vor KMT		pos	pos	pos	pos	neg	pos
	Empfänger	Tag + 39						neg	
	Empfänger	Tag + 95						neg	
7	Empfänger	vor KMT		neg.	pos	neg	pos	pos	pos
	Spender	vor KMT		pos	pos	neg	pos	pos	neg
	Empfänger	Tag + 30		pos					
	Empfänger	Tag + 87		pos					neg
	Empfänger	Tag + 107							neg
8	Empfänger	vor KMT		pos	pos	pos	pos	pos	pos
	Spender	vor KMT		neg	pos	pos	pos	pos	pos
	Empfänger	Tag + 21		neg					
	Empfänger	Tag + 96		neg					

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Bux möchte ich mich für die interessante Themenstellung und die gute Zusammenarbeit herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Angelika Reil für die intensive Betreuung, die Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitstechniken und Abläufe, viele fruchtbare Gespräche, Anregungen und konstruktive Kritik, ohne die ein erfolgreicher Abschluß der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Gregor Bein, Leiter des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, für die angenehme Arbeitsatmosphäre am Institut und die Bereitstellung der Räumlichkeiten, Geräte und Materialien bedanken.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, insbesondere dem HLA-Labor, bedanke ich mich für die Einarbeitung in die PCR-Methoden und die Hilfsbereitschaft, bei aufkommenden Problemen und Fragen zu helfen. Mein besonderer Dank gilt insbesondere Frau Michaela Feigl für die Einarbeitung in den Sequenzierautomaten und Durchführung der STR-Diagnostik.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Alfred Reiter, Abteilungsdirektor des Instituts für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammmenarbeit zwischen den Instituten, Überlassung von Blutproben und Einblicke in die STR-Diagnostik bedanken.

Lebenslauf

Name	Cornelia Diening
Adresse	Lochnerstr.27 40878 Ratingen
Geburtsdatum	19.02.1978
Geburtsort	Koblenz

schulische Ausbildung

1984-1988	GGS Dörpfeldschule, Wermelskirchen
1988-1994	Städt. Gymnasium Wermelskirchen
1994-1997	Oberstufe auf dem Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Remscheid
1997	Abitur

universitäre Ausbildung

10/1997-11/2004	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig Universität Gießen
03/2000	Ärztliche Vorprüfung
03/2001	Erstes Staatsexamen
09/2003	Zweites Staatsexamen
11/2004	Drittes Staatsexamen

Ehrenamtliche Tätigkeiten

Seit WS 2000/01	ehrenamtliche Tätigkeiten in der Katholischen Hochschulgemeinde Gießen
SS 2001-SS 2003	Chorleiterin des Chores der Katholischen Hochschulgemeinde in Gießen

weitere Fähigkeiten und Hobbies

„Jugend Musiziert“	Bundeswettbewerb 1994, 1.Preis Blockflötenensemble Landeswettbewerb 1995, 1.Preis, Klavierbegleitung Landeswettbewerb 1996, 2. Preis, Klavier solo
Seit Frühjahr 2001	Doktorandin am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen
Seit 09/2005	Assistenzärztin für Innere Medizin am St.Marien-Krankenhaus Ratingen, CA Prof. Dr. Straub