

HLA-Typisierung

Vielfältige Testverfahren für komplexe Strukturen

Die Charakterisierung der HLA-Antigene ist eine essenzielle Voraussetzung für die Stammzell- und Organtransplantation. Zum Repertoire der Gewebetypisierung gehören heute serologische, zelluläre, biochemische und zunehmend auch molekulargenetische Methoden.

Wie unterscheidet unser Körper bei Transplantationen zwischen Selbst und Fremd? Und warum wendet sich sein Abwehrsystem bei Autoimmunkrankheiten irrtümlich gegen seine eigenen Zellen? Ursache ist eine spezielle Klasse von Erkennungsproteinen auf der Zelloberfläche, die vor gut 50 Jahren von George D. Snell, B. Benacerraf und J. Dausset entdeckt wurde. Dieser Histokompatibilitätskomplex (MHC = *Major Histocompatibility Complex*) heißt beim Menschen auch HLA (*Human Leucocyte Antigen*). Er trägt wesentlich zur Prägung des Immunsystems bei und ist damit auch für die Abstoßung körperfremder Gewebe verantwortlich. Aus den Untereinheiten des Komplexes entstehen nach dem Mosaikprinzip ganz individuelle Proteinstrukturen, die wie ein Fingerabdruck für eine bestimmte Person charakteristisch sind.

Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche Verfahren zur Charakterisierung der HLA-Moleküle und ihrer Gene entwickelt und eingesetzt. Serologische, zelluläre, biochemische und zunehmend auch molekulargenetische Methoden fanden Eingang in das Repertoire der Gewebetypisierung. Den verschiedenen methodischen Vorgehensweisen liegen unterschiedliche Erkennungs- und Nachweisprinzipien zugrunde, die die HLA-Komplexe aus zwei verschiedenen Blickwinkeln erfassen: Man kann sowohl die HLA-Moleküle selbst als auch die entsprechenden Gensequenzen analysieren. Dabei ergänzen sich beide In-

formationsquellen oft ideal, denn die eine sagt mehr über die Funktion, die andere mehr über die Struktur aus.

Die Indikation zur Histokompatibilitätstestung bestimmt die Auswahl der Untersuchungsmethode. Das Proteinmolekül erfasst man mit serologischen, zellulären und biochemischen Nachweisverfahren, die Sequenz kodierender und nicht-kodierender (regulatorischer) Genomabschnitte mit molekulargenetischen Methoden. Aus-

sagen zur Expressionsstärke an der Zelloberfläche sind nur über die serologischen und zellulären Verfahren möglich. Die molekulargenetischen Verfahren bestehen dagegen durch hohe Typisierungsqualität und ausgezeichnete Reproduzierbarkeit. Darüber hinaus scheinen im Gegensatz zur Serologie die Möglichkeiten der Molekularbiologie unendlich zu sein.

Die HLA-Typisierung lässt sich in vier Hauptindikationsbereiche unterteilen. Ne-

Das HLA-System in Fakten

Genlocus des HLA-Systems: kurzer Arm des Chromosoms 6 (6p21.1-6p21.3); Genabschnitt umfasst ca. 3.500 Kilobasenpaare und ist in drei Regionen unterteilt: telomerwärts die HLA-Klasse I-Gene, zentromerwärts die HLA-Klasse II-Gene und Klasse III-Region. In der Klasse III-Region sind z. B. die Gene für Komplementfaktoren, Tumornekrosefaktoren TNF- α , - β sowie Hitzeschockproteine HSP-70 und Steroid-21-Hydroxylasen lokalisiert.

HLA-Klasse-I-Gene:

Expression auf nahezu allen Zellen; Unterteilung in HLA-A, HLA-B, HLA-C sowie die funktionell aktiven Moleküle HLA-E, HLA-F und HLA-G.

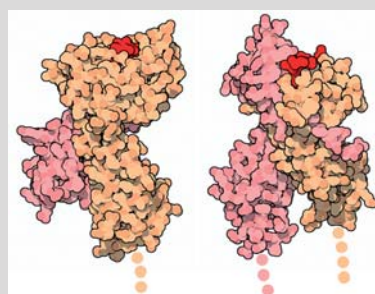
HLA-Klasse-II-Region:

stark polygen, Expression beschränkt auf B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten und HLA-Klasse-II-induzierbare Zellen (z. B. Monozyten, Kupfer'sche Sternzellen, dendritische Zellen); Unterteilung in

Subregionen wie HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP-Region und Genorte wie DMA, DMB, DOA und DOB.

HLA-Funktion und Struktur: HLA-Klasse I-Moleküle präsentieren intrazellulär synthetisierte Selbstpeptide und Fremdproteine (z. B. virale Proteine). Wichtigster Teil ist die Antigenbindungsstelle. Hierüber erkennt T-Lymphozytprozessierte Antigene. CD8-positive, zytotoxische T-Lymphozyten erkennen Antigene in

Verbindung mit MHC-Klasse-I-Molekülen. HLA-Klasse II-Moleküle präsentieren Peptide, die durch Degradation endogen oder exogen synthetisierter Proteine im Phagosom entstanden sind. CD4-positive T-Lymphozyten erkennenprozessierte Antigene nur in Verbindung mit MHC-Klasse II-Molekülen.



MHC-Klasse-I (li.) und MHC-Klasse-II-Proteinkomplexe (re.) bestehen aus zwei Untereinheiten (orange / rosa) und präsentieren Antigene (rot) für die T-Lymphozyten.

ben der Transplantation (Zell-, Gewebe-, Organ- und Stammzelltransplantation) und Transfusion (Thrombozytentransfusion) zählen Krankheitsassoziationen (Narkolepsie, M. Bechterew) und die Forensik z.B. zur Klärung von Paternitätsfragen zum Anwendungsspektrum.

Die klassische Variante

Das klassische Verfahren für die HLA-Typisierung ist die Serologie. Üblicherweise erfolgt hier der Nachweis der HLA-Klasse-I- oder HLA-Klasse-II-Spezifitäten mit einem komplementabhängigen Lymphozytotoxizitätstest. Bei diesem Nachweis wird durch die Reaktion der HLA-Antisera mit den korrespondierenden Antigenen auf der Membran der Zielzelle das zugegebene Komplement gebunden und die Zellmembran für den zugegebenen Farbstoff durchlässig – damit ist die Zelle „positiv“ markiert. Bei der HLA-Klasse-I-Typisierung werden in der Regel periphere Blutlymphozyten (PBL, besteht aus ca. 80% T-Lymphozyten und 10-15% B-Lymphozyten) verwendet. Da T-Lymphozyten keine Klasse-II-Moleküle exprimieren, werden für die HLA-Klasse-II-Typisierung B-Lymphozyten eingesetzt.

Die meisten HLA-Testseren sind polyklonal und bestehen aus einer Mischung von Antikörpern. Aufgrund der vielfältigen Epitope auf einem einzelnen HLA-Allel und der Tatsache, dass bestimmte Epitope gemeinsam auf verschiedenen HLA-Allelen vorkommen, treten bei der serologischen Testung Kreuzreaktivitäten auf.

Der molekulare Ansatz

Molekulargenetische Verfahren sind aufgrund der höheren Differenzierungsmöglichkeit und hoch reproduzierbaren Ergebnisse mittlerweile fester Bestandteil der Routinediagnostik. Derzeit werden verschiedene Verfahren eingesetzt, wo-

bei die Basis der molekulargenetischen Gewebetypisierung die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bildet. Bei der PCR-SSP (*Sequence Specific Primers*) werden sequenzspezifische Primer eingesetzt, die komplementär zur Zielsequenz des Allels sind. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt in der Regel gelelektrophoretisch. Die Differenzierung findet bereits bei der Amplifikation statt.

Die PCR-SSO/-SSOP (*Sequence Specific Oligonucleotide Probe*) differenziert einzelne Allele oder Allelgruppen nach der genortspezifischen Amplifikation durch die Hybridisierung mit sequenzspezifischen kurzen Sonden. Eine Hybridisierungsreaktion läuft nur dann ab, wenn Oligonukleotid und Zielsequenz zueinander komplementär sind. Der Reaktionsnachweis basiert in der Regel auf

HLA-SBT – durch Vielfalt inspiriert

Für die Bestimmung komplexer HLA-Merkmale ist eine hohe Auflösung essenziell. Sequenzierung ist daher der Goldstandard. Abbott Molecular vereinfacht jetzt Ihre hochauflösende HLA-Typisierung!

- AlleleSEQR Kits
- HARPs zur Auflösung von Ambiguitäten
- Assign SBT Software



Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden-Delkenheim
Tel. 06122/58-0, Fax -1244
info_molecular.de@abbott.com
www.abbottmolecular.com

HLA SSO Typing – Fast, Simple, Flexible



- ✓ 3 hours from sample to result
- ✓ fully automated
- ✓ 1 to 96 tests per run

HISTO SPOT® SSO test kits + MR.SPOT® processor
= the first automated system for on-call testing



BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich
Tel. 06404/925-0, Fax -250
info@bag-healthcare.com
www.bag-healthcare.com

Diagnosis in Transplantation

Serologische oder molekularbiologische HLA-Typisierung und HLA-Antikörperdiagnostik, manuell oder vollautomatisiert auf dem ELISA Prozessor Quickstep.

- HLA-Serologie (Lymphotype HLA, Lymphoscreen)
- HLA-SSP Typing Kits
- ELPHA SSO Typing Kits
- AbScreen, AbIdent, AbCross HLA ELISA



Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Dr. Daniel Czachurski
Industriestraße 1, 63303 Dreieich
Tel. 06103/801-95, Fax -724
daniel_czachurski@bio-rad.com
www.bio-rad.com/diagnostics

einer veränderten optischen Dichte und Farbumschlag oder bei der Verwendung von Chemilumineszenzfarbstoffen auf einer spezifischen Fluoreszenzemission. Da die Sonden auf Membranen oder für den Hochdurchsatz auf Chips immobilisiert werden können, lässt sich die Technik gut automatisieren und erfordert wenig DNA. Eine Variante ist die auf der Luminex-Technologie basierende Bead

Array-SSO. Bei diesem Verfahren sind die Sonden an kleine fluoreszenzmarkierte Kügelchen (Beads) gekoppelt. Binden die zu analysierenden HLA-PCR-Produkte an die spezifischen Sonden, wird durch den gebildeten Komplex eine spezifische Fluoreszenz emittiert.

Mit der PCT-SBT (*Sequence Based Typing*) ist der Nachweis von DNA-Sequenzen einzelner Allele bzw. Allelkom-

binationen möglich. Bei der SBT werden die jeweiligen Genbereiche zunächst mit der PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung ist die zuverlässigste Variante und erlaubt auch die Detektion bisher unbekannter Mutationen, wohingegen sich die SSO- sowie SSP-Techniken nur für die Analyse bekannter Sequenzen eignen. Sequenzierautomaten und entsprechende Auswertesoftware ermöglichen die Gewebetypisierung auch in größerem Probenumfang.

Ihr HLA-Partner in Deutschland

Für Ihre hochauflösenden Typisierungen:

- LABTYPE SSOHD (Klasse I, Exon 1-3/Klasse II, Exon 2)
- LABTYPE SSO Supplement (Klasse I, Exon 4-7)

Ergänzt Labtype Produkte und ersetzt die SBT-Methode.

Für Ihre Antikörperdiagnostik:

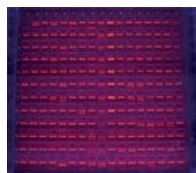
- LABScreenMixed – beinhaltet Klasse I, Klasse II, MICA-Screening, bietet eine schnelle Ja/Nein Antwort.
- LABScreenSingle Antigen – dieses Assay ist die einzigartige Lösung für die Problematik der High PRA Patienten.



BmT GmbH Labor-Produkte
Helga Pieper, GF&CEO
Alte Seilerei Haus 7A
Meerbuscher Straße 64-78
40670 Meerbusch-Osterath
Tel. 02159/6789-0, Fax -11
helga.pieper@bmt.de / www.bmt.de

Morgan™ HLA SSP EXpanded Typing Kits

- Auflösung von Locus-spezifischen Ambiguitäten für HLA-A, -B, -DR
- über 50% mehr Reaktionen/Test im Vergleich zu ABDR Typing Kit
- Detektion von Null-Allelen, z. B. A*01:04N, B*51:11N, DRB5*01:08N



Mast
Group



Mast Diagnostica GmbH
Edith Krines
Feldstraße 20, 23858 Reinfeld
Tel. 04533/2007-0
Fax 04533/2007-68
krines@mast-diagnostica.de
www.mastgrp.com

OLERUP

SSP-Kits vom Erfinder der PCR-SSP-Methode

- das umfangreichste und best eingeführte Portfolio an SSP®-Kits
- die kostenlose HELMBERG-SCORE™-Interpretations-Software mit Zugriff auf eine monatlich aktualisierte Olerup SSP-Kit- und Allel-Datenbank
- hochauflösende Typisierungsergebnisse auf dem jeweils aktuellsten Stand der HLA-Nomenklatur

Olerup GmbH
Ines Müller
Key Account Manager Deutschland
Löwengasse 47/6, A-1030 Wien
Tel. 0043 1/710 15 00-00, Fax -10
ines.mueller@olerup.com
www.olerup.com

Die serologische Kreuzprobe

Der Nachweis von HLA-Antikörpern im Serum von Patienten vor einer Organtransplantation, die mit den Lymphozyten des Spenders reagieren, kann zu einer Transplantatabstoßung führen. Diese Beobachtung hat zur Entwicklung einer differenzierten Alloantikörper- und serologischen Kreuzprobenanalytik geführt.

Nach der Vorauswahl gemäß der Blutgruppe und HLA-Kompatibilität wird bei der Organtransplantation, speziell bei der Nierentransplantation und bei der allogenen Blutstammzelltransplantation, eine serologische Kreuzprobe durchgeführt, um den Empfänger auf das Vorliegen von spenderspezifischen lymphozytotoxischen und HLA-Antikörpern zu untersuchen. Zur Antikörperdiagnostik stehen verschiedene Analyseverfahren wie die lymphozytotoxische Verträglichkeitsprobe, die Durchflusszytometrie, der ELISA u. ä. zur Verfügung. 🌸



Dr. med. Annette Buhlmann

Ärztliches Labor

Gesundheitspark 2, 66386 St. Ingbert
buhlmann@labor-dr-buhlmann.de