

Strategien zur HLA Typisierung mit Pyrosequencing™

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Patricia Entz
aus Berlin

Von der Fakultät III –Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing.-

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Roland Lauster
Berichter: Dr. rer.nat. Marion Nagy
Berichter: Prof. Ing. Ulf Stahl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12. Juli 2006

Berlin 2006
D 83

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	4
1.1 DAS HLA-SYSTEM	5
1.1.1 AUFGABEN DER HLA-MOLEKÜLE IM IMMUNSYSTEM	8
1.1.2 DIVERSITÄT DES MHC	9
1.1.3 DAS KOPPLUNGSUNGLEICHGEWICHT	11
1.2 KRANKHEITSASSOZIATIONEN	11
1.2.1 AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	12
1.2.2 SARKOIDOSE.....	13
1.2.3 ALOPECIA AREATA	14
1.3 HLA TYPISIERUNGSMETHODEN	15
1.3.1 SEROLOGISCHE TYPISIERUNG	16
1.3.2 BIOCHEMISCHE VERFAHREN	16
1.3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE VERFAHREN	17
1.4 DNA-SEQUENZIERUNG MIT PYROSEQUENCING™	20
1.4.1. ENZYMATISCHE REAKTIONSKASKADE.....	21
1.4.2 INSTRUMENTATION	23
1.5 AUFGABENSTELLUNG	24
2. MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 MATERIAL	25
2.1.1 GERÄTE	25
2.1.2 CHEMIKALIEN UND KITS	25
2.1.3 DNA-PROBEN.....	26
2.2 METHODEN.....	27
2.2.1 HAPLOPREP™	27
2.2.2 PCR-REAKTIONEN	29
2.2.3 GESAMTGENOM AMPLIFIKATION	30
2.2.4 PYROSEQUENCING™	31
2.2.5 HLA-TYPISIERUNGSMETHODEN	36
2.3 STATISTISCHE BERECHNUNGEN	37
3. ERGEBNISSE	41
3.1 HLA-DQB1-TYPISIERUNG.....	41
3.1.1 HLA-DQB1-PCR-BEDINGUNGEN	43
3.1.2 PYROSEQUENCING VON HLA-DQB1	46
3.2 HLA-DRB1-TYPISIERUNG	48
3.2.1 HLA-DRB1-PCR - ALLELGRUPPENSPEZIFISCHE AMPLIFIKATIONEN	51
3.2.2 PYROSEQUENCING VON HLA-DRB1	53
3.3 HLA-B-TYPISIERUNG.....	59
3.3.1 ERARBEITUNG DER TYPISIERUNGSSTRATEGIE.....	60
3.3.2 OPTIMIERTE PCR-BEDINGUNGEN FÜR HLA-B	63
3.3.3 PYROSEQUENCING-BEDINGUNGEN VON HLA-B	65
3.4 ANWENDUNGEN DER PYROSEQUENCING BASIERTEN TYPISIERUNGSSTRATEGIEN.....	67
3.4.1 HLA-DRB1 TYPISIERUNG VON FAMILIEN-TRIOS.....	67
3.4.2 FALL-KONTROLL-STUDIE “ALOPECIA AREATA”	70
3.4.3 HLA-B TYPISIERUNG DER RORO-PROBEN.....	73
3.4.4 ÜBERPRÜFUNG VON HAPLOTYPSPEZIFISCHEN EXTRAKTIONEN	74

4. DISKUSSION	75
4.1 SENSITIVITÄT DER METHODE	75
4.2 HLA-KLASSE II-TYPISIERUNG	77
4.3 HLA-KLASSE I-HLA-B	79
4.4 VERGLEICH MIT ANDEREN HLA-TYPISIERUNGSMETHODEN	81
5. ZUSAMMENFASSUNG	82
6. ANHANG	83
6.1 LINKS ZU WEBSEITEN	83
6.2 ABKÜRZUNGEN	83
6.3 LITERATURVERZEICHNIS	85
6.4 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	89
6.4.1 ARTIKEL.....	89
6.4.2 VORTRÄGE.....	90
6.4.3 POSTER.....	90
6.5 SEQUENZÜBERSICHTEN	90
6.5.1 HÄUFIG VORKOMMENDE HLA-DQB1 ALLELE.....	91
6.5.2 HÄUFIG VORKOMMENDE HLA-DRB1-ALLELE.....	95
6.5.3 HÄUFIG VORKOMMENDE HLA-B ALLELE.....	101
DANKSAGUNG	119
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	120

1. Einleitung

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) ist ein evolutionär sehr alter, zusammenhängender Abschnitt im Genom der Säugetiere. Er besteht aus einer Reihe gekoppelter Genloci. Die dort kodierten Proteine, die Leukozytenantigene sind an wichtigen Funktionen des Immunsystems beteiligt – der Unterscheidung von körpereigenen von körperfremden Proteinen und dem Auslösen einer Immunantwort. Den MHC des Menschen bezeichnet man auch als HLA (human leucocyte antigen)-System. Diese Zelloberflächenproteine spielen eine wichtige Rolle bei der T-Zell Erkennung. Bei der Transplantation sind sie für eine eventuelle Abstoßungsreaktion verantwortlich. Die Gene des MHC sind darüber hinaus mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert, mehr als jede andere Region im humanen Genom. Spezifische Allele sind assoziiert mit Krankheiten wie zum Beispiel Typ I Diabetes, Narkolepsie, Psoriasis und rheumatische Arthritis. In vielen anderen Fällen dienen HLA Moleküle aber auch als Marker, die bestimmte Risikohaplotypen kennzeichnen können. Viele der HLA Gene sind hochpolymorph, wodurch sie auch für die forensische Anwendung, z.B. in komplizierten Abstammungsbegutachtungen interessant sind. Daher ist die effiziente und verlässliche HLA-Typisierung ein wichtiges Werkzeug in der Diagnostik und Forschung.

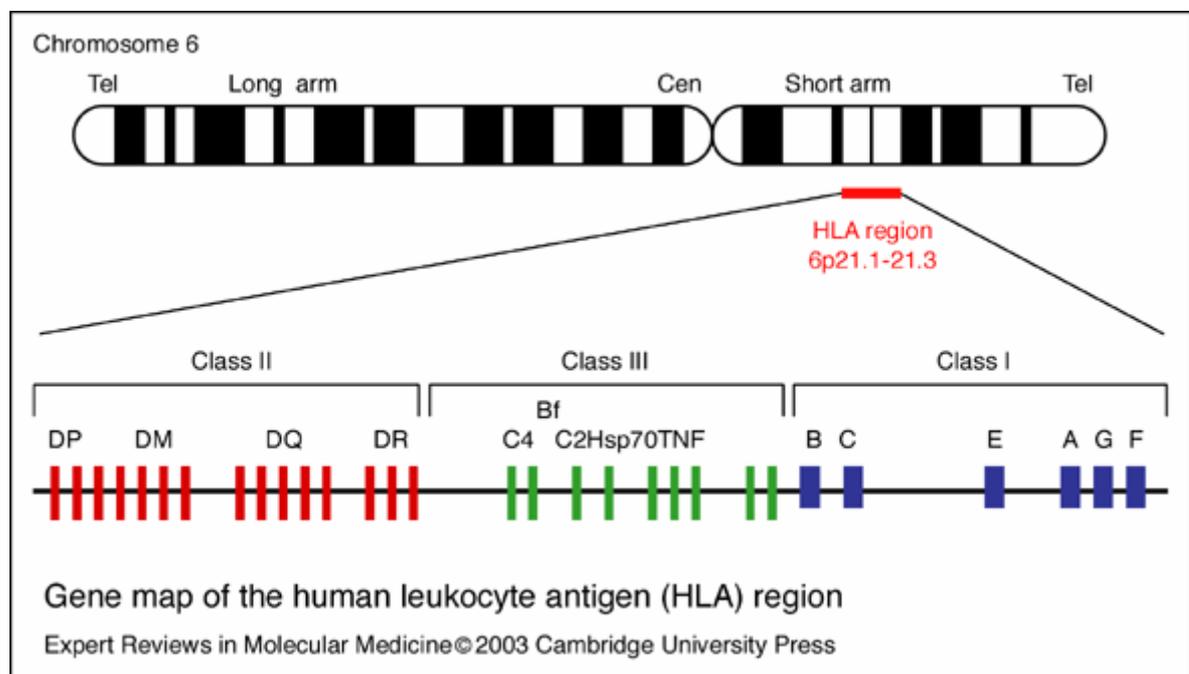


Abb. 1.1 – Schematische Übersicht über die HLA-Region auf dem kurzen Arm des Chromosom 6

Pyrosequencing™ ist eine relativ neue Methode zur DNA-Sequenzierung. Der Vorteil des Pyrosequencings gegenüber der konventionellen DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruch-Prinzip liegt in ihrer Schnelligkeit, vor allem bei der Analyse kurzer Sequenzabschnitte. Auch die Auflösung heterozygoter Positionen ist häufig besser gewährleistet. Die Methode eignet sich zur Automatisierung und zum Einsatz in der Hochdurchsatz-orientierten Genotypisierung.

In der Arbeit wurden Strategien entwickelt, wie die Anwendung der Pyrosequencing-Technologie als neue Alternative bzw. Ergänzung zu bestehenden HLA-Typisierungsmethoden genutzt werden kann.

1.1 Das HLA-System

Versuche der Menschen Gewebe, Haut oder Organe zu verpflanzen wurden schon vor langer Zeit vorgenommen. So wird beispielsweise berichtet, dass im 3. Jahrhundert die katholischen Schutzpatrone der Pharmazie, St. Cosmos und St. Damian ein Bein eines verstorbenen schwarzen Mannes auf einen weißen Mann verpflanzt hätten. Im 17. Jahrhundert gab es Versuche, zerstörte menschliche Haut durch tierisches Gewebe zu ersetzen. Im 19. Jahrhundert fanden dokumentierte Versuche von Hauttransplantationen statt. 1902 versuchte sich der Chirurg Emerich Ullmann in Wien an einer Nierentransplantation im Tierversuch. Er transplantierte eine Niere in den Nackenbereich eines Hundes und führte den Harnleiter über der Haut entlang, um die Harnproduktion dokumentieren zu können. Die Niere soll so 5 Tage lang gearbeitet haben. Nach mehreren wenig erfolgreichen Versuchen von Nierentransplantationen vom Tier auf den Menschen bzw. zwischen Menschen in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts, gelang die erste erfolgreiche Organverpflanzung am Menschen 1954 in Boston durch Dr. Joseph Murray. Die Nierentransplantation erfolgte zwischen eineiigen Zwillingen, also zwischen Menschen mit identischen Gewebemerkmale.

Dausset beschrieb 1958 das erste Leukozyten Antigen "MAC", später benannt mit HLA-A2. Dies wird in der Literatur oft als die „Entdeckung des HLA-Systems“ bezeichnet. Diese Forschungserfolge erbrachten nun auch eine wissenschaftliche Erklärung, warum die meisten Transplantationsversuche bis dato tragisch enden mussten. 1980 erhielten Benaerraf, Dausset und Snell den Nobelpreis für Medizin für ihre Forschungen zu genetisch determinierten Strukturen auf der Zelloberfläche, die die immunologischen Reaktionen regulieren.

Im Jahre 1964 fand der erste Workshop der International Histocompatibility Working Group (IHWG) statt, bei dem unter anderem das erste gemeinsame Gewebegruppensystem erstellt wurde, das die verschiedenen Modelle zur Beschreibung der Antikörper wie „Hu-1“ (Dausset, Ivanyi), „LA“ (Payne, Bodmer) und „Four“ (van Rood) zusammenbrachte und welches später den Namen „HLA“ bekam (Quelle: <http://www.ihwg.org/history/history.htm>). In diesem Rahmen wurden die Erkenntnisse rund um den MHC bzw. das HLA-System von Wissenschaftlern aus aller Welt zusammengetragen. Bis heute wird dieser Wissensstand um HLA-Genorte, -Allele und Typisierungstechniken ständig erweitert. Eine vereinheitlichte Nomenklatur wird durch das Nomenclature Committee IHWG festgelegt und neue Allele danach benannt. Die Allele der HLA-Loci werden in einer Datenbank (Zugriff z.B. über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mhc/MHC.cgi?cmd=init>) zusammengetragen und regelmäßig auf den neuesten Stand gebracht.

Mit Hilfe der spezifischen HLA-Merkmale unterscheidet das Immunsystem zwischen fremdem Gewebe und eigenem. Fremdes wird vom Immunsystem abgestoßen, eine gesunde Fähigkeit des Körpers, sich gegen Angreifer von außen zur Wehr zu setzen. Negative Auswirkungen können aber im Falle von Transplantationen oder aber bei Autoimmunerkrankungen eintreten, wenn diese Fähigkeit sich gegen den eigenen Körper, bzw. gegen transplantiertes Gewebe richtet. Die MHC-Region des Menschen ist ca. 3800 kb lang. Die HLA-Genorte befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 in der zentromer nahen Region 6p21. Die Gene werden in drei funktionelle Klassen, welche auch den jeweiligen Subregionen entsprechen, eingeteilt:

- Klasse I mit den Loci HLA-A, -B und -C, die klassischen „Transplantationsantigene“. Der Organismus des Empfängers erkennt von ihm abweichende HLA-Antigenstrukturen des Spender-Organs. Diese Klasse-I-Proteine sind auf jeder Zelle eines Säugetieres vorhanden. Innerhalb des Immunsystems ist ihre Anwesenheit auf der Oberfläche von Killer-T-Zellen für die zelluläre Immunität erforderlich. Die Klasse I Subregion enthält auch die Gene, welche für die nicht-klassischen Klasse I Moleküle HLA-E, -F und -G kodieren. HLA-E und -F werden ebenfalls in den meisten Geweben exprimiert. HLA-G dagegen wurde bisher nur auf Cythrophoblasten der Plazenta, mononuklearen Phagozyten und embryonalen Zellen gefunden.
-

- Klasse II, auch als HLA-D bezeichnet, mit den Loci DR, DQ, DZ/DO und DP. Die entsprechenden Proteine findet man auf der Zelloberfläche von B-Zellen, in aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen sowie auf Makrophagen. Diese Proteine wirken an der für die Immunantwort notwendigen Zellkommunikation mit und sind insbesondere für die Funktion der Helfer-T-Zellen erforderlich. In der Klasse II Subregion sind noch weitere Gene kodiert, die in der Prozessierung und beim Transport von Antigenen eine Rolle spielen, wie LMP2, LMP7, TAP1 und TAP2. Außerdem befindet sich in diesem Abschnitt auch das Gen für das HLA-DM Heterodimer, welches an der Beladung von Peptiden auf HLA Klasse II Moleküle beteiligt ist.
- Klasse III, kodieren die so genannten Komplementproteine. Ihre Loci werden auch als S-Region bezeichnet. Sie sind beteiligt an der Lyse von Fremdzellen bei der humoralen Immunantwort durch Wechselwirkungen mit Antigen-Antikörperkomplexen. Die Klasse III Subregion befindet sich zwischen den anderen beiden Abschnitten und beinhaltet die Gene für diverse Proteine wie den Tumornekrose Faktor (TNF) und Hitzeschock Proteine (HSP).

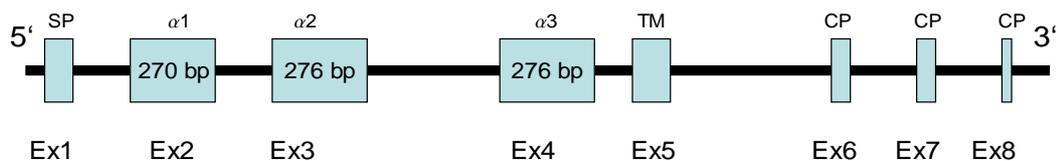


Abb. 1.2 - Struktur der HLA Klasse I Gene. SP: Signalpeptid, TM: Transmembrandomäne, CP: Cytoplasmatischer Teil. Die Polymorphismen sind überwiegend in den Exonen 2 und 3 lokalisiert, Exon 1 und die Exone 4-8 bestehen überwiegend aus konservierten Sequenzen.

Die Gene für die Klasse I verteilen sich über eine Region von mehr als 1700 kb. Daran schließt sich ein etwa 550 kb langer Bereich an, in dem sich die Klasse III Gene, wie z.B. die für $TNF\alpha$ und $TNF\beta$ befinden. Auf die Komplementgene folgen dann die der Klasse II (etwa 100 kb), in der Reihenfolge DR, DQ und DP (Abb.1.1).

Alle MHC-Proteine sind Dimere, sie sind in die Plasmamembran eingelagert und ragen in den extrazellulären Raum. MHC Klasse I und II-Antigene haben eine ähnliche

Struktur, aber bestehen aus anderen Komponenten. Die Klasse I Antigene bestehen aus einem Dimer der Klasse I Kette und einem β_2 -Microglobulin. Sie besitzen drei extrazelluläre Domänen. Im Exon 1 wird die Signalsequenz kodiert, welche für den Transport durch die Membran benötigt wird und im Anschluss daran abgespalten wird. Die Exone 2, 3 und 4 kodieren jeweils eine der drei extrazellulären Domänen, wobei das Exon 4 im Gegensatz zu den anderen beiden recht stark konserviert ist. Diese Domäne ist mit dem β_2 -Microglobulin in Interaktion. Die Transmembrandomäne wird vom Exon 5 kodiert, in Exon 6 und 7 befindet sich der Code für den cytoplasmatischen Teil des Proteins (Abb. 1.2). Klasse II Proteine bestehen aus zwei Ketten, α und β und bilden zwei extrazelluläre Domänen aus. Die Verteilung der Regionen ist ähnlich wie bei der Klasse I (Abb.1.3). Das Exon 1 enthält die 5' nicht-translatierte Region und die Leadersequenz für den Membrantransport. Exon 2 und 3 bilden die externe Domäne, wobei das Exon 2 den größten Teil der polymorphen Positionen beinhaltet. Das Exon 4 enthält die Transmembranregion und manchmal auch schon Teile der cytoplasmatischen Region, welche sonst noch von den Exonen 5 und 6 kodiert wird und schließlich auch noch der 3' nicht-translatierte Teil.

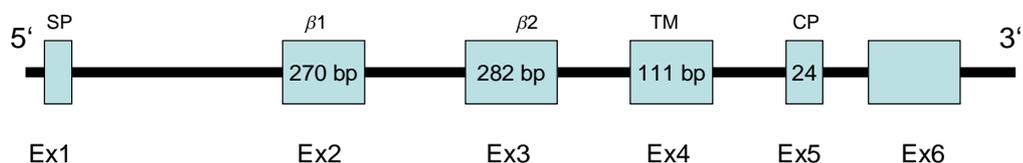


Abb. 1.3 - Struktur der HLA Klasse II Gene, hier der β -Kette. SP: Signalpeptid, TM: Transmembrandomäne, CP: Cytoplasmatischer Teil. Die Polymorphismen sind überwiegend im Exon 2 lokalisiert. Die anderen Exone bestehen überwiegend aus konservierten Sequenzen.

1.1.1 Aufgaben der HLA-Moleküle im Immunsystem

Bei der Immunabwehr von Pathogenen werden Fremdproteine in Peptide zerlegt und in den Peptidbindungsgruben der HLA-Moleküle gebunden. In diesen Furchen liegen die polymorphen Bereiche der MHC-Moleküle und bilden dort spezifische „Taschen“. Die konservierten Bereiche bilden einerseits das Gerüst, bilden aber auch Anheftungspunkte für verbreitete Peptidmotive. Die Peptide in den Bindungsfurchen der Klasse II

Moleküle sind insgesamt länger und heterogener, als die der Klasse I Moleküle. Jedes MHC-Molekül kann so eine große und charakteristische Auswahl an Proteinen binden. Die HLA-Moleküle transportieren diese Peptide an die Zelloberfläche und präsentieren sie dort den T-Zellen. Es gibt zwei Klassen von T-Zellen, die sog. Helfer-T-Zellen, welche die Aktivität anderer an der Immunantwort beteiligter Zellen verstärken und die cytotoxischen T-Zellen, welche infizierte Zellen vernichten. Beide T-Zelltypen sind in der Lage die Peptide zu erkennen, die durch die Zerlegung der vollständigen Antigene innerhalb der Zelle entstanden sind. HLA-Klasse I Moleküle binden endogene Antigene (z.B. virale) und präsentieren sie den (CD8+) cytotoxischen T-Zellen. Die Klasse II Moleküle erfassen exogene Antigene (z.B. bakterielle Toxine) und präsentieren sie den (CD4+) Helfer-T-Zellen.

1.1.2 Diversität des MHC

Die MHC Loci sind in Menschen, Mäusen und vielen anderen Säugetieren hochgradig polymorph, die Heterozygotierate liegt normalerweise bei 80-90%. Die Diversität der Antigen-präsentierenden Abschnitte hat sich über zwei Mechanismen entwickelt, einmal durch eine Ansammlung von Punktmutationen über einen sehr langen Zeitraum (evolutionär sehr alter Genomabschnitt) und andererseits durch Genkonversion und Rekombinationen. Die Punktmutationen finden nur sehr selten statt und sind daher nicht von so großer Wichtigkeit für die hohe Zahl der Allele. Genkonversionen, Rekombination und Selektionsmechanismen scheinen die entscheidenden Faktoren für die hohe Diversifizierung der HLA-Genorte zu sein. Schaut man sich eine Sequenzübersicht eines HLA-Locus an, sieht man oft, dass die unterschiedlichen Allele aus verschiedenen Kombinationen der gleichen Motive bestehen. Diese Struktur scheint durch rekombinierte Segmente entstanden zu sein. Ein weiterer Punkt, der die Entstehung und vor allem Erhaltung der hohen Alleldiversität begründet, sind mögliche Selektionsvorteile, von seltenen und heterozygoten MHC-Genotypen. HLA heterozygote Individuen sind homozygoten Individuen im Kampf gegen Krankheitserreger überlegen, weil sie ein größeres Spektrum an Möglichkeiten zu Bindung von Antigenen besitzen.

Beispiele für den hohen Selektionsdruck auf den MHC, durch spezielle Infektionskrankheiten sind z.B. „Mareks Disease“ in Hühnern (Briles, 1983) und Malaria in Menschen (Hill et al., 1991). Weiterhin haben sich heterozygote Genotypen

in der Abwehr bestimmter Antigene als erfolgreicher erwiesen, als homozygote, so sind z. B. bestimmte heterozygote Genotypen bei HIV Infektion (Carrington, 1999) und bei Hepatitis B vorteilhaft für den Krankheitsverlauf (Thursz, 1997).

Ein anderer Faktor, der zur Erhaltung der hohen Diversität des MHC bzw. HLA beiträgt, könnte in der MHC-basierten Auswahl des Partners liegen. Verschiedene Studien beschäftigten sich mit dem Zusammenhang zwischen HLA-Genotypen, Körpergeruch und Partnerwahl, bzw. der Erkennung von Verwandten und eigenen Kindern. Die Grundlage für den Mechanismus soll darin liegen, dass Vertebraten den MHC Genotyp ihres Gegenübers am Geruch erkennen können (Boyse, 1983; Brown, 1987; Singh, 1987) und so z.B. ihre Kinder und Verwandten „erriechen“ (Manning, 1992; Yamazaki, 1979, Brown, 1994). Männliche, freilebende Rhesus Affen (*Macaca mulatta*) mit heterozygotem Mamu-DQB1 Typ zeugen signifikant mehr Nachkommen, als ihre Artgenossen mit homozygotem MHC Klasse II Genotyp (Sauermaun, 2001). Der Vorteil scheint dabei unabhängig vom tatsächlich vorliegenden Genotyp zu sein. Bei den Weibchen hatte ein homo- oder heterozygoter Genotyp keine Auswirkung auf die Anzahl der Nachkommen. Der Vorteil von Nachkommen MHC-verschiedener Eltern liegt im oben erläuterten, erhöhten Schutz vor Infektionskrankheiten durch MHC Heterozygotität.

Ein weiter Hintergrund der hohen Polymorphie der MHC Gene findet sich in der Überlebensrate von Föten, welche höher ist, wenn sie sich im MHC-Genotyp von der Mutter unterscheiden. Eine Studie mit ungewollt kinderlosen Paaren ergab eine signifikant niedrigere Erfolgsrate für in vitro Fertilisationen, wenn die Paare einen gemeinsamen HLA Genotyp besaßen (Ho, 1994). Im Tiermodell fanden sich ebenfalls Hinweise auf höhere Abort Raten bei Ratten mit homozygotem MHC Genotyp (Palm, 1974).

1.1.3 Das Kopplungsungleichgewicht

Eine bemerkenswerte Eigenschaft des MHCs besteht darin, dass einige Kombinationen von HLA-A, -B und –DR Allelen häufiger auftreten, als man es ausgehend von ihren Allelfrequenzen erwarten müsste. Dieser Umstand wird vor allem durch Selektionsmechanismen (Begovich, 1992, Thomsen, 1994) hervorgerufen. Dieses Phänomen, das allgemein auch als Kopplungsungleichgewicht (engl. Linkage Disequilibrium, LD) bezeichnet wird, ist Quelle vieler Spekulationen. Eine Hypothese besagt, dass bestimmte Haplotypen nicht rekombinieren. Eine andere Theorie ist, dass diese HLA Antigene bevorzugt rekombinieren nach einem cross-over um einen LD Haplotyp zu erzeugen. Diese Hypothesen wurden von Termijtelen und seiner Gruppe überprüft (Termijtelen, 1995). Ihre Resultate zeigen, dass die Anzahl der cross-over durch LD Haplotypen nicht signifikant niedriger ist, als wenn die Rekombination zufällig erfolgt. Auch die Anzahl der durch Rekombination erzeugten LD-Haplotypen war nicht signifikant erhöht. Das Kopplungsungleichgewicht kann demzufolge nicht durch selektive Rekombination erklärt werden. Die Rekombinationsraten liegen im Bereich von <0,2% zwischen HLA-DRB1 und HLA-DQB1 bis 1,3% zwischen HLA-DRB1 und HLA-B.

1.2 Krankheitsassoziationen

HLA-Gene werden mit unterschiedlichen Krankheiten in Verbindung gebracht. Auf Grund der Funktion der HLA-Moleküle ist es nicht verwunderlich, dass bestimmte HLA-Typen ihre Träger für spezielle Krankheiten anfälliger machen oder gegen spezifische Erkrankungen besonders effizient schützen. Man geht von einer Assoziation aus, wenn die Allelfrequenzen von krankheitsbegünstigenden Antigenen bei Krankheitsbetroffenen erhöht sind (bzw. protektive Antigene erniedrigt).

Bestimmte HLA-Allele sind assoziiert mit Krankheiten wie Typ I Diabetes, Narkolepsie, Psoriasis, Zöliakie und rheumatoider Arthritis. Die Bestimmung der HLA-Allele stellt z. T. ein diagnostisches Kriterium für diese Krankheiten dar. In vielen anderen Fällen dienen HLA-Allele aber auch als Marker, die bestimmte Risikohaplotypen kennzeichnen können. In der Tabelle 1.1 ist eine Auswahl an HLA-assoziierten Krankheiten zusammen gestellt. Eine der am intensivsten untersuchten HLA-assoziierten Erkrankungen ist Typ I Diabetes (Diabetes mellitus). Andere

spezifische HLA-Allele haben eine protektive Funktion bei viralen Erkrankungen, wie z.B. HIV. Die Rolle des MHC in der immunologisch bedingten Anfälligkeit für Viruserkrankungen wurde erstmals beschrieben von Zinkernagel und Doherty (1974). Sie beschrieben, dass das Virus spezifische zytotoxische T-Zellen, sowohl virale Antigene, als auch MHC-Moleküle erkennt. HLA Klasse I Restriktion mit zytotoxischen T-Zell Lymphozyten spielt eine Hauptrolle in der Immunantwort und der Zerstörung von virusinfizierten Zellen. Verschiedenen Studien belegen auch die HLA Assoziation von HIV. Die Auswirkungen sind unterschiedlich. Es werden unterschiedliche Geschwindigkeiten der Krankheitsprogression bei speziellen B-Allelen beschrieben. Als potentiell protektiv gelten die Allele HLA-B27, -B35 und -B57. Für andere Allele wird eine besonders schnelle Progression der Krankheit beschrieben. In der Literatur findet man Bw4 (eine Teilstruktur von HLA-B-Antigenen) Homozygotität assoziiert mit Protektion. In unterschiedlichen Arbeiten und Studien, die verschiedene Populationen betreffen, finden sich unterschiedliche Assoziationen. So wird einerseits B35 (Bw6) als protektiv beschrieben, andererseits als beschleunigend.

1.2.1 Autoimmunerkrankungen

Unter den HLA-assoziierten Erkrankungen befinden sich viele so genannte Autoimmunerkrankungen, die darauf beruhen, dass das Immunsystem körpereigene Strukturen als „fremd“ betrachtet und angreift. Ein Beispiel dafür ist die rheumatische Erkrankung Morbus Bechterew, die u.a. zu einer Versteifung der Wirbelsäule führt. Menschen mit einem HLA-B27 Allel haben ein stark erhöhtes Risiko, an Morbus Bechterew zu erkranken. Gefährdet ist allerdings nicht jeder HLA-B27-Träger. So ist mit dem Allel B*2709 keine erhöhte Gefahr verbunden zu erkranken, wohl aber mit dem Allel B*2705. Der Unterschied zwischen den beiden Allelvarianten besteht in nur einer einzigen Aminosäure im HLA-Molekül, die genau in der Bindungsfurche liegt. Dadurch kann ein körpereigenes Peptid in besonderer Form an das HLA-Molekül gebunden werden. Bei Menschen mit der Variante B*2709 (His116) geschieht dies in konventioneller Weise und die T-Zellen reagieren darauf nicht. Der Mensch bleibt gesund. Bei Trägern der B*2705-Variante (Asp116) sorgt die spezielle Aminosäure dafür, dass hier das gleiche körpereigene Peptid in anderer Weise gebunden wird und damit in einer Konformation vorliegt, die von T-Zellen als fremd eingestuft und attackiert wird. Die Autoaggression hängt hier also von einer einzigen Aminosäure ab (Hülsmeier et al., 2004).

Tabelle 1.1 - Eine Auswahl von HLA-Klasse I assoziierten Erkrankungen.

HLA-assoziierte Erkrankungen	HLA-Antigen	Relatives Risiko*
Morbus Bechterew	B27	69-87
Morbus Reiter	B27	38
Akute vord. Uveitis	B27	11
rheumatoide Arthritis	B27	5
Psoriasis vulgaris	Cw6	8-33
Morbus Behcet	B5	6
Myasthenia gravis	B8, DR3	4
subakute Thyreoiditis	Bw35	14
Idiop. Hämochromatose	A3	8
Diabetes melitus	DR3, DR 4	25
Pemphigus vulgaris	DR4	14
Multiple Sklerose	DR2, DQ6	2,7-5
Narkolepsie	DR15/DQ6	130
Goodpasture-Syndrom	DR2	13-16

* Das Relative Risiko gibt an, um welchen Faktor die Krankheit bei einem Merkmalsträger häufiger auftritt als bei einem Nicht-Merkmalsträger

Quellen: J.L. Tiwari, P.I. Terasaki, 1985; E. Thorsby, 1997

1.2.2 Sarkoidose

Sarkoidose ist eine entzündliche Erkrankung, die in etwa 90% der Fälle die Lungen befällt. Es können aber praktisch auch alle anderen Organe betroffen sein, häufig sind auch Auswirkungen auf Haut, Augen oder Lymphknoten. Die Ursache der Erkrankung ist unbekannt. Es stehen Autoimmunmechanismen, aber auch chemische Substanzen oder Mikroorganismen im Verdacht an der Auslösung der Krankheit beteiligt zu sein (Luisetti, 2000). Verschiedene Studien (Rossman, 2003) legen nahe, dass HLA-Allele, insbesondere HLA-DRB1 Allele mit der Erkrankung assoziiert sind. Ein SNP Feinmapping der Region 6p21 ergab einen signifikanten Hinweis auf eine „Splicesite“-Veränderung von BTNL2 durch den SNP rs2076530 (Valentonyte et al., 2005). Der Genort BTNL2 liegt in der Subregion der HLA-Klasse II-Gene in Nachbarschaft (~ 200 kb) zu HLA-DRB1.

1.2.3 Alopecia areata

Alopecia areata ist eine Erkrankung des Immunsystems ungeklärten Ursprungs, die sich in einer Immunreaktion gegen die eigenen Haarfollikel äußert. Sie ist die häufigste entzündliche Haarausfallerkrankung, von der ca. 1,4 Millionen Menschen in Deutschland betroffen sind. Die betroffenen Patienten leiden unter Haarausfall in unterschiedlicher Stärke. Typischerweise äußert sich die Erkrankung in kreisrunden, kahlen Stellen am Kopf. Dieser Phänotyp der Erkrankung wird als „patchy“ Alopecia bezeichnet. Der Haarausfall kann aber weiter fortschreiten und dann zum Verlust aller Kopfhaare (alopecia totalis, AT) oder sogar zum Verlust der kompletten Körperbehaarung (alopecia universalis, AU) führen. Zwei Beispiele sind in Abb. 1.4 gezeigt. Die Ätiopathogenese der Krankheit ist bisher noch nicht geklärt, verschiedene Studien belegen aber einen Zusammenhang zwischen Alopecia und HLA. Dabei zeigt sich, dass die assoziierten Allele zwischen unterschiedlichen Populationen differieren, wie auch die Allelfrequenzen für die unterschiedlichen Bevölkerungen sehr verschieden sein können. Für verschiedene Populationen sollte deshalb nach speziellen assoziierten Allelen gesucht werden.



Abb.1.4 - Beispiele für die Erscheinungsformen von Alopecia areata. Das erste Foto zeigt einen Patienten mit „patchy“ Alopecia, das zweite Bild zeigt einen von Alopecia totalis betroffenen Patienten.

1.3 HLA Typisierungsmethoden

Auf Grund der Bedeutung der HLA Typisierung für die Anwendung in der medizinischen Praxis und in der Forschung, wurden verschiedene Möglichkeiten zur Typisierung mit unterschiedlich hohen Auflösungsgraden entwickelt. Grundsätzlich gibt es Möglichkeiten zur HLA-Typisierung auf serologischer und genetischer Ebene. Zur Auswahl einer geeigneten Typisierungsstrategie sollte die spezielle Anwendung und die erforderliche Auflösung berücksichtigt werden. Unter einer niedrigen Auflösung versteht man hier ein Untersuchungsergebnis, welches zu einer zweistelligen Benennung des Allels (2-digit resolution) führt, was der Allelgruppe entspricht und welche durch die serologische Testung praktisch erreicht wird. Eine hoch auflösende Typisierung, mit einer vierstelligen Allel- Benennung (4-digit resolution) bezeichnet dann das Allel genauer – alle DNA-Sequenzen, mit gleicher 4-stelliger Allel-Bezeichnung werden in die gleiche AS-Sequenz übersetzt. Die trotzdem möglicherweise unterschiedliche DNA Sequenz, kann durch stumme Basenaustausche zustande kommen und wird in der 6-stelligen Allel-Benennung berücksichtigt (vergl. Abb. 1.5). Das lässt sich noch ausweiten auf eine achtstellige Bezeichnung, die dann noch intronische Polymorphismen mit berücksichtigt, wobei die praktische Bedeutung gering ist. Eine zusätzliche Bezeichnung ist noch „N“ für Nullallele (nicht exprimierte Allele). Weitere Kriterien zur Methodenauswahl sind Zeit- und Personalbedarf, Automatisierungsmöglichkeiten und die Kosten einer Methode.

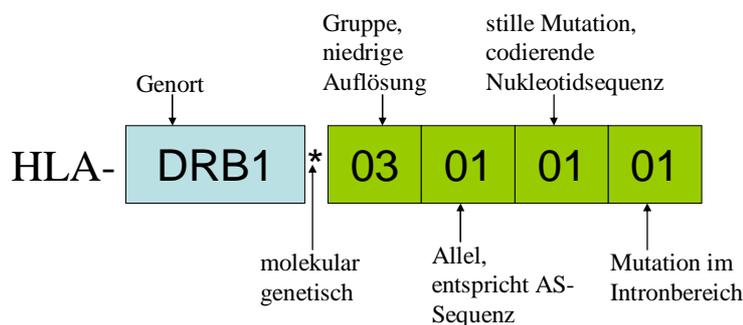


Abb. 1.5 - Nomenklaturschema zur Benennung von HLA-Allelen

1.3.1 Serologische Typisierung

Die klassische serologische HLA Typisierung, der so genannte Mikrolymphozytotoxizitätstest (LCT) (Terasaki, McClelland, 1964), wird nach wie vor in vielen Laboratorien eingesetzt. Dazu werden vitale Lymphozyten mit zytotoxischen Antikörpern und Komplement (Kaninchenserum) inkubiert. Befindet sich das korrespondierende HLA-Antigen auf der Zelloberfläche, werden die Lymphozyten lysiert und nehmen Farbstoff auf. Nicht lysierte Zellen bleiben ungefärbt. Die Auswertung erfolgt mikroskopisch. Vor allem zur HLA-A und HLA-B-Typisierung von Patienten vor Nieren-Transplantationen und Knochenmarkspendern ist der Test eine schnelle und günstige Methode zur Typisierung bzw. Vortypisierung. Dabei können 63 Hauptantigene, über spezifische Antikörper nachgewiesen werden, nach denen bereits eine Vorauswahl eines geeigneten Spenders erfolgen kann. Zur Bestimmung eines HLA-A, -B-Typs kommen kommerzielle Serensets mit 72 bis 120 verschiedenen Antiseren zum Einsatz. Diese Methode ist die einzige gebräuchliche, bei der die tatsächlichen Interaktionen zwischen Zellen und Antikörpern beobachtet werden. Daher wird sie auch weiterhin für die Verträglichkeitstestung im Zusammenhang mit Transplantationen und Transfusionen im Einsatz bleiben. Die Nachteile der serologischen Typisierung liegen darin, dass nur eine grobe, grundsätzliche Einteilung in die HLA-Hauptgruppen erfolgen kann. Dazu sind viele Seren nötig und es kommt dazu, dass der Typisierungserfolg deutlich von der Vitalität der Zellen abhängt, was bedeutet, dass durch die Instabilität der Lymphozyten frisches Blut in ausreichender Menge zur Verfügung stehen muss. Damit ist die Methodik z.B. für die Anwendung in größeren und längerfristigen Studien ungeeignet.

1.3.2 Biochemische Verfahren

Eine Möglichkeit zur Charakterisierung von HLA-Molekülen ist die isoelektrische Fokussierung (IEF). Durch die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte können HLA-Klasse I Moleküle detektiert werden. Durch Western Blots in Verbindung mit poly- bzw. monoklonaren Antikörpern können gezielt bestimmte HLA-Moleküle dargestellt werden. Diese Verfahren werden für Expressionsnachweise von HLA-Molekülen, z.B. auf Tumorzellen eingesetzt.

1.3.3 Molekularbiologische Verfahren

Die DNA basierten Typisierungsverfahren wurden zunächst für die Klasse II Genorte entwickelt und dann auf die Klasse I Genorte ausgedehnt. Sie haben gegen über der serologischen Untersuchung den Vorteil, dass das nötige Material, die DNA der zu untersuchenden Personen, auch langfristig gut lagerfähig ist. Für große Studien besteht die Möglichkeit der Einrichtung von Zelllinien zur Gewinnung von weiterer DNA. Die Typisierung auf diesem Wege ist sehr viel sicherer und höher auflösend. Gängige DNA basierte Typisierungsmethoden sind die sequenz-spezifische Oligohybridisierung (SSO), die Sequenzierung (SBT) und das sequenz-spezifische Priming (SSP). SSO und SSP sind aussagekräftige Methoden, wenn es darum geht bekannte Sequenzmotive zu detektieren. Es sind allerdings eine große Menge immer wieder zu aktualisierende Sonden und Primern nötig, um mit der wachsenden Zahl an Allelen Schritt zu halten. Die SSO-Methoden beinhalten generische oder gruppenspezifische PCRs zur Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts mit anschließender Hybridisierung der spezifischen Sonden. Die Sonden sind normalerweise in Streifenform auf Membranen immobilisiert. Es gibt inzwischen aber auch Entwicklungen mit Sonden auf Chips oder Mikrosphären. Die Auflösung der SSO-Analysen ist mittelmäßig, erfordert relativ wenig DNA und ist gut zu automatisieren (z.B. Auto-LIPA, Innogenetics). Bead-basierte Methoden, wie z.B. „LUMINEX“ oder „TEPANEL“ erlauben eine SSO auf der Oberfläche von Mikrosphären. Durch zwei unterschiedliche Untersuchungen der Emissionen können verschiedene Typisierungsschritte in einem Durchgang erfolgen. Die mit unterschiedlichen Nukleotidsonden beladenen Mikrosphären sind durch verschiedene Farben unterscheidbar. Diese Methoden sind noch recht neu und erfordern spezielle Geräte. Der Durchsatz lässt sich mit diesen automatisierten Verfahren jedoch gut steigern.

Die PCR-SSP Methode besteht aus einer Reihe von PCR-Reaktionen mit sequenzspezifischen Primern. Je nach Anzahl der verwendeten Primer ist die Auflösung von gering über mittel-hoch bis zu hoch steuerbar. Die Analyse kann relativ schnell und einfach erfolgen. Der DNA-Verbrauch ist allerdings sehr hoch und die verwendete DNA muss von guter Qualität sein. Auch durch Kombination von SSO mit SSP Methode lassen sich hoch auflösende Typisierungsergebnisse erzielen.

Der Vorteil der Typisierungsstrategien die auf DNA-Sequenzierung basieren, ist die Möglichkeit neue Sequenzmotive zu entdecken. Das SBT erfordert ebenfalls gute DNA

Qualität und einen recht hohen Aufwand. Die Auflösung ist hoch, jedoch muss auch hier mit nicht auflösbaren Ambiguitäten gerechnet werden. Probleme können durch Sequenzierartefakte und bei der Zuordnung heterozygoter Positionen auftreten. Zur eindeutigen Lösung vieler Allelkombinationen sind z.B. Verknüpfungen von SSP Methoden mit dem SBT nötig, so dass eine allelspezifische Sequenzierung möglich wird.

Wie schon im Abschnitt über die Diversität des HLA-Systems erwähnt, bestehen die Allele häufig aus verschiedenen Kombinationen der gleichen Sequenzmotive. Das muss bei der Typisierungsstrategie in so fern berücksichtigt werden, da nicht nur das Vorhanden sein oder die Abwesenheit eines Sequenzmotivs entscheidend sind, sondern auch die Anordnung der Motive zueinander (gleicher Strang, anderer Strang, cis/trans). Zur eindeutigen Klärung reichen die generischen Typisierungsansätze oft nicht aus. Dann werden allel- oder allelgruppenspezifische Amplifikationsverfahren benötigt, um die Allele getrennt von einander untersuchen zu können. Eine recht neue Technik zur Alleltrennung ist die haplotyp-spezifische Extraktion (HSE), an die sich dann wiederum die unterschiedlichen Typisierungsverfahren anschließen können.

Tabelle 1.2 - Übersicht über die gängigen HLA-Typisierungsmethoden

HLA-Typing Methoden	Art	Auflösung	Anwendung
Lymphozytotoxizitäts- Test (LCT)	serologisch	niedrig	Klasse I Antigene HLA-A, -B und -C Klasse II Antigene, HLA-DR und -DQ Spendersuche innerhalb der Familie, Spenderregistrierung KMT, Verträglichkeitstestung (Kreuztest)
Isoelektrische Fokussierung (IEF)	biochemisch	niedrig	Expressionsnachweise
Sequenz-spezifische Oligohybridisierung (SSO)	molekular-genetisch	niedrig bis mittel	Klasse I und II Genorte Spender-/Empfänger Auswahl vor Nierentransplantation; Spenderauswahl vor Knochenmarkstransplantation
Sequenz-Spezifisches Priming (SSP)	molekular-genetisch	niedrig bis hoch	Klasse I und II Genorte Spender-/Empfänger Auswahl vor Nierentransplantation; Spenderauswahl vor Knochenmarkstransplantation, Assoziationsstudien
Sequenzierungs-basierte Typisierung (SBT)	molekular-genetisch	hoch	Klasse I und II Genorte Spenderauswahl vor Knochenmarkstransplantation, Assoziationsstudien
Mikrosatelliten (MS) /Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP)	molekular-genetisch	niedrig	Assoziationsstudien

1.4 DNA-Sequenzierung mit Pyrosequencing™

Die „klassische“ DNA-Sequenzierung nach dem Didesoxykettenabbruchsystem, 1977 von Sanger entwickelt, wurde seit dem ständig weiterentwickelt. Große, oft per Hand gegossene Elektrophoresegele wichen den handlichen Kapillaren, radioaktive Markierungen wurden von chemischen abgelöst und die umständliche Detektion mit Filmen wurde durch die moderne Lasertechnologie ersetzt. Trotz der Verbesserungen ist die Sequenzierung eines DNA-Abschnittes noch immer mit verhältnismäßig großem Aufwand verbunden. In den letzten Jahrzehnten wurden alternative Methoden zur Analyse, insbesondere für kurze Sequenzabschnitte entwickelt. Einer dieser Ansätze ist das Pyrosequencing™ (Ronaghi et al., 1996; 1998; 2001). Die Methode wurde 1996 von Mitarbeitern des „Royal Institute of Technology“ in Stockholm entwickelt. Die 1997 in Uppsala gegründete Firma „Pyrosequencing AB“ entwickelte die Methode weiter und vermarktet sie kommerziell. Diese DNA-Sequenzierungstechnik basiert auf der Detektion des während des Strangaufbaus freigesetzten Pyrophosphats. Durch eine Kaskade enzymatischer Reaktionen wird Licht generiert. Die Lichtintensität ist proportional zu der Menge jeweils eingebauter Nucleotide. Die Methode ist besonders gut geeignet zur Analyse kurzer bis mittlerer DNA-Sequenzabschnitte, wie SNP-Genotypisierung oder Resequenzierung von speziellen Genen. Die Sequenzierung erfolgt im Gerät in „Echtzeit“ und lässt sich so am Bildschirm anhand der erfassten Pyrogramme verfolgen. Das Reaktionsprinzip besteht aus folgenden Schritten: An ein einzelsträngiges PCR Produkt wird ein Sequenzierprimer anhybridisiert. Dazu wird ein Enzym-Substrat-Gemisch gegeben, wobei sich die DNA Polymerase an den Strang anlagert. Nun wird ein Nukleotid angeboten – ist es komplementär zu dem folgenden Nukleotid auf der DNA-Vorlage, wird es von der DNA-Polymerase eingebaut. Durch den erfolgreichen Nukleotideinbau wird eine proportionale Menge Pyrophosphat (PPi) freigesetzt. Dadurch wird die enzymatische Kaskade gestartet. Mittels ATP-Sulfurylase und Pyrophosphat wird dADP zu dATP umgebaut. Mit dem dATP wird in Anwesenheit von Luciferase Luciferin zu Oxiluciferin oxidiert. Das dabei freiwerdende Licht wird von einer CCD-Kamera („charge-coupled device“) erfasst und die Lichtintensität in einem so genannten Pyrogramm dargestellt. Unverbrauchte Nucleotide werden durch Apyrase degradiert. Das nächste Nukleotid kann nun hinzugegeben werden. Da das zugegebene Nukleotid bekannt ist, kann die Sequenz bestimmt werden.

Die Reihenfolge der Nukleotidzugabe wird für jede Sequenzierreaktion zuvor festgelegt und als „Dispensationorder“ bezeichnet. Die Dispensierreihenfolgen können für spezielle Untersuchungen von entscheidender Bedeutung sein. Durch verschiedene Dispensierreihenfolgen können gleiche Sequenzen unterschiedliche Pyrogramme ergeben, insbesondere dann, wenn an heterozygoten SNPs nur eins der möglichen Nukleotide bedient wird und somit einer der beiden Stränge nicht verlängert wird (vergl. Abb. 2.3). Für unbekannte Sequenzabschnitte ist eine rotierende Abfolge der vier Basen möglich.

1.4.1. Enzymatische Reaktionskaskade

Die Enzymmischung für die Pyrosequencingreaktion enthält DNA-Polymerase (Klenow Fragment, *Escherichia coli* DNA Polymerase I) ATP Sulfurylase (*Saccharomyces cerevisiae*) und Luciferase (*Photinus pyralis*). Die Reaktionskette von der Polymerisation bis zur Detektion des Lichtes dauert bei Raumtemperatur etwa 3-4 Sekunden. Beim Einsatz von einem pmol DNA in der Pyrosequencing Reaktion entstehen bei der Polymerisation 6×10^{11} ATP Moleküle, die in mehr als 6×10^9 Photonen mit einer Wellenlänge von 560 nm umgesetzt werden können. Diese Lichtmenge wird von einer CCD-Kamera detektiert. Um den iterativen Einbau der Nukleotide zu ermöglichen, müssen die übrig gebliebenen Nukleotide aus der Reaktion entfernt werden. Dies geschieht enzymatisch durch die Apyrase. Das Enzym hydrolysiert alle Deoxynukleosidtriphosphate mit ungefähr gleicher Rate. Außerdem hydrolysiert es ATP um eine Anhäufung zwischen den Dispensationen zu vermeiden. Der Nukleotidabbau verläuft langsamer als der Nukleotideinbau durch die Polymerase. Der Einsatz dieses Enzymschrittes ermöglicht den Verzicht auf Waschschrte und die Pyrosequencing Technik im „single-tube“ Verfahren.

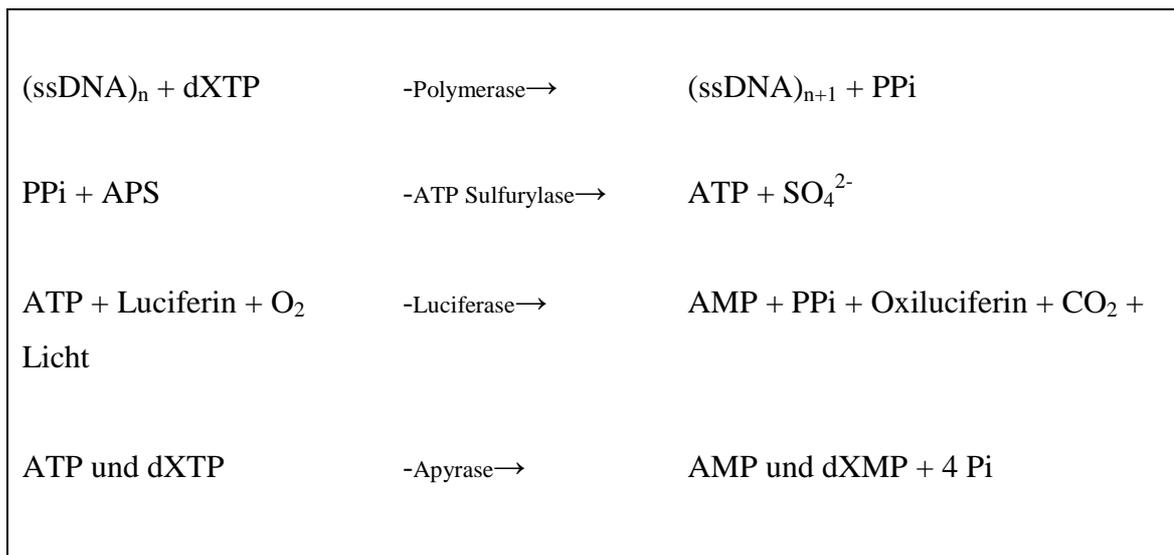


Abb. 1.6 - Übersicht über die enzymatischen Reaktionsabläufe während des Pyrosequencing

Zur Polymerisation wird kein dATP verwendet, sondern Desoxyadenosinalphatitriphosphat (dATP α S). dATP ist ein Substrat der Luciferase, während dATP α S zwar von der DNA-Polymerase erkannt wird, jedoch nicht von der Luciferase, was falsche bzw. zu hohe Peaks vermeidet.

Die Enzymkinetik der Pyrosequencing-Reaktion kann an Hand der Pyrogramme verfolgt werden. Der Kurvenanstieg ist bestimmt durch die Aktivität der Polymerase und der Apyrase. Das Pyrophosphat (PPi) wird mit Adenosinphosphosulfat (APS) durch die ATP Sulfurylase umgesetzt zu ATP. Die Lichtgenerierung erfolgt durch die Luciferase. Die Reaktionen erfolgen in weniger als 1,7 sec. Die Signalhöhe ist determiniert durch die Aktivität der Luciferase. Der Abfall der Kurve wird bestimmt durch die Effizienz des Nucleotidabbaus. Die Anhäufung von inhibitorischen Substanzen über die Laufzeit reduziert die Effizienz der Luciferase und der Apyrase. So inhibiert die Akkumulation von AMP und dAMP α S die Aktivität speziell der Luciferase. Die Aktivität der ATP-Sulfurylase bleibt weitgehend konstant. Damit sind die kritischen Reaktionen die DNA-Polymerisation (aufsteigende Kurve) und die Nucleotid-Degradation (abfallende Kurve), die miteinander konkurrieren. Kleine Veränderungen in der Kinetik dieser Reaktionen haben eine direkte Auswirkung auf die Güte der Sequenzierreaktion.

In längeren homopolymeren Abschnitten kann manchmal beobachtet werden, dass die Apyrase Nucleotide zu früh abbaut, bevor die Polymerisation dieser Strecken vollendet

werden konnte. Eine erneute Dispensation des entsprechenden Nukleotids kann das Problem lösen. Parameter, die zu Problemen bei längeren Leselängen führen können, sind die ineffizienter werdende Degradation durch die von AMP und dAMP α S inhibierte Apyrase in fortgeschrittenen Zyklen und Verdünnungseffekte. Obwohl bei jeder Nukleotid-Dispensation nur etwa 0,22 μ l dazu gegeben werden, summieren sich diese Mengen bezogen auf das geringe Gesamtvolumen und führen zu einer deutlichen Verdünnung. Dadurch kann nach längeren Leselängen eine verringerte Enzymeffizienz beobachtet werden.

Der Hauptanwendungsbereich des Pyrosequencing liegt in der Genotypisierung von Einzelnukleotidpolymorphismen (single-nucleotide-polymorphisms, SNPs) und in der Kurzstreckensequenzierung. Inzwischen sind fertige Assays („Pyro-Mark“, Biotage, Uppsalla, Schweden), z.B. für verschiedene SNPs und für mikrobiologische Typisierungen kommerziell erhältlich.

1.4.2 Instrumentation

Die automatisierte Pyrosequencing Maschine, zu sehen in der Abbildung 1.7, verwendet eine Tintenstrahl-Kartusche mit Kammern für sechs verschiedene Reagenzien zur Dispensation genauer Volumina in eine 96er-Mikrotiterplatte. Die Mikrotiterplatte wird im Gerät geschüttelt, um eine höchst mögliche Reaktionsrate zu erreichen. Über eine Anordnung von Linsen wird das Licht aus den einzelnen Wells auf den Chip einer CCD-Kamera fokussiert. Die gekühlte CCD-Kamera verfolgt die Lichtentwicklung in den Wells der Platte jede Sekunde, um den exakten Fortschritt der Reaktion zu erfassen. Die Kontrolle über Dispensierreihenfolgen und Darstellung der resultierenden Pyrogramme erfolgt über eine spezielle Software an einem Computerinterface. Weiterentwicklungen sind der Pyrosequencer MA96 und das HS-System von Pyrosequencing, wobei „MA“ für „multi-application“ und „HS“ für „high sensitivity“ steht. Im HS-System sind die Plastik-Kartuschen, die nach mehrmaligem Gebrauch weggeworfen werden müssen, durch Kartuschen aus Metall ersetzt. Die Reaktion läuft in kleineren Volumina ab. Dieses System ist aber für die Anwendung in der SNP-Typisierung limitiert. Sowohl im instrumentellen, als auch im Softwarebereich wird an weiteren Verbesserungen der Pyrosequencing Technik durch die Firma Biotage gearbeitet.



Abb. 1.7 - Pyrosequencer 96MA mit Kartusche. Der Deckel der Dispensationseinheit ist geöffnet, eine gefüllte Kartusche kann eingebaut werden. Darunter befindet sich die Prozesskammer.

1.5 Aufgabenstellung

In der Arbeit sollen Strategien entwickelt werden, wie die Anwendung der Pyrosequencing-Technologie als Alternative und Ergänzung zu bestehenden HLA-Typisierungsmethoden genutzt werden kann. Es sollen Pyrosequencing-basierte Typisierungsstrategien für die wichtigsten HLA-Loci entwickelt werden. Mit Hilfe der zu den einzelnen Loci erarbeiteten Typisierungsstrategien sollen Anwendungsbeispiele untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

DNA Extraktionsroboter	GenoM-6, Genovision, Wien; Österreich GenoM-48, Quiagen, Hilden Deutschland
PCR-Automaten	DNA Engine Dynal Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Zentrifugen	für Strips – Sarstedt, Nürnberg, Deutschland für Einzelröhrchen - Eppendorf 5415D, Hamburg, Deutschland
Vakuumpzentrifuge	Speedvac SC100, Savant Instruments, Inc. Farmiongdale, N.Y.
Elektrophoresekammern	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Stromversorgung	Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland
UV-Illuminationstisch	Hofer, Heidelberg, Deutschland
Polaroid-Kamerasystem	Polaroid, Dreieich-Sprendlingen, Deutschland
Waagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock	TruTemp, Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA
Spektrophotometer	GeneQuant, Biochrom Ltd., Cambridge, England
Vortexer	Jahnke & Kunkel, Staufen Deutschland
Pyrosequencer	PSQ96 Pyrosequencing, Uppsalla, Schweden
DNA Sequencer	ABI, Applied Biosystems, Branchburg, USA
SSO-Automat	Auto-LIPA, Innogenetics/TECAN, Österreich

2.1.2 Chemikalien und Kits

Agarose electrophorese	Serva, Heidelberg, Deutschland
DNA-Polymerasen:	
AmpliTaq	Applied Biosystems, Branchburg, USA
AmpliTaqGold	Applied Biosystems, Branchburg, USA

PCR-Puffer:

GeneAmp 10X PCR BufferII (100 mM Tris-HCL, pH 8,3; 500mM KCl)
Applied Biosystems, Branchburg, USA
10X PCR Buffer Invitek (1x NH₄-reaction-buffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM
Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% Tween-20) Invitek, Berlin, Deutschland

MgCl₂ Lösung (25 mM MgCl₂) Applied Biosystems, Branchburg, USA

MgCl₂ Lösung (50 mM MgCl₂) Invitek, Berlin, Deutschland

Nukleotide (dNTP-Mix, 10mM) Sigma, Seelze, Deutschland

One-Phor-All-Buffer PLUS, Amersham Bioscience

INNO-LiPA-HLA-DRB1/-DQB1/-B Innogenetics, Ghent, Belgien

HLA-Seq-Kits Atria Genetics, San Francisco, CA, USA

Olerup SSPTM OlerupSSP AB, Saltsjöbaden, Schweden

PSQTM96, SNP Reagent Kit, Pyrosequencing, Uppsala, Schweden

PyroGold Reagents, Biotage AB, Uppsala, Schweden

HaploPrepTM, HLA-B Kit, Genovision, Wien, Österreich

MagAttract DNA Blood M96 Kit, Quiagen, Hilden Deutschland

GenoPrep Cartidge B 200, Genovision, Wien, Österreich

2.1.3 DNA-Proben

Genomische DNA wurde mit der vollautomatischen GenoMTM-48 bzw. GenoMTM-6 Arbeitsstation (GENOVISION, Wien, Österreich; Quiagen, Hilden, Deutschland) aus Blut isoliert. Die Extraktionsmethode besteht aus einer Zelllyse mit Hilfe chaotropher Reagenzien, Bindung der DNA an mit Silikat überzogene, magnetische Partikel gefolgt von der Elution der gereinigten Nukleinsäure in wässriger Lösung. Die Isolationen erfolgten in den Arbeitsstationen, in Kombination mit den dazu gehörigen Kits, für den GenoMTM-48 mit dem „MagAttract DNA Blood M96 Kit“ und für den GenoMTM-6 mit der „GenoPrep Cartidge B 200“ der Firma Qiagen.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem „GeneQuant“ (Biochrom Ltd., Cambridge) bei 260 nm unter Abzug der Beads-Adsorption bei 320 nm bestimmt. Die

DNA wurde in wässriger Lösung bei 4°C gelagert. Längerfristig nicht benötigte Proben wurden bei –20 bis –80°C aufbewahrt.

Zur Etablierung und Optimierung der Pyrosequencing Methode wurden Standard-DNA-Proben des Labors verwendet, deren HLA Genotypen bekannt sind. Zu Evaluierungszwecken wurden DNA Proben des Ringversuchs „Deutscher Zell Austausch“ (DZA) 2002, 2003 und 2004 untersucht. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit DNA-Proben von Patienten (Alopecia), gesunden Kontrollpersonen (freiwillige Blutspender) und DNA-Proben von Bewohnern aus Papua Neuguinea (PNG) vom Stamm der Roro untersucht.

Tabelle 2.1 – Verwendete DNA-Kollektive

DNA-Kollektiv	Herkunft	Beschreibung	Anzahl
Familien-Trios	Uni Kiel Jochen Hampe	Trio-Platte, 30 Familien	90
Alopecia	Uni Antwerpen Bettina Blaumeiser	Alopecia-Patienten Kontrollen	161 165
Roro	Schiefenhövel, PNG	Personen vom Stamm der Roro, PNG	22

2.2 Methoden

2.2.1 HaploPrep™

HaploPrep™ (Genovision, Wien, Österreich) ist eine Methode zur Separierung von haploiden Sequenzabschnitten der HLA-Region aus genomischer, diploider DNA. Bisher sind HaploPrep-Sonden für die Genorte HLA-A und HLA-B kommerziell erhältlich. Zur Durchführung der Haplotyp-spezifischen Extraktion (HSE) muß zumindest eine grobe Vortypisierung der zu untersuchenden Probe vorangegangen sein. Anhand der ermittelten Allelgruppen können spezifische Sonden ausgewählt werden, welche jeweils nur zu einem der beiden Allele komplementär sind. Diese biotinylierten Sonden hybridisieren an die denaturierte DNA. Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel werden zugegeben und lagern sich an die Biotin-markierten Sonden an. Die

HSE-Produkte können dann anschließend in verschiedensten HLA-Typisierungsmethoden eingesetzt werden.

Standard-Ansatz für eine HaploPrep-Extraktion:

15 µl	HaploPrep Hybridisations-Puffer
8,5-13,5 µl	DNA in wässriger Lösung (mindestens 300 ng DNA)
1,5 µl	HaploPrep Extraktionssonde
ad 30µl	H ₂ O (je nach eingesetztem DNA-Volumen)

Die Komponenten werden wie oben beschrieben in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammen pipettiert und gemischt. Zur Hitzedenaturierung werden die Proben dann für 15 Minuten bei 95°C inkubiert. In der Zwischenzeit wird der GenoM-6 mit HaploPrep Kartuschen bestückt und gestartet. Dadurch wird der integrierte Heizblock auf die Hybridisierungstemperatur von 64°C vorgeheizt. Nach der Hitzedenaturierung werden die geöffneten Reaktionsgefäße in den GenoM-6 gestellt und der Lauf gestartet. Die Proben werden im Gerät zunächst für 20 Minuten bei 64°C inkubiert, wobei die biotinylierten Sonden an die entsprechenden DNA-Abschnitte hybridisieren sollen. Im Anschluss an diesen Schritt, werden die mit Streptavidin beschichteten magnetischen Partikel dazugegeben. Es folgen mehrere Waschschrte. Zum Ende des Laufes werden die magnetischen Partikel mit nun gebundenen DNA-Fragmenten in ein Reaktionsgefäß eluiert und können dem Gerät entnommen werden. Die so erhaltene Suspension kann nun direkt in einer anschließenden PCR eingesetzt werden, wobei das Suspensionsvolumen maximal 20% des Reaktionsvolumens betragen sollte. Alternativ können die magnetischen Partikel nach einer zehnminütigen Hitzedenaturierung bei 75°C abgetrennt werden. Dazu wird das Reaktionsgefäß direkt nach der Hitzeinkubation an einen Magneten gestellt und der klare Überstand zum Einsatz in PCR Reaktionen abgenommen.



Abb. 2.1 - Geno M-6 Gerät zur vollautomatischen Extraktion von DNA aus Blut und zur Anwendung der Haplotyp-spezifischen Extraktion.

2.2.2 PCR-Reaktionen

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Mullis, 1986) ist nach nur knapp zwei Jahrzehnten seit ihrer ersten Entwicklung und Erprobung zum praktisch unverzichtbaren Standard in der molekulargenetischen Forschung und Diagnostik geworden. Das Prinzip beruht darauf, dass ein definierter Sequenzabschnitt durch spezifische Oligonukleotide, die so genannten Primer, eingegrenzt und dann mit Hilfe einer hitzstabilen DNA-Polymerase vervielfältigt wird. Durch den wiederholten Umlauf durch Denaturierungs-, Annealing- und Elongationstemperatur erreicht man eine

Anreicherung des gewünschten Sequenzabschnittes von bis zu einer Million aus der eingesetzten DNA.

Für jedes Primerpaar müssen die Bedingungen der PCR Reaktion optimiert werden. Variable Größen sind z.B. der verwendete Puffer, die Art der Taq-Polymerase, die Magnesiumkonzentration aber auch das Temperaturprofil des PCR-Programms. Hierbei unterscheidet man zwischen normalen Programmen, bei denen nach der Denaturierungsphase immer wieder die gleiche Annealingtemperatur angefahren wird und sogenannten touch-down-Programmen, bei denen in den ersten Zyklen hohe Annealingtemperaturen angefahren werden, welche dann in späteren Zyklen abgesenkt werden. Für bestimmte Anwendungen ist der Einsatz von TaqGold sinnvoll. TaqGold besteht aus einem Gemisch von DNA-Polymerase und einem Inhibitor. Die durch die Inhibitorbindung inaktivierte Taq-Polymerase muss durch einen initialen Denaturierungsschritt zu Beginn der PCR (95°C, 10 Minuten) aktiviert werden. Die genauen PCR-Bedingungen werden in den jeweiligen Abschnitten im Ergebnisteil angegeben.

2.2.3 Gesamtgenom Amplifikation

Die DNA Amplifikation des Gesamtgenoms (engl.: whole genome amplification, WGA) dient dazu, geringe Mengen DNA zu vervielfältigen und so die Anzahl durchführbarer Untersuchungen bei eingeschränktem Ausgangsmaterial zu erhöhen. Dazu gibt es verschiedene Methoden, die als Kits von unterschiedlichen Herstellern bezogen werden können. Die bekanntesten Strategien sind DOP-PCR („degenerate oligonucleotide-primed PCR“), PEP („primer extension preamplification“) und MDA („multiple displacement amplification“) (Dean et al., 2002). Das hier verwendete Kit „REPLI-g“ (Quiagen) arbeitet nach der „multiple displacement amplification“ (MDA). Diese Methode beruht auf einer „rolling-circle“-Amplifikation zu der exonuklease-stabile Zufallshexamere als Primer und ϕ 29 DNA Polymerase eingesetzt wird. Dabei entstehen DNA Kopien mit ca. 10-70 kb Länge und einer uniformen Verteilung über das gesamte Genom.

Das REPLI-g Kit besteht aus den Komponenten REPLI-g DNA Polymerase, „4x Mix“ mit Primern und Puffer und der „Solution B“ welche den Denaturierungsschritt stoppt. Weiter wird die so genannte „Solution A“ zur Denaturierung benötigt, welche immer frisch aus 40 μ l 5M KOH, 10 μ l 0.5M EDTA (pH 8) und 450 μ l dH₂O hergestellt

werden soll. Zur Durchführung werden die zu vervielfältigenden DNA Proben in Cyclex-Strips vorgelegt und mit TE Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) auf ein Volumen von 2,5 µl aufgefüllt. Der empfohlene Input liegt bei ca. 10 ng DNA. Die Solution A wird 1:8 in dH₂O verdünnt und es werden jeweils 2,5 µl zu der vorgelegten DNA pipetiert und 3 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert. Die Solution B wird 1:10 in H₂O verdünnt und nach Ablauf der 3 Minuten Denaturierung werden 5µl zur Reaktion gegeben, um die Lösung zu neutralisieren. Der Amplifikations-Master Mix setzt sich aus REPLI-g 4x Mix, REPLI-g DNA-Polymerase und Wasser zusammen.

Reagenz	µl für 1 Probe	
DNA in TE	2,5	
Solution A (1:8)	2,5	
Solution B (1:10)	5	
dH ₂ O	27	Master-Mix
REPLI-g 4x Mix	12,5	
REPLI-g DNA-Polymerase	0,5	
total Volumen	50	

Zu der denaturierten DNA wird 40 µl Master-Mix gegeben, so dass ein Endvolumen von 50 µl erreicht wird. Das Reaktionsgefäß wird in einen Heizblock oder Cyclex gestellt und für 8-16 h bei 30°C inkubiert. Dann wird die enzymatische Reaktion durch ein Aufheizen auf 65°C für 3 min beendet. Die resultierende REPLI-DNA-Lösung soll etwa 900 ng/µl DNA enthalten und

sollte wie genomische DNA bei 4°C oder im Tiefkühler gelagert werden.

2.2.4 PyrosequencingTM

Das Prinzip des Pyrosequencing wurde schon in der Einleitung ausführlich beschrieben. Es handelt sich um eine DNA-Sequenziermethode, bei der entlang eines einzelsträngigen PCR Produktes der als Vorlage dient, der komplementäre Strang aufgebaut wird.

Zunächst muß das PCR-Produkt aufgereinigt und einzelsträngig gemacht werden. In einer 96well-Platte werden dazu 33µl 2x BW Puffer (10mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Tween-20) + 8µl Streptavidin-beschichtete „Dynabeads“ vorgelegt. Dazu wird 20-25µl PCR Produkt gegeben und die Platte für 15 Minuten bei 65°C inkubiert, dabei erfolgt die Anlagerung der biotinylierten PCR-Produkte an die Beads. Mit dem „Pyrosequencing Sample Prep Tool“, einem Werkzeug mit 96 magnetischen Stäbchen, über die ein passendes Plastikutensil gestülpt wird, können die magnetischen Dynabeads mit den angelagerten PCR Produkten aus der ersten

Inkubationsplatte entnommen werden. Die DNA-beladenen Beads werden so in eine zweite Platte überführt, welche je 50µl 0,5 M NaOH Lösung enthält. Dort werden sie etwa 1 Minute lang unter leichtem Rütteln inkubiert und das PCR Produkt denaturiert. Danach werden die Beads auf dem gleichen Weg wieder entnommen und in eine Platte mit 100µl AB Puffer (20 mM Tris (pH 7,6), 5 mM Magnesiumacetat Tetrahydrat [(CH₃COO)₂Mg 4H₂O]) überführt und so gewaschen. Nun werden sie mittels des „Sample Prep Tools“ in eine vierte Platte mit 45µl AB Puffer und 5µl Sequenzierprimer (10-20 pmol) überführt und für 2 bis 5 Minuten bei 80°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Platte in den Pyrosequencer gestellt. Eine Kartusche wird mit Nukleotiden, Enzym-Mix und Substrat befüllt und in die entsprechende Vorrichtung im Pyrosequencing Gerät eingebaut. Über die Gerätesteuerungssoftware werden die Einzelheiten des Laufes, wie Probenamen und gewünschte Dispensierreihenfolgen eingegeben und der Lauf gestartet. Das Gerät verteilt in alle Wells der zu untersuchenden Platte nun zunächst 5,5 µl Enzym- und Substratlösung. Dann werden die Nukleotide, in jedem Schritt 0,22µl, entsprechend der vorher festgelegten Dispensationsreihenfolge (näheres unter 3.1) dazu pipettiert. Der Fortschritt der Reaktion lässt sich anhand der Pyrogramme am Bildschirm in Echtzeit verfolgen. Nach Abschluss des Laufes können die Pyrogramme ausgedruckt und ausgewertet werden.



Abb. 2.2 - Pyrosequencing Aufreinigungszubehör. Links das „Sample Prep Tool“ mit 96 magnetischen Stäbchen zur Separation der Dynabeads aus der Lösung, rechts die Halterung für die vier Platten.

Modifikationen des PCR-Produktes durch Blockierung des 3'-Endes

Eine Möglichkeit die Formierung von Template-Loops während des Pyrosequencing zu vermeiden, ist die Blockierung des 3'-Endes des PCR-Produktes (Utting, 2004). Dazu wird das einzelsträngige PCR-Produkt mit Terminaler Transferase (TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase) behandelt und ein Didesoxynukleotid am 3' Ende eingebaut. Dieser Schritt erfolgt gegebenenfalls nach der Denaturierung der DNA. Die beladenen Dynabeads werden in 50µl Reaktionsmischung aus 1x One-Phor-All-Buffer mit 0,5 mM ddCTP und 2,5 U TdT für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann werden sie wiederum in 100µl AB-Puffer gewaschen und weiter wie oben beschrieben für das Pyrosequencing eingesetzt.

Herangehensweise bei der Erarbeitung einer spezifischen Pyrosequenzierung

Die Sequenzierprimer werden so gelegt, dass sie sich in einem konservierten Bereich befinden, ihr 3'-Ende aber kurz vor einer zu untersuchenden polymorphen Position liegt. Bei der Auswahl der Sequenzierprimer wurde das Programm „SNP primer design“ von Pyrosequencing benutzt (SNP primer design, PyrosequencingTM AB, Version 1.0.1., online). Zur Erstellung der Dispensierreihenfolgen müssen alle möglichen Kombinationen von Allelen berücksichtigt werden. Sie wurden zunächst ohne die Hilfe eines Computerprogramms erstellt. In der Abbildung 2.3 werden Beispiele für die theoretischen Pyrogramme von drei heterozygoten Sequenzmotiven gezeigt. Die zu untersuchende Sequenz ist G (T/C) (T/A) CCAG. Um zu verdeutlichen wie wichtig die Dispensierreihenfolge ist, sind zum Vergleich die Pyrogramme der gleichen Sequenzkombinationen in den beiden Abbildungen mit zwei unterschiedlichen Dispensierreihenfolgen (Basenreihenfolge vertauscht) dargestellt. Eine Veränderung in der Reihenfolge kann, wie im Beispiel gezeigt, dazu führen, dass die unterschiedlichen Stränge verschieden verlängert werden. So können die Sequenzierungen „aus der Phase“ geraten, der Strangaufbau eines Alleles hinter dem des anderen zurück bleiben und so das Pyrogramm nicht mehr oder nur schwer auswertbar machen. Zur besseren Auswertbarkeit, werden in die Dispensierreihenfolgen deshalb bewusst „Null-Positionen“ eingefügt, also Basen dispensiert, welche an der betreffenden Stelle bekanntermaßen nicht vorkommen.

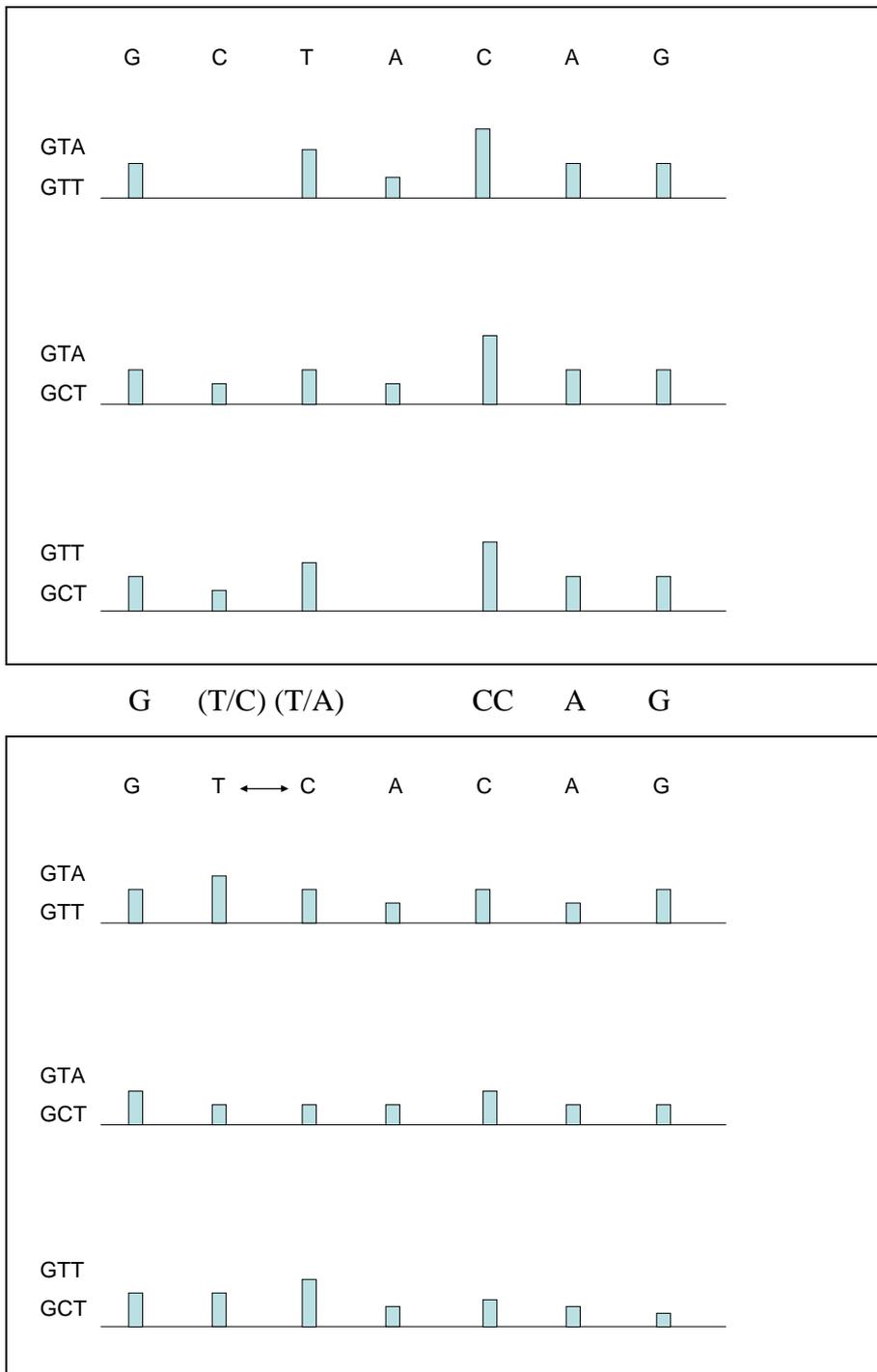


Abb. 2.3 – Oben - Die drei unterschiedlichen Kombinationen der Sequenzmotive erzeugen drei deutlich unterschiedliche Pyrogramme. Die Nukleotidstränge werden gleichmäßig verlängert. Unten - Oberste Kombination (GTA/GTT): Die Stränge werden ungleichmäßig verlängert. Während der GTT-Strang schon die vierte und fünfte Position eingebaut hat, ist der GTA-Strang erst an der dritten Basenposition. Mittlere (GTA/GCT) und untere Kombination (GTT/GCT): Es wird nach der Dispensation der Cs kein T angeboten. Der GCT-Strang wird nicht weiter verlängert.

Die zu Beginn der Arbeit verfügbare Software der Firma Pyrosequencing, war nicht in der Lage, Vorschläge für eine gegebene Sequenz mit mehr als einer polymorphen Position zu machen (nur für dialleleische SNPs geeignet). Daher wurden die Dispensierreihenfolgen alle ohne Computerunterstützung erstellt. Die inzwischen aktualisierte Softwareversion PSQTM96MA 2.1.1 erlaubt die Eingabe von mehreren di-, tri- und tetra-allelischen SNPs. Die Anzahl der SNPs für die eine geeignete Dispensationsorder und die zugehörigen theoretischen Histogramme berechnet werden kann, ist durch die Rechenleistung des Computers begrenzt. Erfahrungsgemäß können in angemessener Zeit die Kombinationen für bis zu 7 polymorphe Basenpositionen berechnet werden. So wurden im Nachhinein die manuell erstellten Dispensierreihenfolgen nochmals überprüft und teilweise verändert.

2.2.5 HLA-Typisierungsmethoden

Zur Überprüfung von Ergebnissen der HLA-Typisierung mittels Pyrosequencing von unbekanntem Proben wurden verschiedene kommerziell erhältliche Typisierungskits eingesetzt. Je nach gewünschter Auflösung und Fragestellung wurden eine oder mehrere der hier genannten Methoden benutzt.

INNO-LiPA-SSO

Die Typisierung mit Sequenz-spezifischer Oligohybridisierung mit INNO-LiPA-Kits beginnt mit der Amplifikation der zu untersuchenden Exone mittels PCR-Mastermix, wobei biotinylierte Amplifikate entstehen. Diese werden chemisch denaturiert und mit spezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert, die sich als parallele Banden auf Membanstreifen befinden. Die Hybridisierungsreaktion, die anschließenden stringenten Waschschriffe und die Färbereaktion mittels alkalischer Phosphatase und einem Chromogen erfolgen im Auto-LiPA-Gerät. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgt durch Einscannen der Membranstreifen und Evaluation durch das zugehörige Programm LiRASTM.

Sequenzierung-basierte Typisierung (SBT)

Zur Sequenzierung wurden die allele SEQR HLA Sequencing Kits der Firma Atria Genetics benutzt. Die zu untersuchenden Genabschnitte werden mit einer PCR-Amplifikationsmischung im Thermocycler vermehrt. Das Amplikon wird durch Zugabe

von Exonuclease und alkalischer Phosphatase (ExoSAP-IT®) behandelt, um überschüssige Primer und dNTPs zu entfernen und dient anschließend als Vorlage bei der Sequenzierreaktion mit speziellen Sequenzierprimern und BigDye™ Terminatoren. Anschließend erfolgen eine Ethanol-fällung und eine Detektion im automatischen DNA-Sequencer. Die Auswertung erfolgt über eine spezielle Software zur Allel-Typisierung (Assign SBT, Conexio Genomics).

Sequenz-spezifisches-Priming (SSP)

Die „Olerupp SSP“-Kits enthalten, vorgefertigte PCR-Platten, in denen die verschiedenen spezifischen Primermixe bereits vorpipettiert vorliegen. Mastermix, Taq-Polymerase und DNA werden in die Platte pipettiert und nach Herstellerangaben im Thermocycler inkubiert. Die PCR-Reaktionen sollen bei passendem Primer positiv verlaufen, bei nicht passendem Primer negativ. Die PCR-Produkte werden auf ein Agarosegel aufgetragen. Dadurch entsteht auf dem Gel ein Bandenmuster. Die Interpretation erfolgt über das Auswerteprogramm „HELMBERG-SCORE“, wobei die positiven und negativen Reaktionen eingegeben werden.

2.3 Statistische Berechnungen

In so genannten Fall-Kontroll-Studien („case-control studies“) werden Patienten mit einer bestimmten Erkrankung oder einem bestimmten Phänotyp mit Kontrollpersonen verglichen, welche nicht von der Erkrankung bzw. dem Phänotyp betroffen sind. In der speziellen Anwendung im HLA-Bereich werden die HLA-Genotypen der Probanden ermittelt und dann die entsprechenden Allelfrequenzen in den beiden Gruppen miteinander verglichen. Der statistische Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen erfolgt mit einer „Vierfeldertafel-Analyse“, für jedes untersuchte Antigen. Dabei werden Werte für die Stärke der Assoziation und der statistischen Signifikanz berechnet. Die Stärke wird beschrieben durch das relative Risiko (Kreuzprodukt Quotient). Dieser Risikowert beschreibt, um wie viel Mal häufiger die Krankheit bei Personen auftritt, die das entsprechende Antigen besitzen, als bei denen, die es nicht haben. Ist ein Antigen präsent bei allen, oder fehlt es bei allen Patienten, wird das relative Risiko so nicht berechenbar, man verwendet dann die „Haldanes Modifikation“.

	Anzahl der Individuen		
	Kontrollen	Patienten	Total
HLA-XY positiv	a	b	a + b
HLA-XY negativ	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	N = a + b + c + d

Relatives Risiko:

$$\text{Woolf } x = \frac{ad}{bc}$$

$$\text{Haldanes } x = \frac{(a + \frac{1}{2})(d + \frac{1}{2})}{(b + \frac{1}{2})(c + \frac{1}{2})}$$

Die statistische Signifikanz einer Assoziation kann zum Beispiel über Fishers exakten Test oder den Chi-Quadrat Test bewertet werden. Der Fisher Test ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, Unterschiede zwischen den Werten wie den ermittelten oder größer zu finden. Er ist aber nur zuverlässig, wenn eine der Zahlen in der Vierfeldertafel kleiner als fünf ist, kann aber für größere Probenanzahlen angepasst werden. Sind die zu erwartenden Zahlen größer als fünf ist der Chi-Quadrat Test ausreichend. Gelegentlich wird die Yates Korrektur für Diskontinuität verwendet in dem man den Nenner durch $([ad - bc] - N/2)^2N$ ersetzt. Diese Stetigkeitskorrektur für Chi-Quadratwerte empfiehlt sich vor allem für kleine Stichproben, da nur ganze Zahlen in die Vierfeldertafel eingetragen werden. Bei Werten um 100 macht die Abweichung um 1 nur etwa 1% aus, bei einem Wert von 5 macht eine Abweichung von 1 aber 25% aus. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben, unter welcher Stichprobengröße sie verwendet werden sollte. Für die Berechnungen in dieser Arbeit wurde sie immer verwendet, wenn einer der Werte der Vierfeldertafel kleiner oder gleich 5 war (nach den Empfehlungen von Tefvik Dorak, Workshop, BSHI 2002 Meeting).

Signifikanz, Fishers exakter Test:

$$P = \frac{a!b!c!d!N!}{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}$$

Chi Quadrat (mit einem Freiheitsgrad)

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Chi Quadrat mit Yates Korrektur

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 N}{([ad - bc] - N/2)^2 N}$$

Die Testung einer Signifikanz ist wichtig, weil das relative Risiko hoch sein kann, aber wenig signifikant (bei geringer Anzahl Patienten und/oder Kontrollen) und umgekehrt, bei einer großen Probenanzahl kann ein Risikowert, welcher nur relativ wenig Abweichung zeigt, hochsignifikant sein.

Oft werden Studien dahin gehend konzipiert, dass die Anzahl der Kontrollen genauso groß ist wie die Anzahl der Patienten. In vielen Fällen ist es aber auch angezeigt, eine möglichst hohe Anzahl von Kontrollen zu haben, da dies eine genauere Berechnung der normalen Allelfrequenzen in der Bevölkerung erlaubt und die statistische Signifikanz einer Assoziation erhöhen kann. So können populationsspezifische Marker erkannt und eingeordnet werden.

Werden in einer Studie mehrere Loci an Patienten und Kontrollen untersucht und verglichen kann schnell zufällig eine „signifikante“ Abweichung am 5%-Wert an einem der Loci auftreten, obwohl kein wirklicher Unterschied besteht. Dieses Phänomen, welches auch als Typ I oder Alpha-Error bezeichnet wird, kann umgangen werden, in dem man die P-Werte mit der Anzahl der untersuchten Loci multipliziert.

P-Werte können nach folgendem Schema gewertet werden:

$0,05 > P > 0,01$	eventuell signifikant
$0,01 > P > 0,001$	signifikant
$P < 0,001$	hoch signifikant

Ein P-Wert von 0,05 bedeutet, dass die beobachtete Abweichung in einem von 20 Zufallstests gefunden werden würde, obwohl es keinen Zusammenhang gibt und „eins von zwanzig“ ist kein seltenes Ereignis. Folge- und Zweitstudien sind ein guter Weg Assoziation zu bestätigen oder auszuräumen.

Zur Berechnung der statistischen Werte wurde das Vierfeldertafel-Skript der Universität Münster verwendet, zu finden unter:

<http://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skripte/biomathe/bio/vierf.html>

In die Eingabemaske werden die entsprechenden Zahlen eingetragen, die Berechnung der Werte erfolgt dann mit Hilfe eines Javaskriptes.¹

Vierfeldertafel-Analyse

Ende | Neustart | Hilfe

*	Zielergebnis - nein	Zielergebnis - ja	Summe
Risiko Faktor - ja bzw. Test positiv	33	40	73
Risikofaktor - nein bzw. Test negativ	39	126	165
Summe	72	166	238

Löschen | Berechne

Chi-Quadrat ohne Yates-Korrektur	FG	p-Wert
11.15855	1	0.00084

Chi-Quadrat mit Yates-Korrektur	FG	p-Wert
10.15974	1	0.00144

Exakter Fisher-Test p-Wert

0.00124

Statistik	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Odds Ratio	0.37518	0.20050	0.70103
Relatives Risiko	0.71755	0.56309	0.89367
Pos. präd. Wert	0.54795	0.42705	0.66483
Neg. präd. Wert	0.23636	0.17380	0.30865
Sensitivität	0.24096	0.17807	0.31335
Spezifität	0.54167	0.42004	0.65975

Abb. 2.4 - Screenshot der online Applikation „Vierfeldertafel-Analyse“ der Universität Münster

¹ Dieses Javascript (ohne den exakten Fisher-Test) stammt von Prof. J.C. Pezzullo, <http://members.aol.com/johnp71>, Georgetown University, USA. Die englische Originalversion ist unter der folgenden URL zu finden (<http://members.aol.com/johnp71/ctab2x2.html>). Die relativ ungenaue Approximation zur Berechnung des p-Werts für einen gegebenen Chi-Quadrat-Wert mit einem Freiheitsgrad (Quadrat der Standardnormalverteilung) wurde durch ein Javascript von William Knight, University of New Brunswick - Canada für die Normalverteilung ersetzt. In der Originalversion sind die Ergebnisse für Sensitivität/Spezifität und Positiver/Negativer Prädiktiver Wert vertauscht. Dies wurde korrigiert. Die Konfidenzintervalle für Odds Ratio und Relatives Risiko werden nach der iterativen Methode von Gart/Cornfield berechnet. Eine Darstellung dieser Methode befindet sich im Buch von Fleiss, J.L. Statistical Methods for Rates and Proportions. Wiley 1981. In der Originalversion wird diese Methode fälschlicherweise auch zur Berechnung der Konfidenzintervalle für die Sensitivität, Spezifität, Positiver und Negativer Prädiktiver Wert benutzt. Wir berechnen stattdessen für diese Größen das exakte Konfidenzintervall für binomialverteilte Anteilswerte. Das Javascript zur Berechnung des exakten Fisher Tests stammt von Øyvind Langsrud, MATFORSK, Norwegian Food Research Institute, <http://www.matforsk.no/ola>. Der Link zur englischen Originalversion befindet sich hier (<http://www.matforsk.no/ola/fisher.htm>). Die deutsche Version stammt von Wolfgang Köpcke

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Pyrosequencing-Strategien für die Typisierung von hochpolymorphen HLA-Genorten zu entwickeln. Begonnen wurde mit dem Genort HLA-DQB1, da dieser Locus mit rund 60 bekannten Allelen im Vergleich zu anderen wichtigen funktionellen HLA-Loci der mit der geringsten Polymorphie ist. Der deutlich komplexere Genort HLA-DRB1 schloss sich an. Dieser Locus ist mit über 400 Allelen wesentlich polymorpher und durch die Vielzahl von verwandten funktionellen Genen sowie Pseudogenen komplizierter zu analysieren. Die Sequenzstruktur erlaubt aber eine recht übersichtliche Gruppeneinteilung. Abschließend wurde der polymorphste HLA-Genort, der Klasse I Genort HLA-B bearbeitet, für den über 700 Allele in der Datenbank zu finden sind. Die Entwicklung einer Pyrosequencing basierten Strategie für den Klasse I Locus HLA-A wurde im Rahmen einer Diplomarbeit bearbeitet. Begonnen wurde für jeden der Loci jeweils damit, geeignete PCR-Primer zu erstellen und praktisch zu testen. Parallel dazu wurden Sequenzierprimer in konservierten Sequenzbereichen erstellt und geeignete Dispensierreihenfolgen für das Pyrosequencing formuliert.

3.1 HLA-DQB1-Typisierung

Die Prozedur besteht aus den folgenden Stufen:

1. Generische Amplifikation der DQB1-Exon 2-Region
2. Aufreinigung und Denaturierung der amplifizierten Template DNA zur ssDNA
3. Pyrosequenzierung verschiedener polymorpher Bereiche
4. Auswertung der Pyrogramme
5. Gegebenenfalls zusätzliche Amplifikation des Exon 3 und Pyrosequenzierung

Für die Amplifikation des Exon 2 des Genortes HLA-DQB1 wurden verschiedene Vorwärts- und Rückwärtsprimer getestet. Die Kombination der Primer DQB-AmpB-F und DQB-Amp-INT-R ergaben PCR-Produkt von 260 bp Länge welches in der nachfolgenden Sequenzierung zu intensiven Pyrosequencing Signalen führt. Das Amplifikat wird in 5 Pyrosequencing Schritten sequenziert. Zusätzlich besteht die Möglichkeit das Exon 3 zu amplifizieren und mittels zwei Sequenzierschritten zu untersuchen. Ein weiterer Sequenzierprimer im Exon 2 kann im Falle der Amplifikation mit alternativen, im Intronbereich liegenden Primern eingesetzt werden.

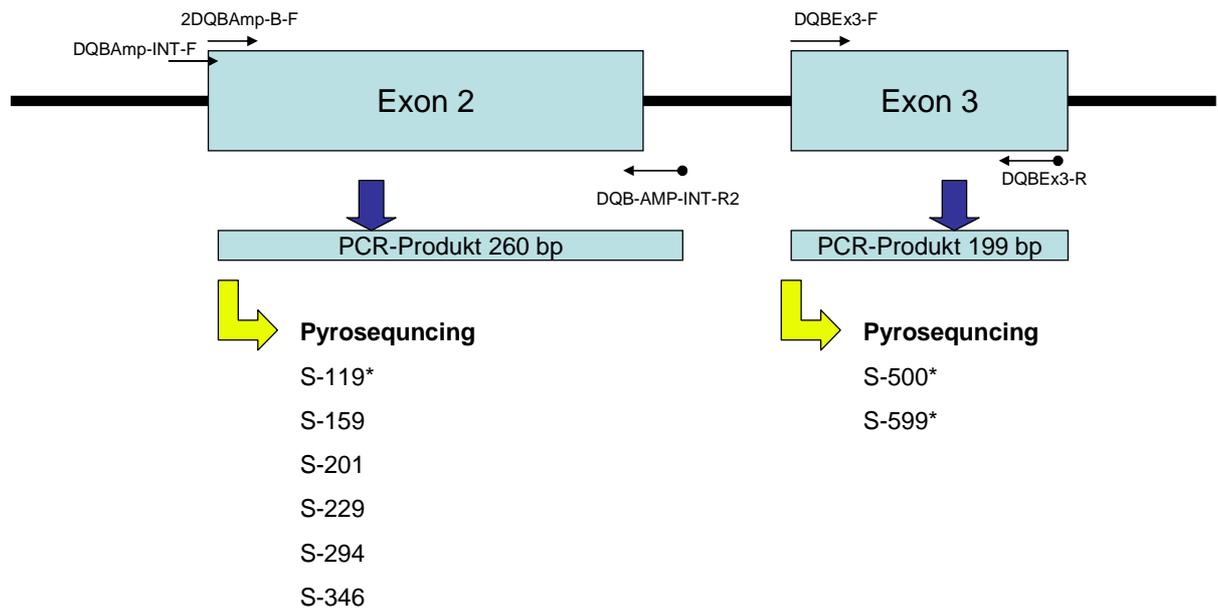


Abb. 3.1 - Schematische Darstellung der Pyrosequencing-basierten Typisierungsstrategie für die polymorphen Regionen Exon 2 und 3 des HLA-DQB1 Genortes. Die mit Sternchen markierten Sequenzierprimer werden nur in bestimmten Fällen zur Untersuchung benötigt.

In der Abbildung 3.1 sind diese Schritte schematisch dargestellt. Zur Auswertung der Typisierung wurden die Pyrogramme mit den bekannten Allelsequenzen verglichen. Zu diesem Zweck wurden Auswertebögen mit den Sequenzen und polymorphen Positionen erstellt. Durch die Auswertung des Pyrogramms des Sequenzierprimers S-346 lässt sich eine grobe Einteilung der DQB1-Allele in Gruppen vornehmen. Um dann die Allel-Gruppen genauer aufzulösen, werden die Informationen aus weiteren Pyrosequencingschritten einbezogen (siehe Abb. 3.2). Aus den Sequenzinformationen werden die in Frage kommenden Allele ausgewählt, nicht passende Allele werden ausgeschlossen. Die meisten Allelkombinationen können durch die Analyse des Exon 2 erfolgreich untersucht werden. Nur zur Auflösung der Allele HLA-DQB1*0201 und *0202 und HLA-DQB1*0301 und *0309 liegen entscheidende polymorphe Informationen im Exon 3, so dass eine Amplifikation des Exon 3 nötig ist.

Die Sequenzierprimer wurden so gelegt, dass sie in konservierten Regionen der DQB1 Region liegen, ihr 3'-Ende aber kurz vor einem zu untersuchenden Polymorphismus liegt. Bei der Erstellung der Dispensationsreihenfolgen wurden alle Kombinationen der bis dato bekannten DQB1-Allele berücksichtigt.

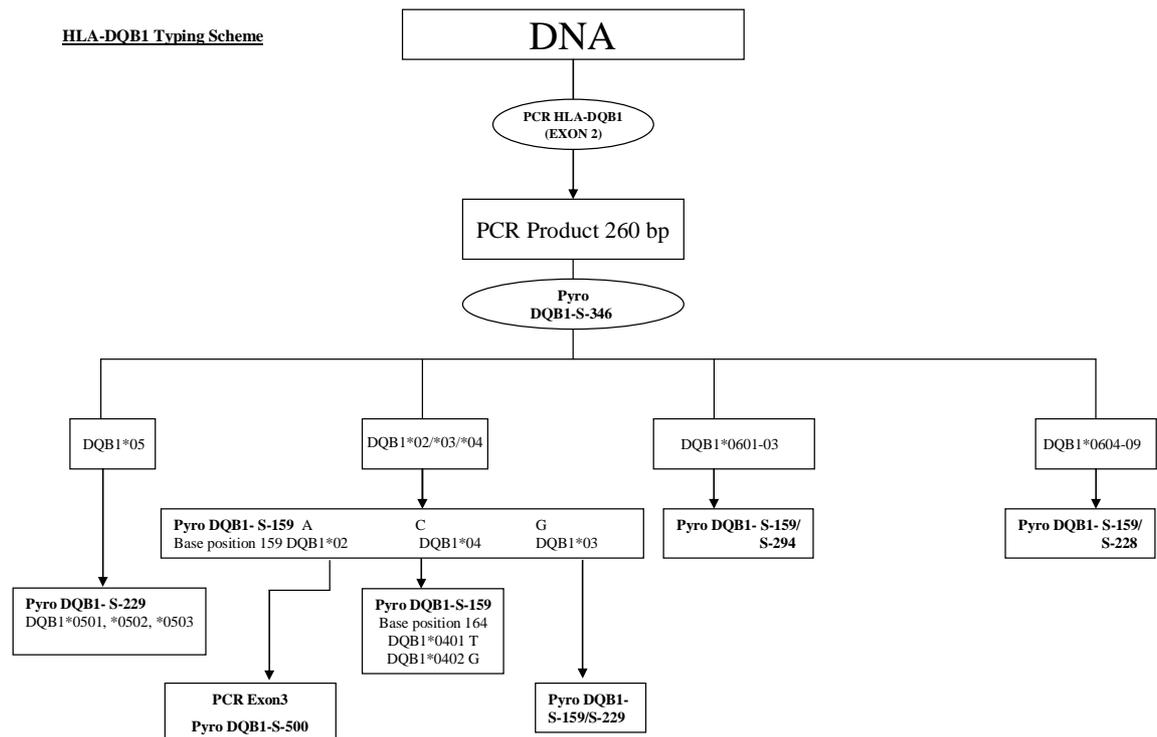


Abb. 3.2 - HLA-DQB1-Schema. Durch den Sequenzierungsschritt mit dem Sequenzierprimer DQB-S-346 lässt sich eine Zuordnung des untersuchten Allels in eine der 4 DQB1-Gruppen vornehmen. Durch die weiteren Sequenzierschritte wird weiter aufgelöst.

3.1.1 HLA-DQB1-PCR-Bedingungen

Zur Amplifikation des Exon 2 wurden drei Vorwärts- und drei Rückwärtsprimer (Tabelle 3.1) in 5 verschiedenen Kombinationen getestet (Tabelle 3.2). Das beste Produkt mit den intensivsten Signalen ergab sich mit den Primern DQB-AmpB-F und DQB-Amp-INT-R („Kombi5“). Nachteil dieser Primer-Kombination ist, dass der Vorwärtsprimer bereits im Exon 2 liegt, so dass eine Region von 49 Basen Länge nicht durch Pyrosequenzierung untersucht werden kann. Es werden 5 polymorphe Basenpositionen nicht abgefragt, wobei zwei davon keinen Aminosäure Austausch hervorrufen. In Fällen, in denen für eine bestimmte Fragestellung dieser Bereich entscheidend sein könnte, muß eine weitere PCR mit zusätzlichen Primern durchgeführt werden, die im Intronbereich liegen („Kombi3“).

Tab. 3.1 - PCR-Primer für die HLA-DQB1-Typisierung

Name	Position	Funktion	Sequenz	Markierung
2DQBAMP-B-F	Ex2 135 - 155	PCR-Primer-F	CATGTGCTACTTCACCAACGG	
2DQBAMP-B-R	Ex2 328-348	PCR-Primer-R	CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC	5'-Biotin
DQB-AmpF-PYRO	Ex2 127 - 150	PCR-Primer-F	TTTAAGGGCATGTGCTACTTCACC	
DQB-AMP-INT-F	Int1 -14 – Ex2 115	PCR-Primer-F	ATTCCTCGCAGAGGATTTTCG	
DQB-AMP-INT-R	Ex2 265 bis Int2 +15	PCR-Primer-R	GGCGACGACGCTCACCTC	5'-Biotin
DQB-AMP-INT-R-2	Int 2 42-59	PCR-Primer-R	CTCCTGGCGCAGAGACTT	5'-Biotin
DQBEx3-F	Ex3 44-63	PCR-Primer-F	CAACCACCACAACCTGCTGG	
DQBEx3-R	Ex3 224-242	PCR-Primer-R	CACGTGGCAGGTGTAGACG	5'-Biotin

Tab. 3.2 - Getestete Primer Kombinationen für DQB1-Exon2

	Kombi1	Kombi2	Kombi3	Kombi4	Kombi5
2DQBAMP-B-F	X				X
2DQBAMP-B-R	X	X		X	
DQB-AmpF-PYRO		X			
DQB-AMP-INT-F			X	X	
DQB-AMP-INT-R			X		
DQB-AMP-INT-R-2					X

Die optimalen Primerkombinationen sind grau unterlegt dargestellt.

Die PCRs wurden in einem Maßstab von 25 µl durchgeführt. Die Amplifikationen wurden in Bezug auf Annealingtemperatur und Magnesiumkonzentration optimiert. Die Zusammensetzungen der Reaktionsmischungen sind folgende:

PCR: Kombi5		µl
DNA	2-20 ng/µl	3
Puffer	Gene Amp10xPCR-BufferII, Applied Biosystems	2,5
Magnesiumchlorid	25 mM, Applied Biosystems	1,5
dNTPs	je 2mM, Sigma	1
Primer-F	10 mM, DQB-AmpB-F	0,5
Primer-R	10 mM, DQB-AMP-INT-R-2	0,5
Taq-Polymerase	5U/µl, Applied Biosystems	0,1
ddH ₂ O	Aqua ad iniectabilia, Braun	15,9
Gesamtvolumen		25

PCR-Cycler-Programm: Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, 40 Zyklen mit 95°C für 30 Sekunden, Annealing Temperatur von 56°C für 30 Sekunden und Elongationsschritt bei 72°C für 90 Sekunden und eine abschließende Elongation von 10 Minuten bei 72 °C.

PCR: Kombi3		µl
DNA	2-20 ng/µl	3
Puffer	Gene Amp10xPCR-BufferII, Applied Biosystems	2,5
Magnesiumchlorid	25 mM, Applied Biosystems	3
dNTPs	je 2mM, Sigma	1
Primer-F	10 mM, DQB-Amp-INT-F	0,5
Primer-R	10 mM, DQB-AMP-INT-R	0,5
Taq-Polymerase	5U/µl, Applied Biosystems	0,1
ddH ₂ O	Aqua ad iniectabilia, Braun	14,4
Gesamtvolumen		25

PCR-Cycler-Programm: Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, 40 Zyklen mit 95°C für 30 Sekunden, Annealing Temperatur von 60°C für 30 Sekunden und Elongationsschritt bei 72°C für 90 Sekunden und eine abschließende Elongation von 10 Minuten bei 72 °C.

PCR: Exon 3		µl
DNA	2-20 ng/µl	3
Puffer	10x NH ₄ -Buffer, Invitek	2,5
Magnesiumchlorid	50 mM, Invitek	1
dNTPs	je 2mM, Sigma	1
Primer-F	10 mM, DQB-Ex3-F	0,5
Primer-R	10 mM, DQB-Ex3-R	0,5
Taq-Polymerase	5U/µl, Applied Biosystems	0,1
ddH ₂ O	Aqua ad iniectabilia, Braun	16,4
Gesamtvolumen		25

PCR-Cycler-Programm: Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, 40 Zyklen mit 95°C für 30 Sekunden, Annealing Temperatur von 60°C für 30 Sekunden und Elongationsschritt bei 72°C für 30 Sekunden und eine abschließende Elongation von 10 Minuten bei 72 °C.

3.1.2 Pyrosequencing von HLA-DQB1

Die speziellen Dispensierreihenfolgen sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Nach der Amplifikation des PCR-Produktes erfolgt ein erster Pyrosequencing Schritt mit dem Sequenzierprimer S-346. Durch das Ergebnis dieses Schrittes ist bereits eine grobe Einteilung der vorhandenen Allele in 4 Gruppen möglich. Zur Auflösung der Allele sind dann maximal 4 weitere Pyrosequencing Schritte nötig (Abb.3.2). Die Unterscheidung der Allele DQB1*0201 und DQB1*0202 ist nur an Hand eines Sequenzabschnitts im Exon 3 möglich. Das gleiche gilt auch für die Diskriminierung zwischen DQB1*0301 und DQB1*0309. Das Vorkommen des Allels DQB1*0309 ist in der europäischen Population jedoch extrem selten, lediglich im südostasiatischen Raum wird es mit einer Frequenz von 0,006 in der Datenbank genannt (www.ncbi.nlm.nih.gov/mhc/MHC.cgi?cmd=init). So wurde die Untersuchung des Exon 3 nur für die DQB1*02 Typisierung eingesetzt.

Zur Optimierung des Pyrosequencing schlossen sich Versuche an, bei denen die Menge der eingesetzten Dynabeads, die Menge des eingesetzten PCR-Produktes und der Einsatz von Single-Stranded-Binding-Protein (SSB) variiert wurden. Dieses Protein bindet an einzelsträngige DNA-Stränge und stabilisiert sie, so dass das Anhybridisieren des 3'-Endes verhindert wird. Auch verschiedene Methoden der Aufreinigung und mögliche Modi der Software wurden getestet. Es stellte sich heraus, dass bei schwachen Pyrogrammen wie beiden PCR-Produkten mit den Intronprimern (Kombi 3), durch die Erhöhung der PCR-Produktmenge auf 45 µl und eine Erhöhung der Dynabeads Menge von 8 auf 12-15 µl bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Nutzung des SQA-Modus (Sequenziermodus der Pyrosequencing-Software, nur für homozygote Sequenzen vorgesehen) im Zusammenhang mit einer Streptavidin-beladenen Sepharose zur Aufreinigung ergab keine Verbesserung der Ergebnisse.

Tab. 3.3 - Sequenzierprimer und Dispensierreihenfolgen für die HLA-DQB1 Typisierung

Sequenzierprimer	Primer Sequenz (5'-3')	Dispensierreihenfolgen
DQB-S-119*	CGCAGAGGATTTTCGT	TGTAGCAGTAGCAT
DQB-S-159	CTTCACCAACGGGAC	CAGCAGCGCGTGCCTGTCTGTGAGCAGAGCTA
DQB-S-201	CATCTATAACCGAGA	AGAGTATCGTCAGC
DQB-S-229	TCGACAGCGACGTG	CGAGCTAGTATCGCAGCTGAGTGACGCTGCATGCT CGCTAGTC
DQB-S-294	GGAACAGCCAGAAGGA	TCATGTCTGAGAGACGAGCAGTCGTGACACGAGTA
DQB-S-346	TGCAGACACAACACTAC	GCAGTGCAGCTACATCGCACGATCTGCAGACGAC
DQB-Ex3-S-500	GGTGGTTTCGGAATG	TAGCAGA
DQB-Ex3-S-599	AATGACTCCCCAGCA	TGCAGACG

Insgesamt wurde das HLA-DQB1 Typing für 20 laboreigene DNA Standard-Proben erfolgreich durchgeführt. Des Weiteren wurde das Verfahren an jeweils 20 DNA-Proben der Ringversuche des DZA aus den Jahren 2002 und 2003 evaluiert. Die Resultate stimmten mit den Ergebnissen der Ringversuche auf dem 4 Stellen Niveau völlig überein. Insgesamt wurden zu Evaluierungszwecken etwa 50 DNA-Proben typisiert und mit früheren Typisierungsergebnissen anderer Methoden verglichen. Dabei wurden 14 verschiedene HLA-DQB1-Allele in verschiedenen Kombinationen blind typisiert, was bei Betrachtung auf vierstelligem Niveau 78% der häufigen (Allelfrequenz > 0,1% in der europäischen, weißen Bevölkerung) Allele entspricht.

Die Methode wurde in der Veröffentlichung „New strategies for efficient typing of HLA class-II loci DQB1 and DRB1 by using PyrosequencingTM“ (Entz et al., 2005) zusammen gefasst dargestellt.

3.2 HLA-DRB1-Typisierung

Der DRB1-Genort ist nicht nur deutlich polymorpher als der DQB1-Genort, dazu kommt, dass die HLA-DR-Subregion zusätzliche Gene, nämlich DRB2 bis 9 und DRA enthält, die je nach Haplotyp in unterschiedlicher Anzahl vorliegen können (Abb. 3.3). So besitzt wohl kein Individuum alle 10 Loci, aber alle den DRA-Genort und eine variable Zahl an DRB-Genorten. Bei DRB2, 6, 7, 8 und 9 handelt es sich um Pseudogene. Bei der Primerauswahl muss berücksichtigt werden, dass sich diese Gene von ihrer Sequenz z.T. stark ähneln. Die Erarbeitung der Pyrosequencing Strategie für den HLA-DRB1 Genort gestaltete sich daher anspruchsvoller, als für den HLA-DQB1-Genort.

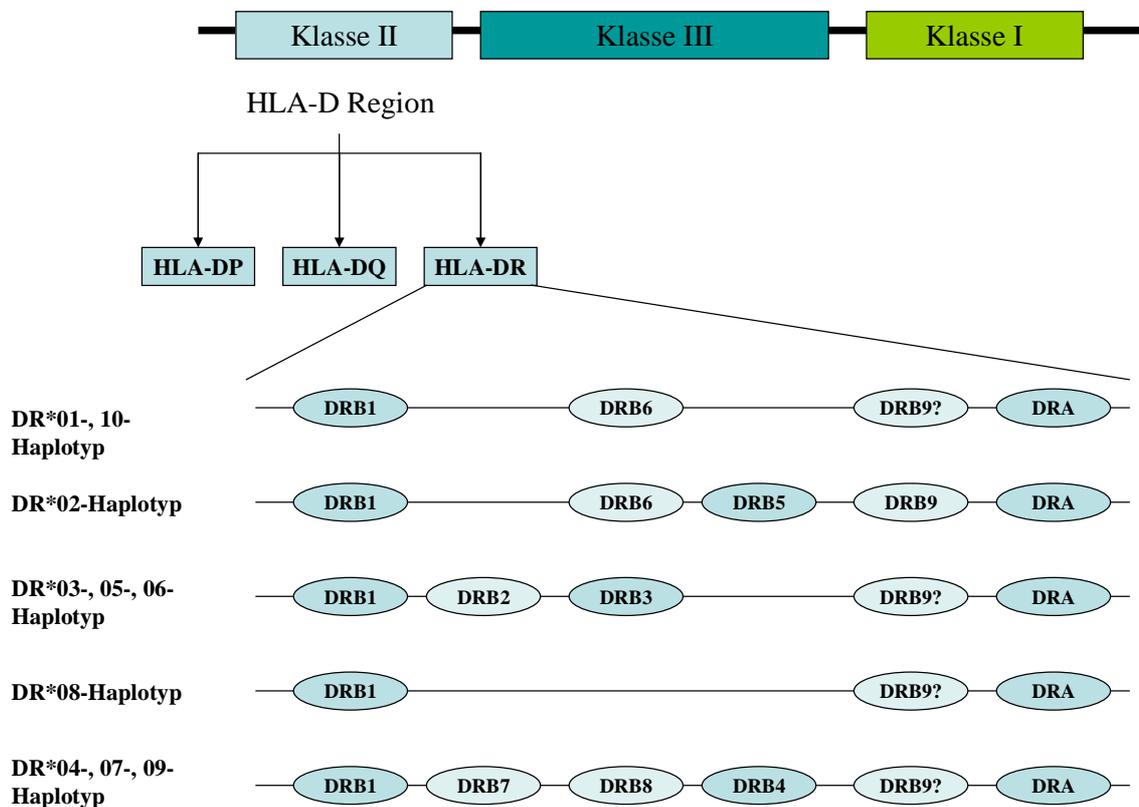


Abb. 3.3 - Organisation der DR Subregion. Je nach Haplotyp ist eine unterschiedliche Anzahl von DR-Genorten präsent. Die nicht exprimierten Pseudogene sind heller gefärbt dargestellt. DRB9 ist mit einem „?“ gekennzeichnet, wenn der Haplotyp das Pseudogen nicht in allen Fällen enthält (nach Tsuji et. al., 1991).

Die erarbeitete Strategie beinhaltet folgende Schritte:

1. Allelgruppenspezifische Amplifikation zur Vortypisierung
2. Spezifische Amplifikation der einzelnen Allelgruppen
3. Aufreinigung und Denaturierung des amplifizierten Templates zur ssDNA
4. Pyrosequenzierung der polymorphen Bereiche
5. Auswertung der Pyrogramme

Aufgrund der Problematik der hohen Alleldiversität des DRB1-Genortes wurde die Sequenzierung mit einer gruppenspezifischen PCR gekoppelt. Dazu wurden bereits mehrfach in der Literatur evaluierte Primerkombinationen auf ihre Eignung innerhalb der Pyrosequencing-Strategie geprüft. Die zu untersuchende DNA-Probe wird mit acht verschiedenen Forward-PCR-Primern (Wu et al., Molecular Diagnosis 1996, siehe Tabelle 3.5) amplifiziert. Das Vorhandensein bzw. nicht-Vorhandensein der PCR-Produkte wird dann in einer Gelelektrophorese überprüft. Alternativ dazu kann diese Überprüfung auch nicht-elektrophoretisch mittels PicoGreen Messung (Hampe et al., 2004) erfolgen. Durch die PCR erhält man entweder zwei Fragmente aus verschiedenen Gruppen, oder ein einzelnes PCR-Produkt, wenn beide Allele des Individuums in der gleichen Gruppe liegen oder das Individuum homozygot für den HLA-DRB1 Locus ist. Je nach Allelgruppe erfolgen dann 1 bis 7 Pyrosequencing Reaktionen (Abb. 3.5). Die Anzahl der Pyrosequencing Schritte, die notwendige Sequenzierlänge und die damit untersuchten polymorphen Reste sind je nach Gruppe unterschiedlich (siehe Tabelle 3.6).

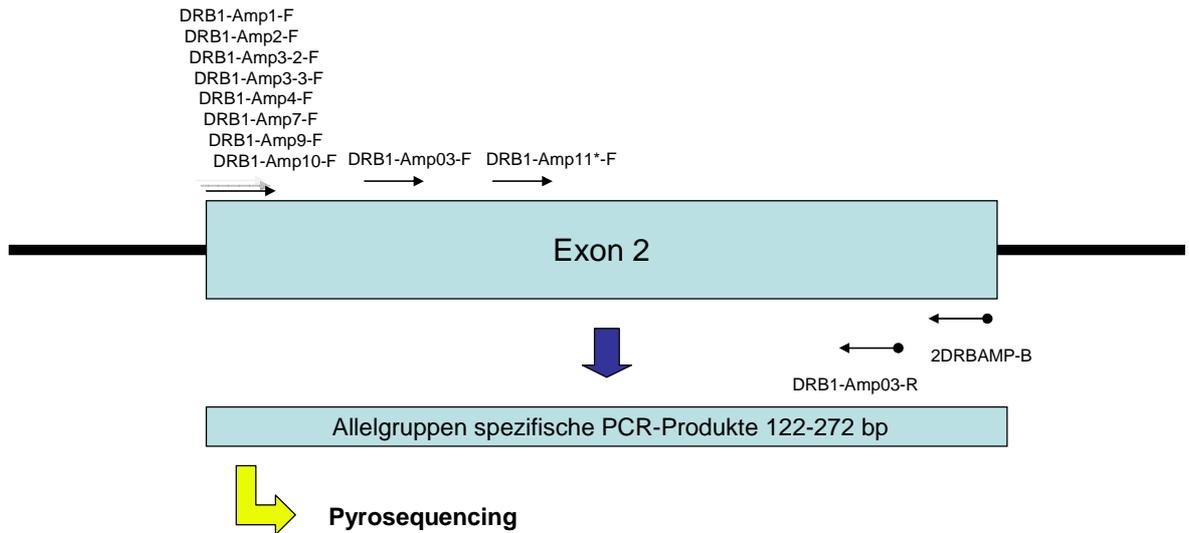


Abb. 3.4 - Schematische Darstellung der Pyrosequencing-Strategie für HLA-DRB1

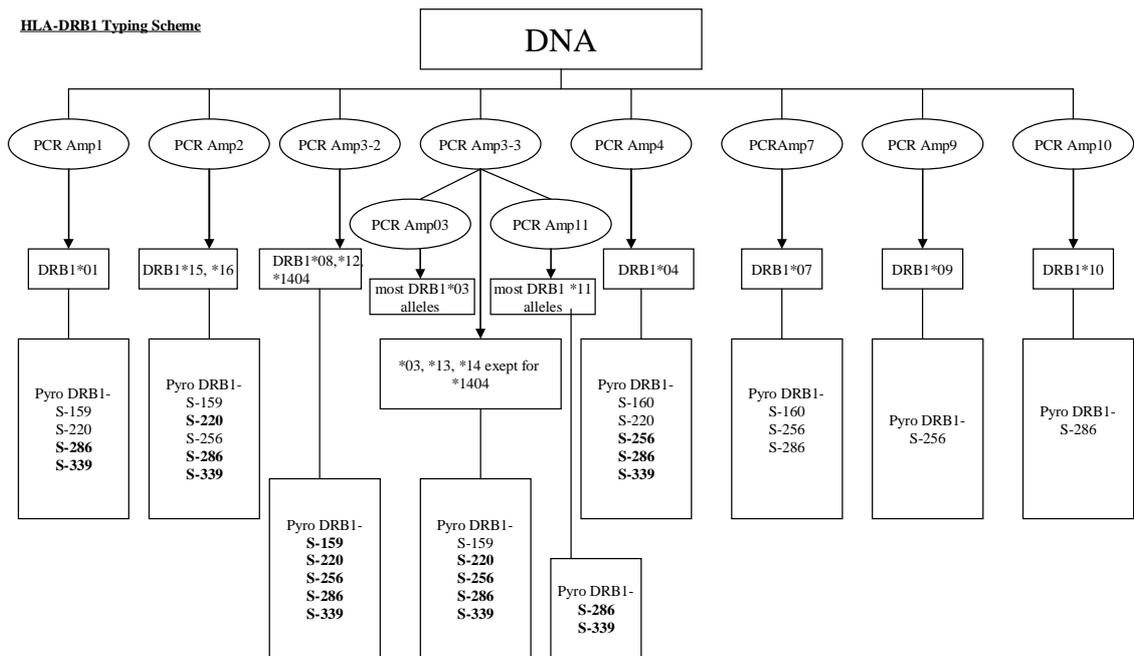


Abb. 3.5 - HLA-DRB1 Typing Schema. Durch die PCR-SSP werden die Allele vortypisiert und in die entsprechenden Gruppen sortiert. Die Pyrosequencing-Reaktionen sind spezifisch auf die jeweilige Allelgruppe angepasst. Fett gedruckte Sequenzierprimer bezeichnen die Schritte, die nötig sind, um mindestens die in der europäischen Population häufigen Allele zu typisieren. Weitere Sequenzierschritte können zu einer höheren Auflösung führen.

Tab. 3.5 - Primer zur Amplifikation von HLA-DRB1

Primer Name	Position	Sequenz (5'-3')	Länge	Spezifität*
DRB1-Amp1 ¹⁾ 2DRBAMP-B	6 - 25	TTCTTGTGG(C/G)AGCTTAAGTT	261 bp	*01
DRB1-Amp2 ¹⁾ 2DRBAMP-B	6 - 26	TTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG	261 bp	*15, *16
DRB1-Amp3-2 ¹⁾ 2DRBAMP-B	3 - 25	CGTTTCTTGGAGTACTCTACGGG	264 bp	*08 außer 0820, *12, *1105, *1317, *1404/11/15/28/31
DRB1-Amp3-3 ¹⁾ 2DRBAMP-B	3 - 25	CGTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	264 bp	*03, *0820, *11 außer 1105/22/30, *13 außer 1317, *14 außer 1404/10/11/15/28/31/39
DRB1-Amp4 ¹⁾ 2DRBAMP-B	4 - 24	GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC	263 bp	*04, *1410, *1122
DRB1-Amp7 ²⁾ 2DRBAMP-B	8 - 27	CCTGTGGCAGGGTAA(G/A)TATA	259 bp	*07
DRB1-Amp9 ²⁾ 2DRBAMP-B	-6 -12	CCCAACCACGTTTCTTGA	272 bp	*09
DRB1-Amp10 ¹⁾ 2DRBAMP-B	-4 - 15	AGACCACGTTTCTTGGAGG	270 bp	*10
2DRB-AMP-B ³⁾	247 - 266	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT		alle
DRB1-Amp03-F ²⁾ DRB1-Amp03-R ²⁾	75 - 96 207 - 225	TACTTCCATAACCAGGAGGAGA TGCAGTAGTTGTCCACCCG	151 bp	*03 außer *0304/09/11/14/15/17
DRB1-Amp3-3 ¹⁾ DRB1-Amp03-R ²⁾	3 - 25 207 - 225	CGTTTCTTGGAGTACTCTACGTC TGCAGTAGTTGTCCACCCG	222 bp	DRB1*0301-*0310,*0312, DRB1*0313,*0316,*0318-*0323, *0325 , *1107
DRB1-Amp03-F ²⁾ 2DRB-AMP-B	75 - 96 247 - 266	TACTTCCATAACCAGGAGGAGA	191 bp	DRB1*0301-*0303, *0305 -*0308, *0310 - *0318, *0319 -*0320, *0324, *1109, *1116, *1120, *1140, *1301, *1302, *1305, *1306, *1309, *1310, *1315, *1316, 1318, *1320, *1326 - *1329,*1331,*1332,*1334,*1335,*1 336, *1339- *1343, *1351, *1353,*1402, *1403,*1406,*1409,*1412,*1413,*1 417, *1418, *1419, *1421,*1424,*1427, *1429, *1430, *1433
DRB1-Amp11*-F 2DRB-AMP-B	144 - 161 247 - 266	CTGGGGCGGCCTGATGAG	122 bp	all *11, *0308, *0415, *1204, *1411

*Spezifitäten Stand 2003.

1) Primersequenz aus Wu et al. ; 2) Primersequenz aus Olerup et al. ; 3) Primersequenz aus dem IHWG XIthWorkshop Protokoll

Die Rückwärtsprimer sind 5' biotinyliert.

3.2.2 Pyrosequencing von HLA-DRB1

Die Aufreinigung, Denaturierung und das Pyrosequencing erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Zur Optimierung von Pyrosequencing Reaktionen, bei denen Pyrogramme entstanden, die einen starken Hintergrund aufwiesen, wurde zur Qualitätsverbesserung Single-Stranded-Binding-Protein (SSB) zugesetzt. In der Literatur (Ronaghi, Analytical Biochemistry, 2000) wird eine Menge von 500 ng empfohlen. Zur Optimierung der SSB-Menge wurden Versuche mit unterschiedlichen SSB-Konzentrationen vorgenommen (siehe auch Abb. 3.6). Es wurden Mengen von 450 bis 2250 ng SSB-Protein pro Ansatz untersucht. Es zeigte sich, dass für diese spezifische Anwendung das Optimum im Bereich von 900 ng SSB pro Ansatz liegt. Die Reaktionen für die die SSB-Protein Zugabe empfohlen wird, sind in der Tabelle 3.7 entsprechend gekennzeichnet.

Tab. 3.6 – Sequenzierprimer für HLA-DRB1

Sequenzierprimer	Position	Sequenz (5'-3')
DRB1-S-160	146-158	GGACGGAGCGGGT
DRB1-S-220	206-219	TCGACAGCGACGTG
DRB1-S-256	243-255	GCTGGGGCGGCCT
DRB1-S-286	270-285	GAACAGCCAGAAGGAC
DRB1-S-339	322-338	TGCAGACACAACACTACGG

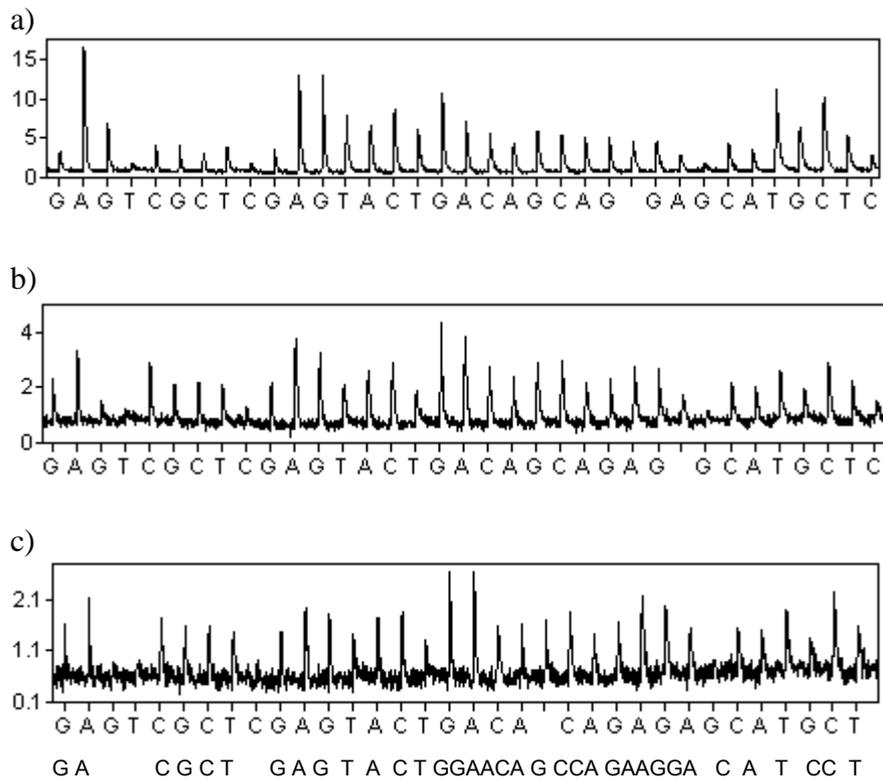


Abb. 3.6 - Beispiel für die Unterdrückung des Hintergrundes mit SSB-Protein in verschiedenen Dosen. Amplikon DRBAmp2, amplifiziertes Allel DRB1*1501, mit Sequenzierprimer S-256, ohne SSB-Protein (a), mit 450 ng SSB-Protein (b) und mit 1350 ng SSB-Protein (c) pro Ansatz.

Tab. 3.7 - Dispensierreihenfolgen Pyrosequencing von HLA-DRB1

Gruppe	Sequenzierprimer	Dispensationsreihenfolge	SSB
Amp1	DRB1-S-159	TGC GTGCTGAGATGCATCT ATACAGAGAGTACGT	-
	DRB1-S-220	CAGCAGTA	-
	DRB1-S-286	GCAGTCTGAGCTACGAGCGCGCGCTGACACTGACTCG	-
	DRB1-S-339	AGCTCGTGCAGAGCTCA	-
Amp2	DRB1-S-159	TGCGTCTGACAGATCGACTCTATATCTAGAGAGTACTG	-
	DRB1-S-220	CGAGTATCGAGTCGTCTGACGAGCT	-
	DRB1-S-256	TGAGTCGCTCGAGTACTGACAGCAGAGAGCATGCTC	+
	DRB1-S-286	CATCTGAGCACGAGCAGCGCGCGCTGTGACACTACTGCA	+
	DRB1-S-339	GAGTGTGAGAGC	-
Amp3-2	DRB1-S-159	CGCGTACTGAGCAGATCACTCTATACAGAGAGTGCATCGT	+
	DRB1-S- 220	CAGAGTATCGCGTGACAGAGCT	+
	DRB1-S-256	CGACGTCTGCGAGTCACTGACA	-
	DRB1-S-286	GCATCTGAGACAGCGCGCTGTGACAC	+
	DRB1-S-339	CGCTGTGAGAGCTCACAGTGCAGCG	-
Amp3-3	DRB1-S-159	CGCAGTACTGAGCAGATACTCTATACGAGAGAGTAGCATCGT CTG	+
	DRB1-S-220	TCGTAGTACTGCGTGACGAGCTGC	+
	DRB1-S-256	CGAGCTCACGAGTACTGA	+
	DRB1-S-286	TCAGTCTGAGCAGAGCGCAGTGACACTACTGC	+
	DRB1-S-339	CGCTAGTGAGAGCTCACAGTGCAGCG	-
Amp3-3 Amp03-R	DRB1-S-159	TGCGTAGCTGACGCA	-
Amp03-F 2DRBAMP-B	DRB1-S-339	CGTGTGCA	-
Amp11	DRB1-S-286	TCAGTCTGAGCAGAGCGCAGTGACACTACTGC	-
	DRB1-S-339	GCTGTGAGAG	-
Amp4	DRB1-S-159	TGCGTCTGACAGATACTCTATCATCGACGAGCAGTATCGTGCA GCTCGAC	+
	DRB1-S-220	CGGAGCGTATCGCTCGTGACTCGAGCT	-
	DRB1-S-256	GAGTCGACGTCGAGTCACATGACTGACA	+
	DRB1-S-286	CATCTGAGCAGCAGAGA	-
	DRB1-S-339	CGTGTGCA	-
Amp7	DRB1-S-159	TGCAGTCTGAGTAGCTCTC	-
	DRB1-S-256	GATCTAGCGCAGTACATGACAGCAGCAGAC	-
	DRB1-S-286	ATCTGAGACAGCGCAGTGACATACGTGTGCAGA	-
Amp9	DRB1-S-256	CGTATCGCTCGAGTACGTG	-
Amp10	DRB1-S-286	GCTCTGAGCAGCGTCTGCGCGT	-

Wie schon im Abschnitt 2.2.4 beschrieben, ist die Reihenfolge der Basenzugabe wichtig, um ein aussagefähiges Pyrogramm zu erhalten. Die Dispensationsreihenfolgen wurden für jede Allelgruppe speziell erstellt, angepasst an die entsprechenden polymorphen Positionen. Die optimierten Dispensierreihenfolgen sind in Tabelle 3.7 zu finden. Die Auswertung der Pyrogramme erfolgte mit speziell erstellten Auswertungsbögen. ein Beispiel ist in Abb. 3.7 gezeigt. Für jede Allelgruppe sind dort die zu erwartenden Sequenzen mit variablen Positionen erfasst. Durch Vergleich mit

den Pyrogrammen wurden die vorliegenden Sequenzen ausgewertet und mit den bekannten Allelsequenzen aus der Datenbank verglichen.

Auswertebogen für DRB-1 – Amp4

DNA-Nr.:

Datum PCR:

Datum Pyro:

Gruppen laut PCR:

Amp4	*04, *1410, *1122
S-160	GCGGTTTCCTGGACAGATACTTCTAAT(A/C)ACC(A/G)AGA(G/A)GAG(T/A)(A/C/T)CGTGC(G/A)(C/G)TTCGAC
S-220	GGGGA(G/C)T(A/T)CCGGG(C/T)GGTGA(C/T)GGAGCT
S-256	(G/A)(A/G)(T/C)(G/A)(C/A/G)(C/T/G)(G/C)AG(T/C)ACTGGAACA
S-286	(C/A/T)TCCTGGA(A/G)(G/C)(A/G)(C/G)(A/G)(G/A)(G/A)
S-339	GG(T/C)TG(G/T)(T/G)GAGAG(C/A)TTCACA

Abb. 3.7 - Auswertebogen für die Pyrogramme von Amplifikaten der Allelgruppe DR4

Um die spezielle Vorgehensweise der Feintypisierung innerhalb einer Gruppe und der Auswertung genauer zu dokumentieren, ist in Abbildung 3.8 das Typing-Schema innerhalb der Gruppe DRB1*04 dargestellt. Hier wird mit Hilfe des Sequenzierprimers DRB1-S-256 das Sequenzmotiv an den Basenpositionen 256-259 untersucht. Während die Motive „GAC“ und „AGC“ bereits eine genaue Allelzuordnung zu lassen („AGC“ nur unter dem Gesichtspunkt, dass nur die häufigen Allele in Betracht gezogen werden, ansonsten sind noch 11 weitere DRB1*04er Allele mit diesem Motiv in der Datenbank), erfordert der Fall „GAT“ weitere Pyrosequencing Ergebnisse zur Allelidentifizierung. Die nächste wichtige Basenposition ist die 286, welche mit dem Sequenzierprimer DRB1-S-286 untersucht wird. Ein „A“ an dieser Stelle deutet auf das Allele *0402 und vier weitere Möglichkeiten, welche aber zu den seltenen Allelen gehören). Wird an der Position ein „C“ detektiert, ist eine Sequenzierung bis zur Base 308 erforderlich und

zusätzlich die Information aus der Pyrosequencing-Reaktion mit dem Sequenzierprimer DRB1-S-339, um die weiteren Allele differenzieren zu können. Sollte an der Position 286 ein „T“ sein, kommen nur vier seltene *04er Allele in Frage.

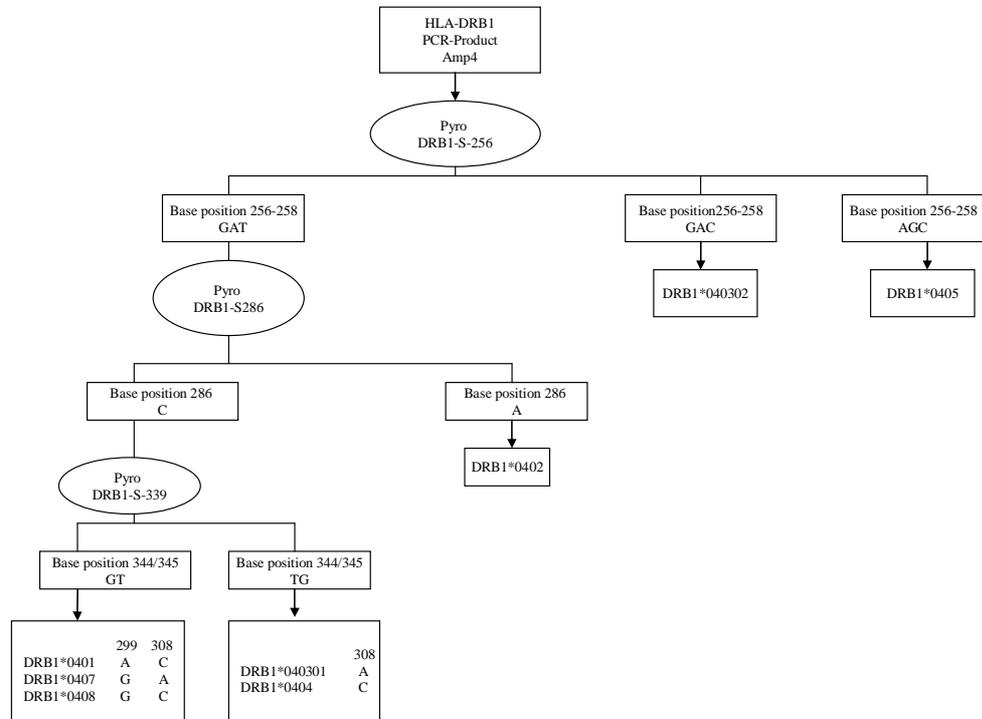


Abb. 3.8 - Auswerteschema für die Pyrogramme von Amplifikaten der Allelgruppe DR4

In Abbildung 3.9 sind Beispiele für Pyrogramme der Allele DRB1*0401, *0402, *0404 und *0407 mit dem Sequenzierprimer S-286 zu sehen. Die Pfeile kennzeichnen die polymorphen Basenpositionen.

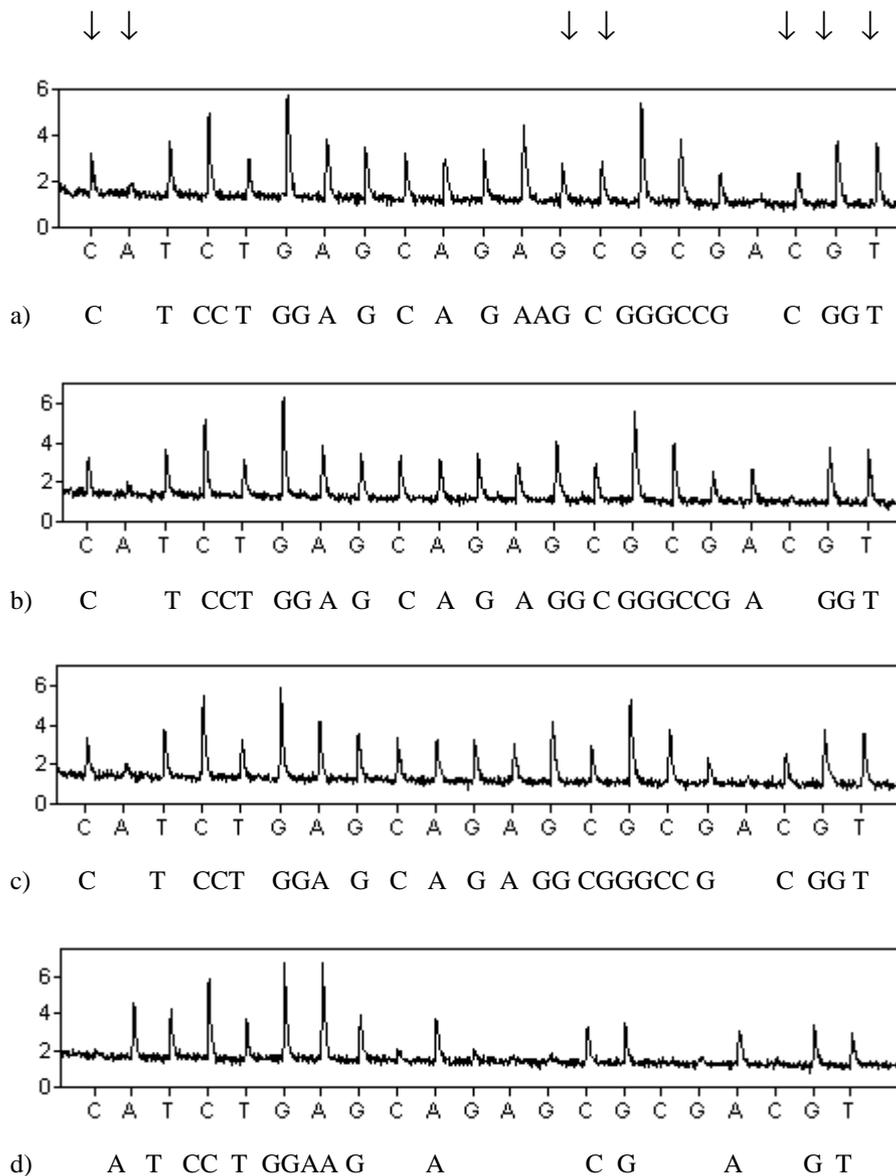


Abb. 3.9 - Pyrogramme verschiedener HLA-DRB1*04 Allele bei der Sequenzierung mit dem Primer DRB1-S-286. a) DRB1*0401, b) DRB1*0407, c) DRB1*0404, d) DRB1*0402. Die Pfeile deuten auf die polymorphen Positionen.

Mit der Pyrosequencing-Strategie für HLA-DRB1 wurden zur Evaluation zunächst Laborstandard DNA-Proben und 30 DZA Proben erfolgreich typisiert. Weiter wurden zwei Studien mit 418 DNA Proben durchgeführt. Insgesamt wurden dabei ca. 30 verschiedene HLA-DRB1 Allele typisiert, das entspricht 77% der vierstelligen Allele, die mit einer Häufigkeit von über 0,1% in der europäischen Bevölkerung vorkommen. Die Methode wurde in der Veröffentlichung „New strategies for efficient typing of HLA class-II loci DQB1 and DRB1 by using PyrosequencingTM“ (Entz et al., 2005) zusammengefasst dargestellt.

3.3 HLA-B-Typisierung

Zur Typisierung von HLA-B müssen die wesentlichen polymorphen Regionen untersucht werden, die in Exon 2 und 3 dieses Genortes liegen. Durch die Homologien der Klasse I HLA-Genorte A, B und C war es problematisch geeignete PCR-Primer zu erstellen, die spezifisch nur HLA-B Exon 2 amplifizieren und zugleich für das Pyrosequencing geeignete Templates vervielfältigen. Ein Abgleich (BLAST – Basic Local Alignment Tool) verschiedener Primer gegen eine Datenbank mit HLA-Sequenzen zeigte, dass ein Großteil der theoretisch erstellten Primer auch an homologe Bereiche anderer HLA-Genorte binden können. Dadurch konnten bei den PCR Reaktionen auch andere Genomabschnitte mitvermehrt werden. Um dieses Problem zu umgehen wurde hier die zweistufige „nested“ PCR gewählt. Zunächst wird dafür ein größerer Abschnitt vermehrt, der sich über den Bereich von Exon 2 und 3 und die umgebenden und dazwischen liegenden Intronbereiche erstreckt (Abb.3.10). Dieses erste PCR-Produkt wird dann als Vorlage zur Amplifikation der kürzeren Abschnitte für die Pyrosequenzierung verwendet.

Das Exon 2 wird mit den Primern BEx2-76-F und BEx2-342-R amplifiziert und dann in 10 bis 12 Pyrosequencing Schritten sequenziert. Das Exon 3 wird mit dem Primern BEx3-F und BEx3-R vervielfältigt. Diese Primer liegen in den das Exon 3 umgebenden intronischen Bereichen. Es folgen 8-10 Pyrosequencing Schritte. Da die für das Exon 3 gewählten Primer keine unspezifischen Produkte amplifizieren, ist es auch möglich, eine direkte PCR unter Auslassung des „nested“ PCR-Schrittes durchzuführen.

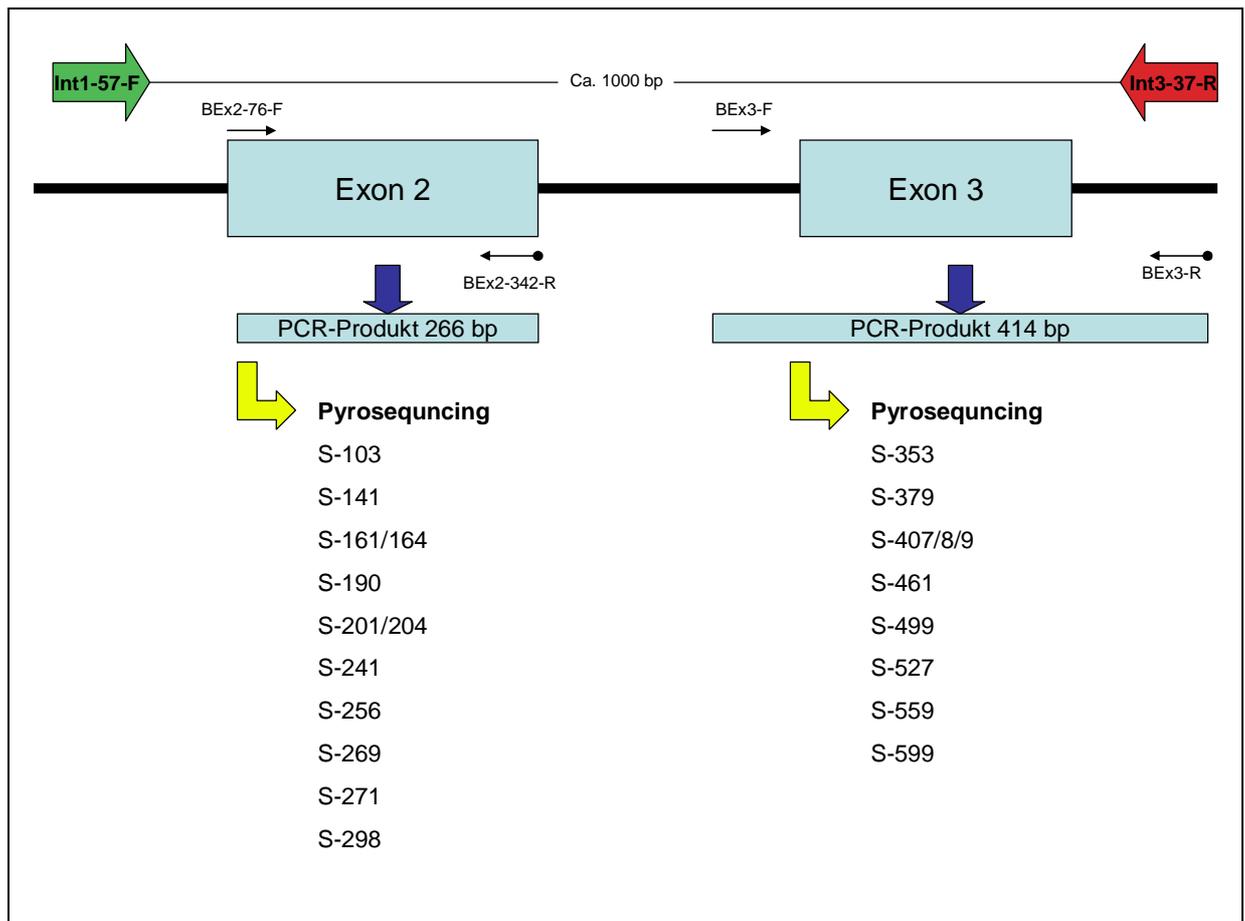


Abb. 3.10 - Typingschema HLA-B: In einer ersten PCR wird ein Bereich von ca. 1000 bp mit Hilfe HLA-B spezifischer Primer im Intronbereich vermehrt. Das Produkt wird in den folgenden PCR Reaktionen als Template eingesetzt. Das Exon 2 wird mit den Primern BEx2-76-F und BEx2-342-R und Exon 3 wird mit dem Primern BEx3-F und BEx3-R amplifiziert. Diese Primer liegen in den das Exon 3 umgebenden intronischen Bereichen. Die Rückwärts-Primer sind am 5'Ende Biotin markiert.

3.3.1 Erarbeitung der Typisierungsstrategie

Zur Typisierung der HLA-B Allele einer DNA-Probe müssen die Sequenzabschnitte Exon 2 und Exon 3 untersucht werden. Zur Amplifikation des Exon 2 wurde zunächst ein Primerpaar das alle HLA-B-Allele erfasst getestet („B-Ex2-F“ und „B-Ex2-R“). Die Pyrosequencing Resultate waren jedoch nicht zufrieden stellend, d.h. die Pyrogramme zeigten nicht die erwarteten Signalhöhen, die daraus ermittelten Sequenzen entsprachen nicht denen der vorliegenden Allele. Daher wurden zur Amplifikation des Exon 2 des HLA-B Genortes verschiedene Optimierungsversuche unternommen. Die erste Idee war, das Exon von 5'-Ende aus zu sequenzieren, um die Schleifenbildung zu verhindern. Es wurden die gleichen Primer verwendet, nur mit dem Unterschied, dass der entgegengesetzte Strang mittels Biotin markiert und isoliert wurde („B-Ex2AmpF-bio“ und „B-Ex2AmpR-o“). Die Pyrosequencing Reaktion erfolgte dann

mit einem entsprechend reversen Sequenzierprimer „S-167rev“. Aber auch dieser Ansatz führte nicht zu akzeptablen Resultaten.

Ein weiterer Versuch bestand darin, das Exon 2 in zwei Teilen zu amplifizieren. Dazu wurden Primer im konservierten Bereich zwischen den Basenpositionen 168 und 186 gelegt, einmal als Vorwärts- und einmal als Rückwärts- Primer („B-Ex2_186-R“ und „B-Ex2_168-R“). Die kurzen Amplifikate ließen sich im Pyrosequencing aber nicht zufrieden stellend untersuchen.

Tabelle 3.8 - PCR-Primer für HLA-B, Primer der endgültigen Methode sind gelbmarkiert.

Name	Lokalisation	Position	Sequenz	Markierung	aus
HLA-B Int1-57-F	Intron1	(36-57)	GGGAGGAGCGAGGGGACCG/CCAG		IHWG Protokoll 8-B
HLA-B Int3-37-R	Intron3	(36-58)	GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT		IHWG Protokoll 8-B
BEx2-76-F	Exon2	76-96	TCCCACTCCATGAGGTATTTC		selbst erstellt
BEx2-342-R	Exon2	323-342	GGCCTCGCTCTGGTTGTAGT	5'-Biotin	selbst erstellt
Bamp08-F	Exon 2	79-97	CACTCCATGAGGTATTTCG		selbst erstellt
Bamp27-F	Exon 2	79-97	CACTCCATGAGGTATTTC		selbst erstellt
Bamp35-F	Exon 2	79-97	CACTCCATGAGGTATTCT		selbst erstellt
Bamp35G-F	Exon 2	79-97	CACTCCATGAGGTATTTGT		selbst erstellt
B-Ex2-F	Exon 2	74-93	GCTCCCACTCCATGAGGTAT		selbst erstellt
B-Ex2-R	Exon 2	322-343	CGGCTCGCTCTGGTTGTAG	5'-Biotin	selbst erstellt
B-CL1320G-R	Exon 2	320-339	CCTCGCTCTGGTTGTAGTAGC	5'-Biotin	selbst erstellt
B-Ex2AmpR-o	Exon 2	322-343	CGGCTCGCTCTGGTTGTAG		selbst erstellt
B-Ex2AmpF-bio	Exon 2	74-93	GCTCCCACTCCATGAGGTAT	5'-Biotin	selbst erstellt
BEx3-F	Intron2	(169-188)	TTCAGTTGAGGCCAAAATCC		selbst erstellt
BEx3-R	Intron3	(36-54)	GCCATCCCCGG/CCGACCTAT	5'-Biotin	Schaffer und Olerup
B-Ex3-07-F	Int2/Exon3	(-6)-357	GCCAGGGGTCTCACACCCTC		selbst erstellt
B-Ex3-13-F	Int2/Exon3	(-6)-357	GCCAGGGGTCTCACACTTGG		selbst erstellt
B-Ex3-35-F	Int2/Exon3	(-6)-355	GCCAGGGGTCTCACATCA		selbst erstellt

Ein weiterer Optimierungsansatz war, durch unterschiedliche Vorwärtsprimer, die auf spezielle Sequenzmuster im vorderen Teil des Exon 2 passen, eine Amplifikationsstrategie ähnlich der für HLA-DRB1 zu erstellen. Die Primer Bamp07-F, Bamp08-F, Bamp13/15-F, Bamp14-F und Bamp27-F in Kombination mit dem allgemein passenden Rückwärtsprimer BEx2-R amplifizieren jedoch bis auf Bamp27-F auch unspezifische Allele.

Eine weitere Möglichkeit, die ausprobiert wurde, besteht in der Verwendung „universeller“, nicht-human-kompatibler Primer (Aydin, 2005). Die spezifischen Primer für HLA-B Exon 2 wurden durch einen „universellen“ Sequenzteil (GTGACGTACTAGCAACG bzw. TAGCAGGATACGACTATC) verlängert, welcher nicht auf humane DNA passt. Zur PCR werden zusätzlich zu den verlängerten spezifischen Primern die passenden universellen Primer zu gegeben, von denen einer mit Biotin markiert ist. Da diese universellen Primer aus nicht human-komplementären Sequenzen bestehen, soll die Gefahr geringer sein, dass sie innerhalb des PCR-Produkts fälschlich hybridisieren und somit wird die Gefahr der Schleifenbildung reduziert. Die Pyrosequencing Reaktionen waren jedoch nicht zufrieden stellend. Die Intensität der Signale war zu gering, um die Pyrogramme auswerten zu können.

Eine weitere Variante die zur Verbesserung der Pyrosequencing Reaktionen getestet wurde, war die Blockierung der 3' Enden mit ddNTP (Utting, 2004). Diese Methode soll eine Alternative zur Zugabe von SSB-Protein darstellen. Dabei wird wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, das 3'-Ende des Pyrosequencing Templates mit einem Didesoxynucleotid blockiert. Dadurch kann zwar nicht das Anhybridisieren an eine komplementäre Stelle verhindert werden, aber die Verlängerung wird unterbunden, so dass kein „self-priming“ stattfindet. Im Zusammenhang mit dem HLA-B Exon 2 wurde diese Methode ausprobiert, wobei die Resultate nicht zufrieden stellen waren. So wurde die auch sehr aufwendige Methode der Modifizierung für die Anwendung in diesem Zusammenhang wieder verworfen.

Für die Typisierung von HLA-B Exon 3 wurden ebenfalls verschiedenen Möglichkeiten der Amplifikation ausprobiert. Es wurde zuerst eine gruppenspezifische Amplifikation mit drei verschiedenen Vorwärtsprimern (siehe Tabelle 3.8) getestet. Die generische Amplifikation mit Primern in den Intronbereichen erwies sich jedoch als am besten geeignete Methode.

Die optimierte Pyrosequencing-Strategie zur Typisierung von HLA-B besteht aus folgenden Schritten:

1. Amplifikation eines Teils der HLA-B Region (Intron 1-Intron 3)
2. Nested-PCR Exon 2
3. PCR Exon 3 (aus Amplikon 1 oder aus DNA)
4. Pyrosequenzierung der polymorphen Bereiche
5. Auswertung der Pyrogramme

3.3.2 Optimierte PCR-Bedingungen für HLA-B

Wie schon eingangs des Kapitels 3.3 erwähnt, erwies es sich zur Untersuchung des HLA-B Exon 2 am günstigsten, den Bereich der Exone 2 und 3 zuerst mittels spezifischer, in den Intronbereichen liegende Primer („HLA-BInt1-57-F“ und „HLA-BInt3-37-R“) zu amplifizieren. Anschließend wurde mittels eines weiteren Primer Paares, das Exon 2 daraus amplifiziert. Die Pyrogramme zeigen im Vergleich zu den direkt aus DNA amplifizierten Proben deutlich weniger Hintergrund, was in diesem Fall durch die hohe Spezifität der äußeren Primer erreicht wird. In einer ersten PCR wird ein Bereich von ca. 1000 bp mit Hilfe HLA-B spezifischer Primer im Intron 1 und 3 vermehrt (Abb.3.10). Ein so langes PCR-Produkt ist jedoch als Template für das Pyrosequencing nicht geeignet. Dieses erste PCR-Produkt wird dann als Vorlage zur Amplifikation der kürzeren Abschnitte für die Pyrosequenzierung verwendet. Das Exon 2 wird mit den Primern BEx2-76-F und BEx2-342-R amplifiziert und dann in 10 bis 12 Pyrosequencing Schritten sequenziert. Das Exon 3 wird mit dem Primern BEx3-F und BEx3-R vervielfältigt. Diese Primer liegen in den das Exon 3 umgebenden intronischen Bereichen. Es folgen 8-10 Pyrosequencing Schritte. Da die für das Exon 3 gewählten Primer keine unspezifischen Produkte amplifizieren, ist es auch möglich, eine direkte PCR unter Auslassung des „nested“ PCR-Schrittes durchzuführen.

Für die Typisierung von HLA-B Exon 3 wurden ebenfalls verschiedenen Möglichkeiten der Amplifikation getestet. Es wurde zuerst eine gruppenspezifische Amplifikation mit drei verschiedenen Vorwärtsprimern verwendet. Die generische Amplifikation mit Primern in den Intronbereichen erwies sich jedoch als beste Methode.

1. PCR		µl
DNA	15-50 ng/µl	2
Puffer	Gene Amp10xPCR-BufferII, Applied Biosystems	2,5
Magnesiumchlorid	25 mM, Applied Biosystems	2
dNTPs	je 2mM, Sigma	1
Primer-F	10 mM, B-Int1-57-F	0,5
Primer-R	10 mM, B-Int3-37-R	0,5
Taq-Polymerase	5U/µl, Applied Biosystems	0,2
ddH ₂ O	Aqua ad iniectabilia, Braun	16,3
Gesamtvolumen		25

PCR-Cycler-Programm: Denaturierung bei 98°C für 20 Sek., 8 Zyklen 98°C für 5 Sek., 65°C für 30 Sek., 72°C für 2 Min.; 32 Zyklen 96°C für 5 Sek., 60°C für 30 Sek., 72°C für 2 Min.; finale Elongation bei 72°C für 10 Min.

2. PCR Exon 2		µl
PCR-Produkt 1	B Intron1-B Intron3	0,5
Puffer	10xPCR-Buffer, Invitek	2,5
Magnesiumchlorid	50 mM, Invitek	2,5
dNTPs	je 2mM, Sigma	1
Primer-F	10 mM, BEx2-76-F	0,5
Primer-R	10 mM, BEx2-342-R	0,5
Taq-Polymerase	5 U/µl, Applied Biosystems	0,2
ddH ₂ O	Aqua ad iniectabilia, Braun	17,3
Gesamtvolumen		25

PCR-Cycler-Programm: Denaturierung bei 95°C, 5 Min., 50 Zyklen 94°C für 30 Sek., 60°C für 30 Sek., 72°C für 1 Min. 30 Sek., finale Elongation 72°C für 10 Min..

3. PCR Exon 3		µl
DNA bzw. PCR 1	15-50 ng/µl	2 /0,5
Puffer	10xPCR-Buffer, Invitek	2,5
Magnesiumchlorid	50 mM, Invitek	1,5
dNTPs	je 2mM, Sigma	1
Primer-F	10 mM, BEx3-F	0,5
Primer-R	10 mM, BEx3-R	0,5
Taq-Polymerase	5 U/µl, Applied Biosystems	0,2
ddH ₂ O	Aqua ad iniectabilia, Braun	17,3/18,8
Gesamtvolumen		25

PCR-Cycler-Programm: Denaturierung bei 95°C, 5 Min., 50 Zyklen 94°C für 30 Sek., 60°C für 30 Sek., 72°C für 1 Min. 30 Sek., finale Elongation 72°C für 10 Min..

3.3.3 Pyrosequencing-Bedingungen von HLA-B

Die Sequenzierprimer und speziellen Dispensierreihenfolgen sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Die Pyrosequencing Reaktionen zur Untersuchung des HLA-B Genortes wurden ohne Einsatz von zusätzlichem SSB-Protein durchgeführt. In der Abbildung 3.11 sind zwei Pyrogramme gezeigt. Das PCR-Produkt des Exon 3 wurde mit dem Sequenzierprimer B-S-559 untersucht.

Tab. 3.9 - Sequenzierprimer und Dispensationsreihenfolgen

Sequenzierprimer	Primer Sequenz (5'-3')	Dispensationsreihenfolgen
B-S-103	GGTATTTCTACACC	ATGTCGACTGTCGCTCTG
B-S-140	GAGCCCCGCTTCA	TCAGTCAGTGACTACGTGACGAGC
B-S-141	GAGCCCCGCTTCAT	CTAGTCACGTGCTACGTGACGAGC
B-S-161	GTGGGCTACGTGGACG	TAGTCACGCATCGTCGCTGACAGTCGAGC
B-S-164	GCTACGTGGACGACA	CGCATCGTCGCTGACAGTCGAGC
B-S-167rev	GTCGAACCTCACGAAC	CTAGCGCTGTCTG
B-S-190	AGGTTCGACAGCGAC	TGCGATCGA
B-S-197	AGCGACGCCGCGA	AGTCGAGAGAGATCGACGCGCGCGGATG ATAGA
B-S-201	GCGACGCCGCGAGTCC	CGAGAGAGAGATCGACGCGCGCGGATG
B-S-204	GCCGCGAGTCCGAG	TAGAGATCGACGCGCGCGGATGATGATAG
B-S-241	GATAGAGCAGGAGGGG	CATGCAGCTATGACGCAGACGCA
B-S-256	CGGAGTATTGGGAC	TGCGATCGTACA
B-S-269	GACCGGAACACACAGA	ATCTATGTCAGACTAGCACAGCA
B-S-272	GACCGGAACACACAGATCT	GCATCGAGACATACGACAGCAGACT
B-S-298	CACACAGACT(G/T)ACCGA	CGAGAGTCTCTACTGCGCATCATGCGCTGC GCT
B-S-353	ATCCGCGGTCTCACA	ACATGCAGTAGCGTATGTACTCGCT
B-S-358-07	CATGAGGTATTTCTACACCTTCCG	TCAGTAGCGTATGTACTCGCT
B-S-358-13	ATGAGG TATTTCTACACCGCCA	TCAGTAGCGTATGTACTCGCT
B-S-356-35	CACTCCATGAGG TATTTCT	ATCAGTAGCGTATGTACTCGCT
B-S-379	GTAC/TGGCTGCGAC	TGCATGCGAC
B-S-407	GGCGCCTCCTCCGCG	CGCTGACTGACAGTATCATGCT
B-S-409	CGCCTCCTCCGCGGG	GCTGACTGACAGTATCATGCT
B-S-461	CCCTGAACGAGGACC	CTGCATGCTCTGACGCGCGACACGCGC
B-S-499	GCGGCTCAGATC	CATGCAGCGTCAGTGA
B-S-527	GAGGCGGCCCGTG	GATCGCGAGCAGCACTGAGAGCTA
B-S-559	GCCTACCTGGAGGGC	TGACTGTGCGTGAGTCGCT
B-S-599	CCTGGAGAACGGGA	CAGACGACTGCTGCA

Die Primer der gruppenspezifischen PCRs wurden auch als „spezifische Sequenzierprimer“ getestet. Die resultierenden Pyrogramme waren von geringer Qualität, es erscheinen hohe Hintergrundsignale. Da aber ablesbar ist, ob eine Anlagerung erfolgt ist oder nicht, können sie für die Auswertung aussagekräftig sein.

Die optimierte Strategie für HLA-B wurde an laborinternen Kontrollproben, an DNA-Proben aus Ringversuchen getestet. Nach der ersten Evaluation wurde die Strategie benutzt, um eine HLA-B Typisierung von 22 Proben von Roros vorzunehmen. Die erreichte Auflösung ist dabei sehr unterschiedlich. In den meisten Fällen kann eine Typisierung mindestens auf serologischen Niveau erreicht werden.

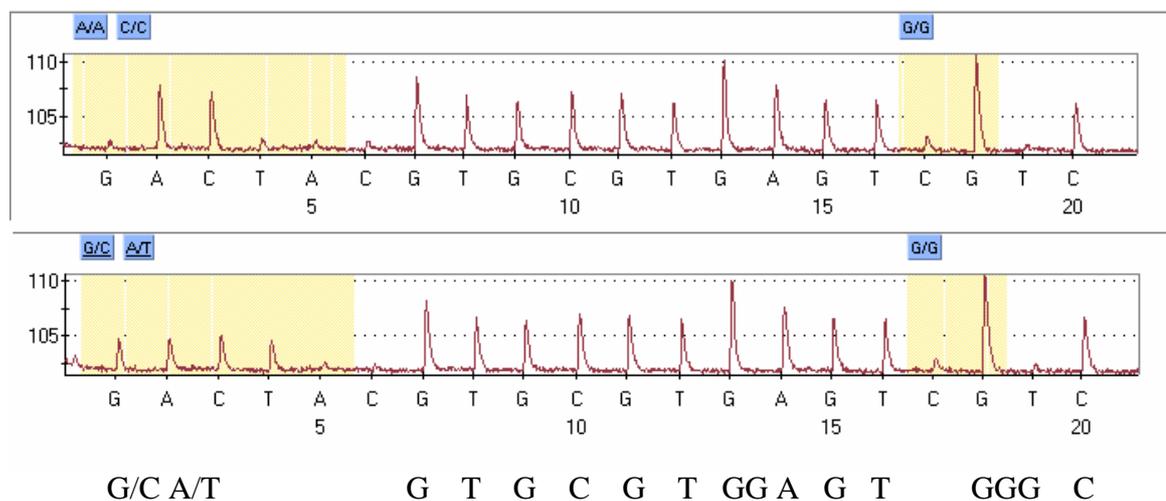


Abb. 3.11 Beispiele für Pyrogramme – HLA-B Exon3, Sequenzierprimer B-S-559

3.4 Anwendungen der Pyrosequencing basierten Typisierungsstrategien

3.4.1 HLA-DRB1 Typisierung von Familien-Trios

Für eine erste Anwendung der HLA-DRB1-Typisierungsstrategie wurden DNA Proben von 90 Individuen untersucht. Dabei handelte es sich um 30 Vater-Mutter-Kind-Trios. Die Proben waren bereits mit einer generischen PCR-SSP Methode in Kombination mit der nicht-elektrophoretischen Auswertung auf PicoGreen-Basis (Hampe et al., 2004) vortypisiert, so dass die Allelgruppen bekannt waren. Die Proben sollten nun mit der Pyrosequencing Methode höher auflösend untersucht werden. Es wurde für die Proben eine mindestens vierstellige Typisierung erreicht, bis auf zwei Allele, welche wegen fehlendem DNA-Material nicht näher untersucht werden konnten. In einigen Fällen konnten sogar sechsstellige Ergebnisse ermittelt werden. Die Ergebnisse von 19 Proben wurden mit etablierten HLA-Typisierungsmethoden überprüft. Die Ergebnisse der Pyrosequencing-basierten Untersuchung konnten bestätigt werden.

In einem der Fälle konnte mit der Pyrosequencing Methode eine unklare, zweideutige Allelkombination gelöst werden. Die Kombination DRB1*1101/1104, DRB1*1301/1302 lässt sich nur mit Hilfe einer allelgruppenspezifischen Amplifikation eindeutig auflösen. In vielen kommerziellen SBT-Kits, liegen die betreffenden Allele aber in der gleichen Gruppe. Mit der Pyrosequencing Methode ließ sich die Kombination auflösen. In Tabelle 3.10 sind alle Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Tab. 3.10 - HLA-DRB1 Typisierungsergebnisse von 30 Eltern-Kind-Trios. SSO bzw. SBT Kontrollen sind in der letzten Spalte vermerkt.

Familie	Person	Allel 1¹⁾		Allel 2¹⁾		SSO/ SBT control
1	1	*15	*150101	*13	*1302	
	2	*01	*010101	*03	*0301	
	3	*15	*150101	*03	*0301	
2	1	*03	*0301	*03	*0301	
	2	*12	*120101	*13	*1301	
	3	*03	*0301	*13	*1301	
3	1	*11	*1101	*04	*040101	
	2	*13	*1301/02 ²⁾	*04	*040101	
	3	*11	*1101	*04	*040101	
4	1	*15	*1501	*07	*0701	
	2	*11	*1101	*07	*070101	SBT: *070101
	3	*11	*1101	*07	*0701	SBT: *070101
5	1	*13	*130202	*04	*040101	
	2	*11	*1103	*14	*1401	SSO: *11,*14
	3	*13	*130202	*14	*1401	SSO: *13,*14
6	1	*03	*030101	*13	*110401	SSO: *03,*11/13, SBT
	2	*03	*0301	*03	*0301	SSO: *03,*03
	3	*03	*030101	*03	*030101	SSO: *03,*03, SBT
7	1	*01	*010201	*04	*0404	
	2	*13	*1301	*11	*1101	
	3	*01	*010201	*13	*1301	
8	1	*01	*010101	*16	*160101	SSO: *01,*16
	2	*03	*030101	*03	*0301	SSO: *03,*03
	3	*01	*010101	*03	*0301	
9	1	*13	*130101	*07	*0701	
	2	*11	*1101	*10	*100101	
	3	*07	*070101	*10	*100101	
10	1	*13	*130101	*07	*0701	
	2	*13	*130101	*15/*16	*16 ²⁾	
	3	*13	*130101	*15/*16	³⁾	
11	1	*15	*1501	*04	*040101	
	2	*13	*130201	*09	*090102	
	3	*15	*1501	*09	*090102	
12	1	*01	*010101	*03	*0301	
	2	*03	*030101	*13	*130101	SBT:*030101,*130101
	3	*03	*030101	*03	*0301	
13	1	*11	*110101	*04	*0408	
	2	*12	*1201	*13	*1301/02 ²⁾	
	3	*12	*1201	*04	*0408	
14	1	*03	*030101	*04	*040101	
	2	*15	*1501	*04	*040101	
	3	*03	*0301	*04	*040101	
15	1	*01	*010101	*11	*1101	
	2	*04	*0404	*03	*030101	
	3	*03	*030101	*11	*1101	
16	1	*11	*1101	*15	*150101	
	2	*01	*0101	*13	*1301	
	3	*15	*150101	*13	*1301	
17	1	*01	*010101	*15	*1501	
	2	*13	*130101	*13	*130301	SBT: *130101,*130301
	3	*13	*1301	*15	*1501	
18	1	*12	*1201	*13	*1301/02 ²⁾	

	2	*13	*1301	*11	*1101	
	3	*12	*1201	*13	*1301	
19	1	*01	*010101	*16	*1601	
	2	*12	*1201	*13	*130201	
	3	*13	*1302	*16	*1601	
20	1	*03	*030101	*11	*110101	SSO: *03, *11/13 SBT: *030101, *110101
	2	*13	*130101	*13	*130302	SSO: *13, *13 SBT: *130101, *130302
	3	*13	*130101	*11	*110101	SSO: *13, *11 SBT: *110101, *130101 or *110401, *130201
21	1	*03	*0301	*15	*150101	SSO: *03, *15
	2	*08	*0801	*14	*1401	
	3	*08	*0801	*03	*0301	SSO: *08, *03
22	1	*11	*1101	*15	*150201	
	2	*01	*010101	*01	*010101	
	3	*01	*010101	*15	*150201	
23	1	*14	*1401	*13	*1302	
	2	*11	*1101	*01	*010101	
	3	*11	*1101	*14	*1401	
24	1	*04	*040101	*07	*0701	
	2	*04	*040101	*03	*0301	
	3	*04	*040101	*07	*0701	
25	1	*08	*080202	*14	*140101	SBT: *140101
	2	*11	*110101	*07	*0701	SBT: *110101
	3	*08	*080202	*11	*1101	SBT: *110101
26	1	*03	*0301	*13	*130101	
	2	*03	*0301	*04	*0404	
	3	*03	*0301	*13	*1301	
27	1	*01	*010101	*12	*1201	
	2	*04	*040701	*07	*0701	
	3	*07	*0701	*12	*1201	
28	1	*14	*1401	*04	*0401	
	2	*15	*1501	*04	*040101	
	3	*14	*1401	*04	*040101	
29	1	*03	*0301	*03	*0301	
	2	*15	*1501	*07	*0701	
	3	*15	*1501	*03	*030102	
30	1	*07	*0701	*12	*1201	
	2	*15	*1501	*04	*040101	
	3	*15	*1501	*12	*1201	

- 1) Es wurden nur Allele in die Auswertung mit einbezogen, deren Frequenz über 0,1% in der europäischen Bevölkerung liegt.
- 2) Nicht ausreichendes DNA Material, es konnte nur eine Pyrosequencing Reaktion durchgeführt werden.
- 3) Nicht ausreichendes DNA Material, es wurde nur eine PCR-SSP-Analyse durchgeführt.

3.4.2 Fall-Kontroll-Studie “Alopecia areata”

Die Studie zum Thema Alopecia areata und HLA erfolgte als Kooperation mit der Universität Antwerpen (Prof. Marcus Nöthen, Dr.med. Bettina Blaumeiser). Es wurden 161 unverwandte Patienten mit Alopecia areata (AA) untersucht. Die Patientenproben wurden in zwei Dermatologischen Instituten, in Antwerpen und Düsseldorf gesammelt. Die klinischen Daten der Patienten wie der Alopecia-Typ, das Ersterkrankungsalter und der familiäre Hintergrund wurden erfasst. Von den 161 Patienten hatten 74 die Erscheinungsform „patchy“ Alopecia, d.h. sie waren von kreisrunden, kahlen Stellen der Kopfhaut betroffen. 12 der Patienten litten unter Alopecia totalis (AT), dem völligen Verlust des Kopfhaares. 73 Patienten waren von Alopecia universalis (AU) betroffen, was den Haarausfall des kompletten Körperhaares beinhaltet. Zwei Patienten litten unter einer Mischform (AT/AU). 27 % der untersuchten Patienten hatten Angehörige ersten oder zweiten Grades, die ebenfalls von Alopecia areata betroffen waren. Die Kontrollgruppe bestand aus 164 gesunden, unverwandten Blutspendern, die nach Geschlecht und Alter entsprechend der Patientengruppe ausgesucht wurden.

Die DRB1-Typisierung wurde nach der unter 3.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Für die Studie wurden zunächst alle Proben mittels der PCR-SSP in die entsprechenden DRB1-Allelgruppen eingeteilt. Ein Vergleich der Allelfrequenzen in Tabelle 3.11 zeigte, dass die gesunde Kontrollgruppe mit auffällig höherer Frequenz positiv für die vom Primer „DRB1-Amp3-3“ amplifizierte Allelgruppen DRB1*03, *11, *13, *14 war, während unter den Patienten Allele der Gruppe DRB1*04 häufiger gefunden wurden. Daher wurden für die zu diesen Gruppen gehörenden Proben weitere, höher auflösende Typisierungen vorgenommen. Die „DRB1-Amp3-3“ positiven DNA-Proben wurden auf die Zugehörigkeit zu den Gruppen DRB1*03 bzw. DRB1*11 mittels PCR-SSP getestet. Dabei zeigte sich, dass die Allele der Gruppe DRB1*03 unter den gesunden Kontrollen deutlich häufiger vorkommen als unter den Patienten. Die Häufigkeit der Allele der Gruppe DRB1*11 weicht zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe nicht auffällig ab. Die DNA-Proben mit Allelen der Gruppen DRB1*03 und *04 wurden dann mittels Pyrosequencing auf vierstelligem Allelniveau typisiert. Zur statistischen Auswertung wurden neben dem generellen Vergleich von allen Alopecia areata Patienten mit der gesunden Kontrollgruppe folgende Gruppen ausgewertet: Patienten mit „patchy“ Alopecia, Patienten mit AT, Patienten mit AU, Patienten mit einem Ersterkrankungsalter unter 20, Patienten mit einem

Ersterkrankungsalter über 20, Patienten mit familiärer Geschichte von Alopecia areata und Patienten ohne familiäre Geschichte von Alopecia areata (Tab. 3.12).

Tab. 3.11 - Frequenz von HLA-DRB1 Allelen der Alopecia areata-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollpersonen

HLA-DRB1	Allele in Kontrollen	%	Alleles in Patienten	%	Chi-Quadrat ¹	p-Wert
*01	39	11,8	41	12,7	0,11	0,7
*15, *16	58	17,6	58	18,0	0,01	0,9
*08, *12	20	6,1	16	5,0	0,40	0,5
*03, *11,*13, *14	140	42,4	116	36,0	3,02	0,08
davon *03	45	13,6	24	7,5	6,72	0,009
*0301	37	11,2	22	6,8	3,90	0,05
*0302	1	0,3	0	0	0	1
*03XX ²⁾	7		2			
davon *11	45	13,6	38	11,8	0,54	0,5
*04	44	13,3	67	20,8	6,27	0,01
*0401	24	7,3	43	13,4	6,41	0,01
*0402	1	0,3	1	0,3	0	1
*0403	5	1,5	0	0	3,15	0,08
*0404	6	1,8	3	0,9	0,41	0,5
*0405	1	0,3	2	0,6	0	1
*0407	1	0,3	3	0,9	0,27	0,6
*0408	1	0,3	3	0,9	0,27	0,6
*04XX ²⁾	5		12			
*07	27	8,2	21	6,5	0,69	0,4
*09	0	0	1	0,3	0	1
*10	2	0,6	2	0,6	0	1
2n =	330		322			

¹⁾ Ohne Yates Korrektur für Werte > 5, mit Yates Korrektur für Werte ≤ 5

²⁾ DRB1*03- and DRB1*04-Subtyping nicht möglich, da keine ausreichenden DNA-Proben

Beim Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Patienten fallen die Frequenzen zweier Allelgruppen als statistisch signifikant abweichend auf. Demnach treten Allele aus der Gruppe DRB1*03 bei Alopecia areata Patienten mit einer Frequenz von ca. 7,5% auf, in der gesunden Kontrollgruppe aber mit 13,6 % (p=0,009). Die Allelfrequenz von DRB1*04 ist mit 20,8% in Patienten eventuell signifikant höher als in Kontrollen mit 13,6% (p=0,01). Nach Unterteilung der Patienten in die erwähnten Untergruppen, werden die Werte für verschiedene Fälle noch deutlicher (Tabelle 3.12). 45% der Patienten mit dem Phänotyp AU sind Träger eines DRB1*04er Allels, während nur

23,6% der Kontrollpersonen ein solches Antigen tragen ($p=0,0008$), was nach der Klassifizierung (siehe Abschnitt 2.3) als hoch signifikant einzustufen ist. Speziell das Allel DRB1*0401 tritt bei den AU-Patienten bedeutend häufiger auf. Auch unter den Patienten mit einem Ersterkrankungsalter bis 20 Jahre ist die Allelfrequenz der *04er und speziell das Auftreten des Allels *0401 deutlich erhöht. Sie liegt hier bei 16% gegen über 7% in der Kontrollgruppe ($p=0,002$). Betrachtet man andererseits die Gruppen der Patienten mit einem höheren Ersterkrankungsalter als 20 findet man kaum Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen in Kontrollen und Patienten. So ist hier für keine Allelgruppe ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen von Betroffenen und Gesunden zu erkennen. Ähnlich verhält es sich, wenn man die Gruppe der Alopecia Patienten ohne familiäre Fälle mit den Kontrollen vergleicht. Zwar ist hier die Allelfrequenz von DRB1*0401 mit 11,5% gegen 7,3% noch erhöht, aber nicht statistisch signifikant ($p=0,1$). Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in der Veröffentlichung „Investigation of the HLA-DRB1 locus in alopecia areata“ (Entz et al., 2006 accepted) beschrieben.

Tab. 3.12 - Verteilung der Allele DRB1*0301 und DRB1*0401 in den verschiedenen Alopecia areata Untergruppen verglichen mit Kontrollen

Untergruppe	DRB1- Allel	Anzahl Personen	Chi- Quadrat ¹⁾	p-Wert	exakter Fischer -Test
Kontrollen (N = 165)	*0301	20			
	*0401	26			
patchy AA (N = 74)	*0301	10	2.58	0.1	0.12
	*0401	14	0.73	0.4	0.44
AT (N = 12)	*0301	0	2.18	0.1	0.074
	*0401	1	0.03	0.9	1
AU (N = 73)	*0301	12	1.11	0.3	0.38
	*0401	25	12.01	0.0005	0.00087
AA Erkrankungsalter \leq 20 (N = 79)	*0301	9	4.25	0.04	0.053
AA Erkrankungsalter $>$ 20 (N = 82)	*0301	13	1.46	0.2	0.24
AA familiär (N = 44)	*0301	2	6.19	0.01	0.0046
	*0401	16	10.68	0.001	0.0022
AA nicht-familiär (N = 117)	*0301	20	1.21	0.3	0.29
	*0401	26	2.77	0.09	0.11

¹⁾ Ohne Yates Korrektur für Werte > 5 , mit Yates Korrektur für Werte ≤ 5

3.4.3 HLA-B Typisierung der Roro-Proben

Mit Hilfe der Pyrosequencing Methode zur Typisierung von HLA-B Allelen wurden DNA-Proben aus einer Population aus Papua-Neuguinea vom Stamm der Roro untersucht. Es wurden 22 DNA-Proben typisiert. Die Ergebnisse variieren in der Qualität der Auflösung, wie in der Tabelle 3.13 gezeigt. Die zuvor für 11 der Proben bekannten Typisierungsergebnisse durch klassische Sequenzierung konnten nur zum Teil bestätigt werden. In drei Fällen wurde eines der beiden Allele bestätigt, in einem Fall wurden zwei abweichende Allele typisiert. Die in Mitteleuropa ausgesprochen seltenen Allele B*4010 und B*4011 kamen in den untersuchten Proben je zwei Mal vor, weitere Proben mit B*40 konnten nicht höher aufgelöst werden. Bei einigen Roro-Proben wurde versucht mit Hilfe der HSE-Methode noch eine höhere Auflösung zu erreichen. In vielen Fällen, waren die PCR-Produkte aber zu schwach und die Pyrogramme nicht auswertbar.

Tab. 3.13 - HLA-B Typisierungsergebnisse der Roro-Proben

	HLA-B Pyrosequencing Ergebnisse	HSE/Pyrosequencing	HLA-B SBT-Ergebnisse
RORO 1	B*5110/31, B*5508/5601/02/04/07/08/09/11/14		
RORO 2	B*4901/02/5001/02, B*51/5306/5606/7801/02/03		
RORO 3	B*27, 56		2704, 5602/04
RORO 4	B*51/53, 52	nicht auswertbar	1521, 40
RORO 5	B*27/40, 3515/31/33	Allele nicht getrennt	
RORO 6	B*56, 40	4035, 5601	40, 5601
RORO 7	B*13, 15		
RORO 8	B*4010		4010
RORO 9	B*13, 55/56		1301, 5602/04
RORO 10	B*56, 27		
RORO 11	B*5601/02/04,4010		
RORO 12	B*5502/04/13/16/5610/12, B*5508/5601/02/04/09/11		
RORO 13	B*15/35/56, 55/56		
RORO 14	B*1306?, 54/55/56/59	4004,5502	4006,5501/02/05
RORO 15	B*40, 53	nicht auswertbar	4011, 5302/04
RORO 16	B*13, 54/55/56/59		1301, 39
RORO 17	B*15/54/55/56, ?		
RORO 18	B*47/4053, 40/4431	nicht auswertbar	
RORO 19	B*40, 54/55/56	nicht auswertbar	4011, 5602/04
RORO 20	B*54/55/56/59, 27/40/47	nicht auswertbar	39, 40
RORO 21	B*55, 13/40/44/47	nicht auswertbar	40, 55
RORO 22	B*4010		

3.4.4 Überprüfung von Haplotypspezifischen Extraktionen

Die Methode der Haplotypspezifischen Extraktion ist eine recht neue Methode, an deren Optimierung weiter gearbeitet wird. Die Überprüfung einer erfolgreichen Alleltrennung, ohne eine komplette HLA-Typisierung ist eine praktische Anwendung der Pyrosequencing Methode. Sie ist gegenüber der Typisierung mit SSO oder SBT effizient, weil verhältnismäßig wenig HSE-Produkt verbraucht wird und die Durchführung schnell und vergleichsweise preiswert möglich ist. Es ist nur ein Pyrosequencing Schritt nötig, um an einer bekannten heterozygoten Position den Erfolg der Alleltrennung zu überprüfen. In Abbildung 3.12, oben ist das Pyrogramm einer heterozygoten Probe dargestellt. Aus dieser DNA Probe wurden in zwei HSE-Reaktionen die beiden Allele extrahiert und anschließend die DNA mittels REPLIg vervielfältigt. Das mittlere und das untere Bild zeigen die entsprechenden Pyrogramme der Proben. An den beiden zuvor heterozygoten Positionen sind jeweils nur noch die homozygoten Konstellationen zu erkennen.

Die Pyrosequencing Methode wird routinemäßig im Forschungsprojekt „Forensic Haplotyping“ zur Überprüfung der erfolgreichen Alleltrennung nach HSE eingesetzt.

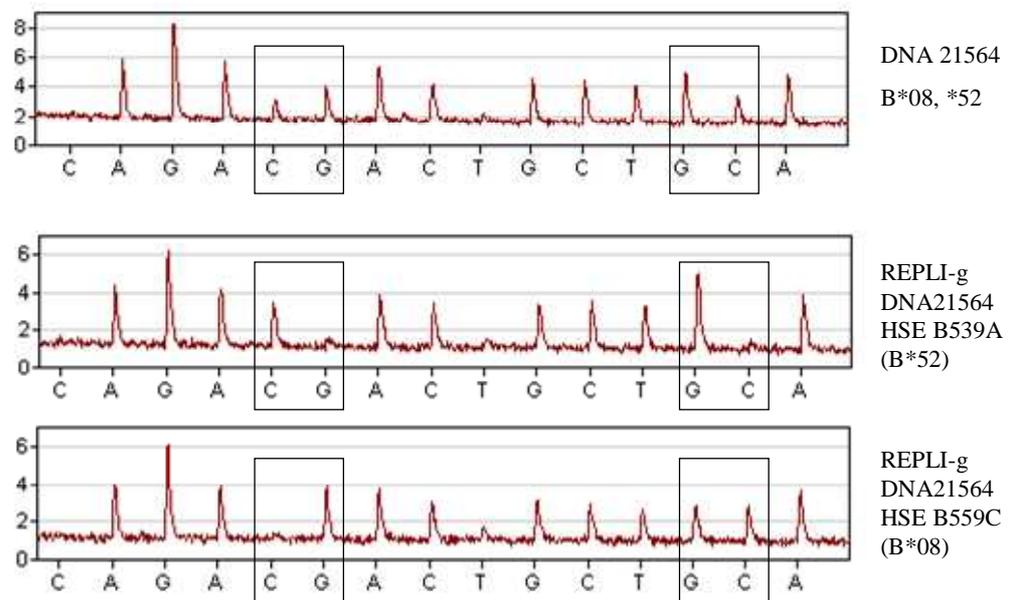


Abb. 3.12 - Pyrogramme vor und nach HSE, PCR B-Ex3, Sequenzierprimer B-S-599. Oben: Pyrosequencing Analyse einer heterozygoten DNA-Probe mit den Allelen B*0801 und B*5201. Mitte und unten: Pyrogramme der Einzel- Allele.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Pyrosequencing-Strategien für die Typisierung der HLA-Genorte HLA-DQB1, -DRB1 und -B erarbeitet. Die Anwendungsmöglichkeiten der Methode liegen im Bereich von Krankheitsassoziations- und Populationsstudien. Diese Studien erfordern in Abhängigkeit von der Fragestellung keine hoch auflösende Typisierung, aber einen hohen Probendurchsatz mit möglichst guter Automation und geringem DNA Verbrauch.

4.1 Sensitivität der Methode

Pyrosequencing wurde ursprünglich zur Anwendung in der SNP-Typisierung entwickelt, also zur Sequenzierung sehr kurzer DNA-Abschnitte mit weitgehend bekannter Sequenz, die idealerweise nur an einer Position Polymorphie aufweisen. Beim Einsatz des Pyrosequencing zur Analyse längere Sequenzen mit mehreren polymorphen Basenkonstellationen ergeben sich Schwierigkeiten, wie absinkende Signalthöhen und aufkommender Hintergrund. Durch den Verdünnungseffekt, der dadurch eintritt, dass immer wieder Nukleotid zugesetzt wird, sind nach einer längeren Sequenzierstrecke Enzym und Substrat nicht mehr in der ursprünglichen Konzentration im Reaktionsmix vorhanden, was sich negativ auf die Signalintensität auswirkt. Die Signalthöhen sind oft nicht mehr genau proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide, was durch die Überlagerung durch Hintergrundsignale zu Stande kommen kann. Durch sogenannte „Schleifen“ im Templatestrang, so wird das Anhybridisieren des 3'-Endes an den Strang bezeichnet, können starke Signale entstehen und die Sequenzierung überlagern. Durch den Einsatz von SSB lassen sich viele dieser Signale reduzieren oder beseitigen (Ronaghi, 2000). Auch eine Variation der Dispensationsreihenfolge kann derartige Probleme lösen. Die Leselänge des Pyrosequencing ist immer abhängig von der Qualität des Templates und der Basenzusammensetzung der speziellen Region. Die Erfahrung zeigt, dass bei der Analyse von unbekanntem, heterozygoten Sequenzen etwa 30 Basen weit gelesen werden kann, Sequenzinformation in weiter entferntem Bereich sollte skeptisch betrachtet werden und nur unter Vorbehalt zur Typisierung herangezogen werden. Bei homozygoten Amplikons, die durch allelspezifische PCR oder durch haplotyp-spezifische Extraktion erreicht werden, können aber auch oft längere Abschnitte zuverlässig gelesen werden.

Zur Optimierung der Pyrosequencingreaktionen wurden verschiedene Versuche unternommen. Variiert wurden die Menge der zur Aufreinigung eingesetzten Dynabeads, die Menge des PCR-Produktes und der Menge an zugesetztem SSB-Protein. Die Verdopplung der PCR-Produktmenge, also der für die Pyrosequencingreaktion zur Verfügung stehenden Templatmenge war insbesondere bei schwachen PCR-Produkten erfolgreich. Eine größere Menge Dynabeads ist dann sinnvoll, wenn das PCR-Produkt besonders intensiv erscheint und mehr ssDNA während der Aufreinigung extrahiert werden soll. Der Einsatz von SSB-Protein erwies sich im Falle von starken Hintergrundsignalen oft als hilfreich wie bei den DRB1-Anwendungsbeispielen. Die Menge muß allerdings für die jeweilige Anwendung optimiert sein. Zu viel SSB-Protein verursacht zu kleine Signalhöhen.

Als Alternative zum SSB-Proteinzusatz wurde die Blockierung der 3' Enden mit ddNTP ausprobiert (Utting, 2004). Dabei wird das 3'-Ende des Pyrosequencing Templates mit einem Didesoxynucleotid blockiert. Dadurch kann zwar nicht das Anhybridisieren des 3'-Endes an eine komplementäre Stelle verhindert werden, aber die Verlängerung wird unterbunden, so dass kein „self-priming“ stattfinden kann. Das Verfahren ist zwar sehr effizient und sicher günstig in Fällen, in denen eine Variation der Primer nicht möglich ist, aber zur routinemäßigen Anwendung ist es zu aufwendig. Jedes PCR-Produkt muss modifiziert werden, was einen weiteren Schritt bedeutet, der gerade in Betracht einer Anwendung im Hochdurchsatz kompliziert wird. Im Zusammenhang mit dem HLA-B Exon 2 wurde diese Methode als zu aufwendig eingeschätzt.

Bei der großen Zahl an bekannten Allelen und der daraus resultierenden enormen Anzahl an möglichen Allelkombinationen ist eine eindeutige hochauflösende Typisierung nicht in allen Fällen möglich. Bei der Optimierung der Typisierungsstrategie wurden vor allem die in der europäischen Bevölkerung häufigen Allele berücksichtigt, die mit einer Häufigkeit von über 0,1% auftreten. Eine Möglichkeit Ambiguitäten aufzulösen, sind Prozesse, die es ermöglichen, die Allele getrennt von einander zu untersuchen, wie die allelspezifische Amplifikation oder die Anwendung der Haplotyp-spezifischen Extraktion. Bei der Untersuchung unbekannter DNA-Proben mit dem Ziel einer hochauflösenden Typisierung sollten immer alle möglichen Sequenzierungsschritte durchgeführt werden. In anderen Fragestellungen, z.B. der genaueren Untersuchung spezieller Abschnitte nach vorangegangener Vortypisierung durch andere Methoden oder der Überprüfung einer HSE kann es auch

ausreichen, lediglich eine oder wenige spezielle Sequenzierschritte durchzuführen, was sowohl zeitlich, als auch ökonomisch günstig ist im Vergleich zu einer „kompletten“ Typisierung.

Der Probendurchsatz der HLA-Typisierung mittels Pyrosequencing ist in erster Linie durch die Auswertung limitiert. Die Auswertung durch die Pyrosequencing Software beschränkt sich auf einen einzelnen SNP (alte Software) bzw. auf maximal 7 polymorphe Positionen (neue Software), wobei eine manuelle Überprüfung nötig ist. Der Schritt der Allelzuordnung, also der Vergleich zwischen gefundenen Sequenzen und bekannten Sequenzen in der Datenbank wird bisher von Hand gemacht und ist daher sehr zeitaufwendig. Die Entwicklung einer Software zur Unterstützung der Pyrosequencing-basierten HLA Typisierung steht noch aus.

4.2 HLA-Klasse II-Typisierung

Die beiden HLA Klasse II Loci DQB1 und DRB1 unterscheiden sich wie schon beschrieben sehr stark in ihrer Komplexität. Zur Untersuchung des DQB1-Genortes, mit derzeit 69 bekannten Allelen (Stand 11.01.2006) genügt eine generische Amplifikation mit anschließenden Pyrosequencing Schritten. Für die DRB1-Typisierung (429 bekannte Allele) wurden allelgruppenspezifische PCR-Schritte vorangesetzt. Dadurch wird einerseits eine Vortypisierung erreicht und in vielen Fällen die homozygote Sequenzierung des Alleles erreicht.

Für die HLA-DQB1-Typisierung gilt, dass die häufigen Allele der Gruppen DQB1*02, DQB1*03 und DQB1*04 mit der Pyrosequencing Strategie generell gut zu typisieren sind. Die Differentierung der Gruppe *05, speziell die Unterscheidung zwischen DQB1*0502 und DQB1*0503 und der Gruppe DQB1*06 speziell die Unterscheidung zwischen den Allelen DQB1*0604 bis DQB1*0609 erfordert sehr lange Leselängen von über 40 Basen mit Sequenzierprimer DQB1-S-229. Theoretisch mögliche Sequenzierprimer, welche sich näher an den betreffenden variablen Resten befänden, weisen eine starke Tendenz zum Mißpriming an anderen Stellen des Amplikons auf. Sollte in diesem Abschnitt eine höhere Auflösung verlangt sein, z.B. beim Verdacht, dass sich dort die Ursache für eine mögliche Assoziation befindet, schlagen wir in der Veröffentlichung (Entz et al., 2005) eine weitere PCR und einen Sequenzierprimer zur Sequenzierung des Abschnitts in 5'-Richtung vor. Mit Hilfe dieser zusätzlichen

Untersuchung wäre die spezifische Auflösung aller polymorphen Positionen in diesem Bereich möglich.

Wenn die beiden Allele bei der HLA-DRB1 Typisierung in unterschiedlichen Amplifikationsgruppen liegen, verhält es sich so, dass die Allele „einzeln“ im Pyrosequencing untersucht werden können. Diese quasi homozygoten Amplifikate erzeugen Pyrogramme, welche lange Leseweiten erlauben und gut auszuwerten sind. Alle Allele mit einer Frequenz über 0,1% in der europäischen Population können in diesem Fall eindeutig typisiert werden. Gehören beide Allele zur gleichen Amplifikationsgruppe, müssen die Auswertungen der Pyrogramme besonders sorgfältig erfolgen. Alle Möglichkeiten von Permutationen der polymorphen Sequenzmotive zwischen den beiden Allelen müssen dann in Betracht gezogen werden.

Bei der Anwendung der HLA-DRB1 Analyse in 30 Kernfamilien, wurden zunächst alle bekannten Allele in der Auswertung mitgeführt. Durch Vergleich der Sequenzen aus den Pyrogrammen und den bekannten Allelen wurde im Ausschlußverfahren ausgewertet. Aus den sich ergebenden Allelen wurden dann die „seltenen“ Allele ausgeschlossen, wodurch jeweils nur ein Ergebnis übrig blieb. Durch die bekannten Familienstrukturen ergab sich eine vererbungs-basierte Kontrolle. Außerdem wurden 19 Proben zusätzlich mit konventionellen HLA-Typisierungsmethoden überprüft.

Bei der Alopecia-Studie wurden die Patienten und Kontrollen im ersten Schritt mittels PCR-SSP typisiert und anschließend nur die statistisch auffälligen Allelgruppen mit der Pyrosequencing-Strategie höher auflösend untersucht. Ein protektiver Effekt von DRB1*03, der schon aus vorangegangenen Studien anderer Arbeitsgruppen mit polnischen (Broniarczyk-Dyla, 2002) und türkischen Patienten (Akar, 2002) berichtet wurde, konnte bestätigt werden. Die Untersuchung bestärkt auch die Hinweise aus anderen Studien, mit Patienten aus Nordamerika (kaukasoide), Großbritannien, Dänemark und der Türkei, dass das Allel DRB1*0401 in der europäischen Population ein Risikofaktor für AA darstellt (Frentz, 1986; Ødum, 1990; Duvic, 1991; Zhang, 1991; Colombe, 1995, 1999; de Andrade, 1999; Akar, 2002). Besonders deutlich war der Effekt in der Gruppe der Patienten mit Alopecia universalis, mit einem p-Wert von 0,0005 zu erkennen.

Auch bei den Patienten, bei denen die Erkrankung in einem frühen Alter erstmals auftrat (Ersterkrankungsalter bis 20 Jahre) tritt das Allel *0401 deutlich häufiger auf ($p=0,002$). Vergleicht man die Gruppe der Patienten mit einem höheren Ersterkrankungsalter als 20 mit der Kontrollgruppe, findet man kaum Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen in Kontrollen und Patienten. Hier ist für keine Allelgruppe ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen von Betroffenen und Gesunden zu erkennen. Wenn man die Gruppe der Alopecia Patienten ohne familiäre Fälle mit den Kontrollen vergleicht, finden sich keine statistisch signifikanten Assoziationen. Für andere, laut Literatur möglicherweise assoziierte Allele wie DRB1*07, *11, *12, *13, *14, *15 und *16 konnten in dem hier untersuchten Patientenkollektiv keine Hinweise gefunden werden (Averbakh, 1986; Frenz, 1986, Orecchia, 1987; Ødum, 1990; Duvic, 1991; Welsh, 1994; Colombe, 1995; Colombe, 1999; de Anrade, 1999; Kavak, 2000; Broniarczyk-Dyła, 2002). Das bestärkt die Annahme, dass sich die krankheits-begünstigenden Allele je nach Population unterscheiden.

4.3 HLA-Klasse I-HLA-B

Eine Strategie zur Typisierung der HLA-Klasse I-Loci zu erarbeiten, erwies sich als deutlich schwerer, als für die Klasse II-Loci. Die Vielfalt an Allelen ohne die günstige Clusterung der Polymorphismen, wie sie am DRB1 Locus vorliegt, und eine Gruppenbildung durch allelgruppenspezifische Amplifikation ermöglicht, machten die Entwicklung einer Typisierungsstrategie mittels Pyrosequencing wesentlich aufwendiger. Die Vielzahl der Sequenzübereinstimmungen mit anderen HLA-Loci und die Problematik der repetitiven Sequenzmotive innerhalb der HLA-B Exone stellten hohe Anforderungen an das Primerdesign. Ausprobiert wurden allelgruppenspezifische Amplifikationen mit verschiedenen spezifischen Primern, eine Amplifikation des Exon 2 in zwei Teilen, die reverse Sequenzierung, eine Verlängerung der Primer durch einen nicht-human-kompatiblen Teil und die Blockierung der 3' Enden mit einem Didesoxynukleotid. Die Ergebnisse waren aber nicht zufrieden stellend. Es wurden unspezifische Abschnitte mit vermehrt oder es erschien ein starker Hintergrund, hervorgerufen durch Schleifenbildung des Templatestrangs. Die auftretenden Probleme konnten erst durch die Einführung einer „nested-PCR“ gelöst werden. Dies bedeutet zwar einen zusätzlichen Amplifikationsschritt, der aber zu qualitativ hochwertigen

Pyrogrammen führt. Die Pyrosequencing Strategie für HLA-B führt anders als die Strategien für die Klasse II Genorte nicht immer zu hoch auflösenden Ergebnissen. Im Allgemeinen werden die Allele zweistellig typisiert.

Bei der Untersuchung der Roro-Proben wurden für die Hälfte der Allele (22 Proben) mindestens zweistellige Ergebnisse erreicht. Die Besonderheit der Proben liegt darin, dass die Blutproben unter Feld-Bedingungen auf Papua Neuguinea gesammelt wurden und bereits seit mehreren Jahren im Tiefkühlfach lagern. Daher ist die aus diesen Blutproben gewonnene DNA zum Teil stark degradiert und nur noch bedingt für „klassische“ HLA-Untersuchungsmethoden einsetzbar. Durch die schlechte Qualität der Proben war eine frühere Untersuchung mit anderen HLA-Typisierungsmethoden für 11 der 22 Proben ohne Ergebnis geblieben. Mit der Pyrosequencing-Strategie konnten alle 22 Proben typisiert werden, allerdings nicht alle mit gleicher Auflösung. Die zuvor gewonnenen Ergebnisse aus der klassischen Sequenzierung wurden zum großen Teil bestätigt. In einigen Fällen (Ro4, Ro9, Ro16 und Ro20) wurden abweichende Allele bestimmt. Auffällig ist, dass die in Mitteleuropa so gut wie gar nicht vorkommenden Allele B*4010 und B*4011 in den 22 Proben je zwei mal erscheinen, weitere HLA-B*40er Allele konnten nicht weiter aufgelöst werden. Wie in Tabelle 4.1 gezeigt kommen B*40er Allele im asiatischen Raum eher vor, als im europäischen. Speziell bei den Ozeanern sind die Allele B*4010 und B*4011 eher anzutreffen, als in anderen Populationen (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc/ihwg.cgi>).

Tabelle 4.1 Allelfrequenzen von HLA- B*40-Allelen

	Europäer	Ozeanier	Süd-Ost-Asiaten	Nord-Ost-Asiaten	Australier
B*40	0,059	0,232	0,214	0,145	0,261
*4001	0,049	0,144	0,165	0,045	0,092
*4002	0,008	0,064	0,036	0,072	0,169
*4003	0	0	0	0,003	0
*4006	0,002	0,013	0,012	0,021	0
*4008	0	0,002	0	0	0
*4010	0	0,005	0,001	0	0
*4011	0	0,002	0	0,001	0
*4012	0	0,002	0	0	0
*4014	0	0,002	0	0	0
*4019	0	0	0	0,003	0

Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc/ihwg.cgi>

4.4 Vergleich mit anderen HLA-Typisierungsmethoden

Die erarbeiteten Protokolle zur Pyrosequencing-basierten HLA-Typisierung können je nach Fragestellung eine Ergänzung oder eine Alternative zu den herkömmlichen HLA-Typing Methoden darstellen. Ein Vorteil liegt in der Schnelligkeit, grade für die Untersuchung kurzer Abschnitte ist die Pyrosequencing basierte Methode schneller in der Durchführung und günstiger, als die konventionelle Sequenzierung. Im Unterschied zu SSO- und SSP-Methoden liefert die Pyrosequenzierung echte Sequenzdaten und könnte daher gegebenenfalls auch Mutationen in den Sequenzen direkt erfassen. Der DNA-Verbrauch für die Typisierung ist verglichen mit der SSP-Methode recht gering, lediglich bei der HLA-DRB1 Typisierung ist er durch den vorgeschalteten gruppenspezifischen SSP-Schritt vergleichbar, wobei bei der reinen SSP-Typisierung durch die Vielzahl an Primerkombinationen mehr DNA in höherer Konzentration verbraucht wird, als bei der Pyrosequencing Strategie. Der Pyrosequencing-Ansatz für HLA-B ist andererseits durch den „Nested-PCR“-Schritt besonders sparsam im DNA-Verbrauch. Der Vorteil der Pyrosequencing Methode im Vergleich zum SBT liegt in den kurzen PCR-Produkten, so dass sich auch bereits degradierte DNA noch zur Typisierung verwenden lässt. Ein Nachteil der Pyrosequencing-basierten Typisierungsmethode liegt derzeit in der Auswertung. Die Pyrosequencing-Software ermöglicht nicht die Auswertung langer, heterozygoter Sequenzen, mit einer Vielzahl polymorpher Positionen. Die manuelle Auswertung der Pyrogramme dauert bei einer kompletten Typisierung vergleichsweise lange und stellt die zeitliche Limitierung dar. Eine Zuordnung ermittelter Sequenzdaten zu den HLA-Allelen wird ebenfalls manuell vorgenommen. Je nach Laborausstattung ist ein Einsatz im Hochdurchsatz möglich, wobei die Auswertung mittels einer entsprechenden Software Grundlage sein muss.

5. Zusammenfassung

Der MHC ist durch seine Funktion eine für die Diagnostik und Forschung äußerst wichtige Region im humanen Genom. Die Untersuchung von HLA-Genorten stellt daher ein wichtiges Instrument in der molekulargenetischen Praxis dar. Die Pyrosequencing-Technik ist gut geeignet, um kurze DNA-Abschnitte mit weitgehend bekannter Sequenz schnell und effizient zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Pyrosequencing-basierten Methoden zur HLA-Typisierung. Exemplarisch wurden für drei wichtige HLA-Genorte Untersuchungsstrategien entwickelt. Die Vorgehensweise wurde jeweils auf die Besonderheiten der unterschiedlichen Genorte angepasst. Die polymorphen Regionen des Locus HLA-DQB1 werden grundsätzlich aus einer generischen Amplifikation heraus mit fünf anschließenden Pyrosequencing Reaktionen erfaßt. Zusätzlich ist die Amplifikation und Untersuchung des Exon 3 in speziellen Fällen vorgesehen. Der Genort HLA-DRB1 wird mittels einer Kombination aus gruppenspezifischen PCR-SSP und Pyrosequencing untersucht. Je nach Allelgruppe sind ein bis sechs Pyrosequencing Schritte zur Typisierung notwendig. Zur Untersuchung des Genortes HLA-B ist eine „nested PCR“-Strategie erarbeitet worden. In einer ersten PCR werden die wesentlichen polymorphen Regionen umfassenden Exone 2 und 3 des HLA-B Genortes als ein zusammenhängender Abschnitt amplifiziert. In den beiden nachfolgenden PCR-Schritten werden dann die Exone 2 und 3 getrennt amplifiziert. Zur Untersuchung des Exon 2 schließen sich zehn, zur Untersuchung des Exon 3 acht Pyrosequencing Reaktionen an. Die Strategien wurden an Standardproben validiert und in Kleinstudien angewendet. Es wurde eine Fall-Kontroll-Studie zur Untersuchung einer möglichen Assoziation zwischen HLA-DRB1 und Alopecia areata, sowie eine populationsgenetische Untersuchung mit Hilfe der entwickelten Typisierungsstrategie durchgeführt. Für die Haplotyp-spezifische Extraktion stellt die Pyrosequencing-Methode eine gute Möglichkeit dar, die Alleltrennung schnell und günstig zu überprüfen. Die Pyrosequencing Protokolle bieten eine sehr effiziente Alternative und Ergänzung zu den bestehenden HLA-Typisierungsmethoden.

6. Anhang

6.1 Links zu Webseiten

<http://ncbi.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mhc/MHC.cgi?cmd=init>

<http://ebi.ac.uk/imgt/hla/index.html>

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>

<http://techsupport.pyrosequencing.com/v2/index.asp>

<http://courses.washington.edu/bioinfo/BIR/>

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>

<http://dict.leo.org/>

<http://www.efiweb.org/links.html>

<http://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skripte/biomathe/bio/vierf.html>

http://geneva.unige.ch/tools/data_analysis/dahla.php

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

<http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/search.phtml?bibid=MBCB>

<http://www.biotage.de>

6.2 Abkürzungen

AA	Alopecia areata
AS	Aminosäure
AT	Alopecis totalis
AU	Alopecia universalis
BLAST	Basic Local Alignment Tool
BSHI	British Society for Histocompatibility & Immunogenetics (Britische Gesellschaft für Histokompatibilität und Immunogenetik)
CCD	charge coupled device (ladungsgekoppeltes Gerät)
db	database (Datenbank)
DGI	Deutsche Gesellschaft für Immunogenetik
DNA	Didesoxyribonucleinsäure
DZA	Deutscher Zellaustausch

efi	European Federation for Immunogenetics (Europäische Föderation für Immunogenetik)
Ex	Exon
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HS	high sensitivity (hohe Empfindlichkeit)
HSP	Hitzeschockprotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IHWG	International Histocompatibility Working Group (Internationale Histokompatibilitäts Arbeitsgruppe)
LCT	Mikrolymphozytotoxizitätstest
LD	Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex)
MS	Mikosatellit
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PNG	Papua Neuguinea
PPi	Pyrophosphat
SBT	Sequenzierungs- basiertes Typing
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SSO	Sequenz spezifische Oligohybridisierung
SSP	Sequenz spezifisches Priming
TdT	Terminale Transferase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
WGA	Whole genome amplification (Geamtgenom Amplifikation)

6.3 Literaturverzeichnis

Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson A.C. et al. Single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by Pyrosequencing™. *Biotechnol Appl Biochem* 2000; 280: 103-110.

Akar A, Orkunoglu E, Sengül A, Ozata M, Gür AR. HLA class II in patients with alopecia areata *Eur J Dermatol* , 2002;12:236-239

Allen M, Eriksson I, Liu L, Gyllensten U. High resolution genetic typing of the class II HLA-DRB1 locus using group-specific amplification and SSO-hybridisation in microplates. *Hereditas* 1998; 129: 161-167.

Andersson G, Larhammer D, Widmark E, Serenius B, Peterson PA, Rask L. Class II genes of the major histocompatibility complex: organisation and evolutionary relationship of the DRB genes. *J Biol Chem* 1987; 262: 8748-8758.

Averbakh EV, Pospelov LE. HLA antigens of patients with alopecia areata. *Vestn Dermatol Venerol.* 1986;(1):24

Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9979-9984.

Bodmer JG, Marsh SGE, Albert E et al. Nomenclature for Factors of the HLA System. *Tissue Antigens* 1991; 39: 1-13.

Broniarczyk-Dyla G, Prusinska-Bratos M, Dubla-Berner M et al. The protective role of the HLA-DR locus in patients with various clinical types of alopecia areata. *Arch Immunol Ther Exp* 2002;50:333-336

Charron D. HLA and disease. In: Charron D, ed. *Genetic diversity of HLA. Functional and medical implication.* Paris: EDK, 1997: 597-767.

Colombe B, Price VH, Khoury EL, Garovoy MR, Lou CD. HLA class II antigen associations help to define two types of alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:757-764

Colombe BW, Lou CD, Price VH. The genetic basis of alopecia areata: HLA associations with patchy alopecia areata versus alopecia totalis and alopecia universalis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999;4:216-219

Dausset J: Iso-leuko-anticorps. *Acta haemat* 1958; 20:156-166

Dausset J: Leuko-agglutinins. IV leukoagglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 1954; 4:190-198

De Anrade M, Jackow CM, Dahm N, Hordinsky M, Reveille JD, Duvic M. Alopecia areata in families: associations with the HLA locus. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999;4:220-223

- Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 April 16; 99(8): 5261–5266.
- Duvic M, Hordinsky MK, Fiedler VC, O'Brien WR, Young R, Reveille JD. HLA-D locus associations in alopecia areata. DRw52a may confer disease resistance. *Arch Dermatol*. 1991;127(1):64-8.
- Duvic M, Welsh EA, Jackow C, Papadopoulos E, Reveille JD, Amos C. (1995) Analysis of HLA-D locus alleles in alopecia areata patients and families. *Arch Dermatol* 1995;104(suppl):5S-6S
- Frentz G, Thomsen K, Jakobsen BK, Svejgaard A. HLA-DR4 in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1986;14:129-130
- Hampe J, Shaw SH, Saiz R et al. Linkage of Inflammatory Bowel Disease to Human Chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1999 : 65:1647-1655.
- Hampe J, Valentonyte R, Manaster C. et al. A non-electrophoretic method for high-throughput HLA-DRB1 group genotyping. *Biotechniques* 2004: 36: 148-151.
- Hellani A , Coskun S , Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Al-Odaib A, Ozand P: Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod* 2004;10(11):847-52
- Hulsmeyer M, Fiorillo MT, Bettosini F, Sorrentino R, Saenger W, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B. HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide. *J Exp Med*. 2004 19;199(2):271-81.
- Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 2001: 29: 233-237.
- Kavak A, Baykal C, Özarmagan G, Akar U. HLA in alopecia areata. *Int J Dermatol* 2000;39:589-592
- Kimura A, Sasazuki T. Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. Oxford: Oxford University Press, 1991: 397-419.
- Kotsch K, Wehling J, Blasczyk R. Sequencing of HLA class II genes based on the conserved diversity of the non-coding regions: sequencing based typing of HLA-DRB genes. *Tissue Antigens* 1999: 53: 486-497.
- Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF. Nomenclature for factors of the HLA system. *Eur J Immunogenet* 2002: 29:463-515.
- Mayr WR: Das HLA-System: Genetik und praktische Bedeutung. *Transfusionsmedizin aktuell* 1992
-

McDonagh AJG, Tazi-Ahnini R. Epidemiology and genetics of alopecia areata. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:405-409

Mercier B, Al Daccak R, Samaan A, et al. HLA-DRB and -DQB typing by PCR amplification using sequence-specific primers (PCR-SSP): assessment after 1 year of routine use by three laboratories. *Eur J Immunogenet* 1994; 21:105-123.

Odum N, Morling N, Georgsen J, Jakobsen BK, Frenzt G, Jensen GF, Fugger L, Svejgaard A. HLA-DP antigens in patients with alopecia areata. *Tissue Antigens*. 1990;35(3):114-7.

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 transplantations. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-235.

Olsen E, Hordinsky M, McDonal-Hull S et al. Alopecia areata investigational assessment guidelines. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:242-246

Orecchia G, Belvedere MC, Martinetti M, Capelli E, Rabbiosi G. Human leukocyte antigen region involvement in the genetic predisposition to alopecia areata. *Dermatologica* 1987;175:10-14

Payne R, Rolfs MR: Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest* 1958; 37:1756-1763

Ramon D, Braden M, Adams S, Marincola FM, Wang L. Pyrosequencing™: A one-step method for high resolution HLA typing. *Journal of Translational Medicine* 2003; 1:9

Ringquist S, Alexander AM, Rudert WA, Styche A, Trucco M. Pyrosequence-based typing of alleles of the HLA-DQB1 gene. *Biotechniques* 2002; 33: 166-175.

Ringquist S, Alexander AM, Styche A, Pecoraro C, Rudert WA, Trucco M. HLA Class II DRB High Resolution Genotyping by Pyrosequencing™ : Comparison of Group Specific PCR and Pyrosequencing™ Primers. *Hum Immunol* 2004; 65:163-174.

Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998; 281: 363-365.

Ronaghi M. Improved performance of Pyrosequencing™ using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem* 2000; 286: 282-288.

Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* 2001;11: 3-11

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239(4839):487-91

Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA. Rapid Typing of the DNA Sequence Polymorphism at the HLA-DRB1 Locus using the Polymerase Chain Reaction and Nonreactive

Oligonucleotide Probes. *Human Immunology* 1991; 30: 190-201.

Shiina T, Inoko H, Kulski JK An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations:2004. *Tissue Antigens* 2004;64:631-649

Svejgaard A. HLA and disease - the molecular basis. Copenhagen, 1997. - ISBN 87-16-11942-8: 272-278

Thorsby E.HLA associated diseases. *Human Immunology* 1997;53:1-11.

Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg.) Proceedings of the 11th internat.Histocompatibility Workshop and Conference held in Yokohama, Japan. Oxford: Oxford University Press, 1992

Utting M, Hampe J, Platzer M, Huse K. Locking of 3' ends of single-stranded DNA templates for improved Pyrosequencing performance. *Biotechniques*. 2004 Jul;37(1):66-7, 70-3.

Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seeger D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Muller-Quernheim J, Schurmann M, Schreiber S. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet*. 2005 Apr;37(4):357-64. Erratum in: *Nat Genet*. 2005 Jun;37(6):652.

Welsh EA, Clark HH, Epstein SZ, Reveille JD, Duvic M. Human leukocyte antigen-DQB1*03 alleles are associated with alopecia areata. *J Invest Dermatol*. 1994;103(6):758-63

Winchester R, Chen Y, Rose S, Selby J, Borkowsky W. Major histocompatibility complex class II DR alleles DRB1*1501 and those encoding HLA-DR13 are referentially associated with a diminution in maternally transmitted human immunodeficiency virus 1 infection in different ethnic groups: determination by an automated sequence-based typing method. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:12374-12378.

Winchester R, Dwyer E, Rose S. The genetic basis of rheumatoid arthritis. The shared epitope hypothesis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 761-83.

Wu J, Williams TM. DRB1/3/5 Locus Sequence Based Allele Identification. In: M.G.J. Tilanus, J.A. Hansen and C. Hurley (Eds.), *IHWG Technical Manual Genomic Analysis of the Human MHC - DNA-Based Typing for HLA Alleles and Linked Polymorphisms*. International Histocompatibility Working Group 2002.

Wu J, Griffith BB, Bassinger S et al. Strategies for unambiguous detection of allelic heterozygosity via direct DNA sequencing of PCR products: Application to the HLA DRB1 locus. *Mol Diag* 1996; 1:89-98.

Zhang L, Weetman AP, Friedmann PS, Oliveira DB. (1991) HLA associations with alopecia areata. *Tissue Antigens* 1991;38:89-91

6.4 Publikationsverzeichnis

6.4.1 Artikel

Hampe J, Valentonyte R, Manaster C, Teuber M, Jenisch S, **Entz P**, Nagy M, Schreiber S. Nonelectrophoretic method for high-throughput HLA-DRB1 group genotyping. *Biotechniques*. 2004 Jan;36(1):148-51.

Entz P, Toliat MR, Hampe J, Valentonyte R, Jenisch S, Nurnberg P, Nagy M. New strategies for efficient typing of HLA class-II loci DQB1 and DRB1 by using Pyrosequencing. *Tissue Antigens*. 2005 Jan;65(1):67-80.

Godde R, Rohde K, Becker C, Toliat MR, **Entz P**, Suk A, Muller N, Sindern E, Haupts M, Schimrigk S, Nürnberg P, Epplen JT. Association of the HLA region with multiple sclerosis as confirmed by a genome screen using >10,000 SNPs on DNA chips. *J Mol Med*. 2005 Jun;83(6):486-94. Epub 2005 Mar 16.

Entz P, Blaumeiser B, Betz RC, Lambert J, Seymons K, Eigelshoven S, Hanneken S, Kruse R, Nürnberg P, Nagy M, Nöthen MM. Investigation of the HLA-DRB1 locus in alopecia areata. *European Journal of Dermatology*. 2006; 16 (4): 363-7

6.4.2 Vorträge

Entz P, Nagy M: PyrosequencingTM - A fast and reliable method for SNP-typing and short length DNA- sequencing, 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 17.-20. September 2003, Münster

Entz P, Nagy M: Strategien zur HLA-Klasse II Typisierung mit PyrosequencingTM 12. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immungenetik, 14.-16. Oktober 2004, Dresden

6.4.3 Poster

Entz P, Nagy M, Toliat MR, Hampe J, Nürnberg P. PyrosequencingTM – A Panacea for HLA-Typing? NGFN-Meeting, The genetic and molecular basis of human disease, 17.-19. November 2002, Berlin

Entz P, Nagy M, Toliat MR, Hampe J, Jenisch S, Nürnberg P. PyrosequencingTM - Strategies for HLA-Class II Highresolution Typing, NGFN-Meeting – Patient based studies, 23.-25. April 2003 München

Entz P, Toliat MR, Hampe J, Jenisch S, Nürnberg P, Nagy M. Pyrosequencing-Strategies for HLA-Class II Highresolution Typing. 11. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immungenetik DGI/17th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Mai 2003, Baden Baden

Entz P, Nürnberg P, Nagy M.: PyrosequencingTM-based HLA-Typing, 19th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 23.-26. April 2005 Istanbul, Türkei

6.5 Sequenzübersichten

Zur Orientierung sind jeweils die Sequenzen der häufig vorkommenden Allele der bearbeiteten Gen-Loci mit PCR-Primern und Sequenzierprimern dargestellt.

Die genauen Beschreibungen der Primer befinden sich im Ergebnisteil in den Tabellen 3.1, 3.3, 3.5, 3.6, 3.8 und 3.9.

6.5.1 Häufig vorkommende HLA-DQB1 Allele

	Exon2->									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
DQB1*0201	ACTCTCCCG	A GGATTTTCGTG	TACCAGTTTA	AGGGCATGTG	CTACTTCACC	AACGGGACAG	AGCGCGTGCG	TCTTGTGAGC	AGAAGCATCT	ATAACCGAGA
DQB1*050101	-----	-	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	GGG-----C-	---CA-----	-----
DQB1*050102	****	-----	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	GGG-----C-	---CA-----	-----
DQB1*050201	-----	-	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	GGG-----C-	---CA-----	-----
DQB1*050202	*****	* *****	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	GGG-----C-	---CA-----	-----
DQB1*0504	*****	* *****	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	GGG-----C-	---TA-----	-----
DQB1*0202	-----	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030101	-----	-	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	-TA-----C-	---TA-----	-----
DQB1*030102	*****	* *****	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	-TA-----C-	---TA-----	-----
DQB1*030201	-----	-	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----C-	---TA-----	-----
DQB1*030202	*****	-	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----C-	---TA-----	-----
DQB1*0304	-----	-	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	-TA-----C-	---TA-----	-----
DQB1*030501	*****	-	-----	-----	-----	-----C-----	-----	GGG-----C-	---TA-----	-----
DQB1*030502	*****	-	-----	-----	-----	-----G-----	-----	GGG-----C-	---TA-----	-----
DQB1*030503	*****	-	-----	-----	-----	-----C-----	-----	GGG-----C-	---TA-----	-----
DQB1*0401	-----	-	-----	-T-----	-----	-----C-----	---T-----	GGG-----C-	---TA-----	-----
DQB1*0402	-----	-	-----	-T-----	-----	-----C-----	-----	GGG-----C-	---TA-----	-----
DQB1*060101	--C-----	-	-----	CT-----	---C-----	---T-----G-----	-----	-TA-----C-	---TA-----	-----
DQB1*060102	*****	* *****	*****	**--C-----	-----	-----G-----	-----	-TA-----C-	---TA-----	-----
DQB1*060103	--C-----	-	-----	CT-----	---C-----	---T-----G-----	-----	-TA-----C-	---TA-----	-----
DQB1*0602	-----	-	-----	-T-----	-----	-----G-----	-----	-----C-	---TA-----	-----
DQB1*0603	-----	-	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----A-C-	---CA-----	-----
DQB1*060401	-----	-	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----A-C-	---CA-----	-----
DQB1*060402	**	-----	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----A-C-	---CA-----	-----
DQB1*060501	-----	-	-----	-----C-----	-----	-----G-----	-----	-----A-C-	---TA-----	-----
DQB1*060502	*****	* *****	*****	*****	*****	*****	****	-----G-----	-----A-C-	---TA-----
DQB1*0607	*****	* *****	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----A-C-	---CA-----	-----
DQB1*0608	*****	* *****	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----A-C-	---CA-----	-----
DQB1*0609	-----	-	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----A-C-	---TA-----	-----

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
DQB1*0201	AGAGATCGTG	CGCTTCGACA	GCGACGTCGG	GGAGTTCCCG	GCGGTGACGC	TGCTGGGGCT	GCCTGCCGCC	GAGTACTGGA	ACAGCCAGAA	GGA	CATCCTG
DQB1*050101	G---TA----	-----	-----	--T--A----	--A-----	C--A-----G	----TT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*050102	G---TA----	-----	-----	--T--A----	-----	C--A-----G	----TT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*050201	G---TA----	-----	-----	--T--A----	-----	C--A-----G	----AG---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*050202	G---TA----	-----	-----	--T--AT--	-----	C--A-----G	----AG---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*0504	---TA----	-----	-----	--T--A----	-----	C--A-----G	----AG---	-----	-----	---	-----
DQB1*0202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030101	G--TA--CA	-----	-----A	--T--A----	-----	C-----C	----A----	-----	-----	---	AG-----
DQB1*030102	G--TA--C-	-----	-----A	--T--A----	-----	C-----C	----A----	-----	-----	---	AG-----
DQB1*030201	G--TA--CA	-----	-----	--T--AT--	-----	C-----C	-----	-----	-----	---	AG-----
DQB1*030202	G--TA--CA	-----	-----	--T--AT--	-----	C-----C	-----	-----	-----	---	AG-----
DQB1*0304	G--TA--CA	-----	-----A	--T--A----	-----	C-----C	----T--A--	-----	-----	---	AG-----
DQB1*030501	G--TA--C-	-----	-----	--T--AT--	-----	C-----C	-----	-----	-----	---	AG-----
DQB1*030502	G--TA--C-	-----	-----	--T--AT--	-----	C-----C	-----	-----	-----	---	AG-----
DQB1*030503	G--TA--CA	-----	-----	--T--AT--	-----	C-----C	-----	-----	-----	---	AG-----
DQB1*0401	G--TA--C-	-----	-----	--T--AT--	-----	C-----G	--T--A----	-----	-T-----	---	-----
DQB1*0402	G--TA--C-	-----	-----	--T--AT--	-----	C-----G	--T--A----	-----	-T-----	---	-----
DQB1*060101	G--GA----	-----	-----	--T--AT--	-----	C--A-----G	----A----	-----	-----	---	-----
DQB1*060102	G--GA----	-----	-----	--T--AT--	-----C-	C--A-----G	----A----	-----	-----	---	-----
DQB1*060103	G--GA----	-----	-----	--T--AT--	-----	C--A-----G	----A----	-----	-----	---	-----
DQB1*0602	G--TA--C-	-----	-----	--T--A--C	-----	C--A-----G	----AT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*0603	G--TA--C-	-----	-----	--T--A--C	-----	C--A-----G	----AT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*060401	G--TA--C-	-----	-----	--T--A----	-----	C--A-----G	----TT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*060402	G--TA--C-	-----	-----	--T--A--C	-----	C--A-----G	----TT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*060501	G--TA--C-	-----	-----	--T--A----	-----	C--A-----G	----TT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*060502	G--TA--C-	-----	-----	--T--A----	-----	C--A-----G	----T----	-----	-----	---	AG-----
DQB1*0607	G--TA--C-	-----	-----	--T--A--C	-----	C--A-----G	----AT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*0608	G--TA--C-	-----	-----	--T--A--C	-----	C--A-----G	----TT---	-----	-----	---	AG-----
DQB1*0609	G--TA--C-	-----	-----	--T--A----	-----	C--A-----G	----TT---	-----	-----	---	AG-----

	310	320	330	340	350	360	370	Exon2 380	Exon3-> 390	400
DQB1*0201	GAGAGGAAAC	GGGCGGCGGT	GGACAGGGTG	<u>TGCAGACACA</u> ACTAC	CAGTT	GGAGCTCCGC	ACGACCTTGC	AGCGGCGAG	T GGAGCCCACA	GTGACCATCT
DQB1*050101	---G--GCC-	-----T----	-----	-----	-----G--G-	--C-TA----	GG--T-C---	--A--A---	-	-----
DQB1*050102	---G--GCC-	-----T----	-----A--	-----	-----G--G-	--C-TA----	GG--T-C---	--A--****	*	*****
DQB1*050201	---G--GCC-	-----T----	-----A--	-----	-----G--G-	--C-TA----	GG--T-C---	--A--A---	-	-----
DQB1*050202	---G--GCC-	-----T----	-----A--	-----	-----G--G-	--C-TA----	GG--T-C---	--A--A***	*	*****
DQB1*0504	---GA-G-C-	-----T----	-----	-----	-----*****	*****	*****	*****	*	*****
DQB1*0202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----
DQB1*030101	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----
DQB1*030102	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----	-----	-----	-----	*	*****
DQB1*030201	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----
DQB1*030202	-----CC-	-----A-C-	-----C----	-----	-----	-----	-----	-----	*	*****
DQB1*0304	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----
DQB1*030501	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----
DQB1*030502	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----	-----	-----	-----	*	*****
DQB1*030503	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----	-----	-----	-----	*	*****
DQB1*0401	---GA-G-C-	-----T----	-----CC--A	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----
DQB1*0402	---GA-G-C-	-----T----	-----CC--A	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----
DQB1*060101	-----CC-	-A---A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--C-T-----	GG--T-----	--A--A---	-	-----
DQB1*060102	-----CC-	-A---A-T-	-----C----	-----****	*****	*****	*****	*****	*	*****
DQB1*060103	-----CC-	-A---A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--C-T-----	GG--T-----	--A--A---	-	-----
DQB1*0602	---G---CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--C-T-----	GG--T-----	--A--A---	-	-----
DQB1*0603	---G---CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--C-T-----	GG--T-----	--A--A---	-	-----
DQB1*060401	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--G-TA----	GG--T-C---	--A--A---	-	-----
DQB1*060402	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--G-TA----	GG--T-C---	--A--A---	-	-----
DQB1*060501	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--G-TA----	GG--T-C---	--A--A---	-	-----
DQB1*060502	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----C-***	*****	*****	*****	*****	*	*****
DQB1*0607	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--G-TA----	GG--T-C***	*****	*	*****
DQB1*0608	---G---CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--C-T-----	GG--T-----	*****	*	*****
DQB1*0609	-----CC-	-----A-T-	-----C----	-----	-----G--G-	--G-TA----	GG--T-C---	--A--A---	-	-----

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
DQB1*0201	CCCCATCCAG	GACAGAGGCC	CTCAACCACC	ACAACCTGCT	GGTCTGCTCG	GTGACAGATT	TCTATCCAGC	CCAGATCAAA	GTCCGGTGGT	TTCGGAATGA
DQB1*0202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G
DQB1*030101	-----	-----	-----	-----	-----A	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030102	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*030201	-----	-----	-----	-----	-----A	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030202	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*0304	-----	-----	-----	-----	-----A	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030501	-----	-----	-----	-----	-----A	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030502	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*030503	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
DQB1*0201	CCAGGAGGAG	ACAGCTGGCG	TTGTGTCCAC	CCCCCTTATT	AGGAATGGTG	ACTGGACCTT	CCAGATCCTG	GTGATGCTGG	AAATGACTCC	CCAGCGTGGA
DQB1*0202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030101	-----	---A-C---	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	---AATGACTCC CCAGCA---	-----
DQB1*030102	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*030201	-----	---A---	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030202	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*0304	-----	---A-C---	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-----	---A---
DQB1*030501	-----	---A---	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030502	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*030503	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*0309	-----	---A-C---	-----	-----	---C---	-----	-----	-----	-----	---A-...

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
DQB1*0201	GACGCTCTACA	CCTGCCACGT	GGAGCACCCC	AGCCTCCAGA	GCCCCATCAC	CGTGGAGTGG	CGGGCTCAAT	CTGAATCTGC	CCAGAGCAAG	ATGCTGAGTG
DQB1*0202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DQB1*030101	-----	-----	-----	-----	A-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
DQB1*030102	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*030201	-----	-----	-----	-----	A-----T	-----	-----G-	-----	-----	-----
DQB1*030202	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*0304	-----	-----	-----	-----	A-----	-----	-----G-	-----	-----	-----*****
DQB1*030501	-----	-----	-----	-----	A-----T	-----	-----G-	-----	-----	-----*****
DQB1*030502	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*030503	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DQB1*0309	-C-----	-----	-----	-----	A-----	-----	-----G-	-----	-----	-----

6.5.2 Häufig vorkommende HLA-DRB1-Allele

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
DRB1*010101	CACGTTTCTT	GTGGCAGCTT	AAGTTTGAAT	GTCATTTCTT	CAATGGGACG	GAGCGGGTGC	GGTTGCTGGA	AAGATGCATC	TATAACCAAG	AGGAGTCCGT
DRB1*010102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*010201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*010202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*0103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*030101	-----	-GA-T-CTC-	-C--C--G-	-----	-----	-----	AC-----	C--A-T--C-	-----G-	-----AA--
DRB1*030102	-----	-GA-T-CTC-	-C--C--G-	-----	-----	-----	AC-----	C--A-T--C-	-----G-	-----AA--
DRB1*030201	-----	-GA-T-CTC-	-C--C--G-	-----	-----	-----	C-----	G--A-T--C-	-----G-	-----AA--
DRB1*030202	-----	-GA-T-CTC-	-C--C--G-	-----	-----	-----	C-----	G--A-T--C-	-----G-	-----AA--
DRB1*0304	-----	-GA-T-CTC-	-C--C--G-	-----	-----	-----	AC-----	C--A-T--C-	-----G-	-----
DRB1*040101	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040102	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-A---A--
DRB1*0402	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040301	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040302	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*0404	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040501	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040502	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040503	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040504	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040701	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040702	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*040703	-----	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*0408	***	-GA---G--	--ACA--G-	-----	C-----	-----	C-----	C--A-T--	--C-----	-----A--
DRB1*070101	-----	-C------GG-	----A-A-G-	-----	C-----	-----	A--C-----	CT-T-----	-----G-	-----T--
DRB1*070102	-----	-C------GG-	----A-A-G-	-----	C-----	-----	A--C-----	CT-T-----	-----G-	-----T--
DRB1*080101	-----	-GA-T-CTC-	-C-GG--G-	--T-----	-----	-----	C-----	C--A-T--	-----	-----A--
DRB1*080102	-----	-GA-T-CTC-	-C-GG--G-	--T-----	-----	-----	C-----	C--ATT--	-----	-----A--
DRB1*080401	-----	-GA-T-CTC-	-C-GG--G-	--T-----	-----	-----	C-----	C--A-T--	-----	-----A--
DRB1*080402	*****	*****	*****	*****	-----	-----	C-----	C--A-T--	-----	-----A--
DRB1*080403	-----	-GA-T-CTC-	-C-GG--G-	--T-----	-----	-----	C-----	C--A-T--	-----	-----A--
DRB1*080404	-----	-GA-T-CTC-	-C-GG--G-	--T-----	-----	-----	C-----	C--A-T--	-----	-----A--
DRB1*0805	-----	-GA-T-CTC-	-C-GG--G-	--T-----	-----	-----	C-----	C--A-T--	-----	-----A--
DRB1*0806	-----	-GA-T-CTC-	-C-GG--G-	--T-----	-----	-----	C-----	C--A-T--	-----	-----A--
DRB1*090102	-----	-AA---GA-	-----G-	-----	C-----	-----	AT--C-	C--G-----	-----	-----AA--
DRB1*100101	-----	-GA-G--G-	-----G-	-----	C-----	-----	-----	C--G--C-	-----	-----A--C
DRB1*100102	-----	-GA-G--G-	-----G-	-----	C-----	-----	-----	C--G--C-	-----	-----A--C

DRB1*110101	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*110102	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*110103	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*110104	**	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-C-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*110105	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*1102	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*1103	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*110401	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*110402	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*120101	----	-GA-T-CTC-	-C--GG-	-G-	-T-----	-----	-----	-----	A-----	G--CA-T--	C-----	-G-	---CT-C-
DRB1*120102	----	-GA-T-CTC-	-C--GG-	-G-	-T-----	-----	-----	-----	A-----	G--CA-T--	C-----	-G-	---CT-C-
DRB1*130101	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---AA-
DRB1*130102	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---AA-
DRB1*130103	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---AA-
DRB1*130201	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---AA-
DRB1*130202	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---AA-
DRB1*130301	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*130302	*****	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-----	A---
DRB1*1305	**	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---AA-
DRB1*1308	*****	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---T-
DRB1*140101	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---T-
DRB1*140102	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---T-
DRB1*1404	----	-GA-T-CTC-	-C--GG-	-G-	-T-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---T-
DRB1*140701	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---T-
DRB1*140702	----	-GA-T-CTC-	-C--C-	-G-	-----	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	C-----	-G-	---T-
DRB1*150101	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*150102	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*150103	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*150104	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*150105	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-C-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*150201	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*150202	*****	*****	*****	*****	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*150203	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-T--	-G-
DRB1*1503	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---CA-T--	-----	-G-	-----
DRB1*160101	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*160102	**	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*160201	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*160202	****	----	-C-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----
DRB1*1605	*****	***C-	-----	-C-----	-AGG-	-G-	-----	-----	C-----	C---A-T--	-----	-G-	-----

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
DRB1*010101	GCGCTTCGAC	AGCGACGTCG	GGGAGTACCG	GGCGGTGACG	GAGCTGGGGC	GGCCTGATGC	CGAGTACTG	GAACAGCCAGA	AGGACCTCCT	GGAGCAGAGG
DRB1*010102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*010201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*010202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*0103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----	-----AG-CGA-----
DRB1*030101	-----	-----	-----T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*030102	-----	-----	-----T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*030201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*030202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*0304	-----	-----	-----T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*040101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*040102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*0402	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----	-----AG-CGA-----
DRB1*040301	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*040302	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-----	-----T-----	-----	-----	-----
DRB1*0404	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*040501	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGC-----	-----	-----	-----
DRB1*040502	-----G-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGC-----	-----	-----	-----
DRB1*040503	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGC-----	-----	-----	-----
DRB1*040504	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGC-----	-----	-----	-----
DRB1*040701	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*040702	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-----
DRB1*040703	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*0408	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*070101	-----	-----	-----	-----	-----A-----	-----TC-----	-----C-----	-----	-----A-----	-----G-C-----
DRB1*070102	-----	-----	-----	-----	-----A-----	-----TC-----	-----C-----	-----	-----A-----	-----G-C-----
DRB1*080101	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGC-----	-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*080102	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGC-----	-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*080401	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*080402	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*080403	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*080404	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*0805	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGC-----	-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*0806	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGC-----	-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*090102	-----	-----	-----	-----	-----	-----TC-----	-----C-----	-----	-----T-----	-----G-----
DRB1*100101	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-----
DRB1*100102	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-----
DRB1*110101	-----	-----	-----T-----	-----	-----	-----	-----A G-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----
DRB1*110102	-----	-----	-----T-----	-----	-----	-----	-----A G-----	-----	-----T-----	-----AG-C-----

DRB1*110103	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	A	G	-----	-----	T	-----	AG	C	-----	
DRB1*110104	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	A	G	-----	-----	T	-----	AG	C	-----	
DRB1*110105	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	A	G	-----	-----	T	-----	AG	C	-----	
DRB1*1102	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	A	G	-----	-----	A	-----	AG	CGA	-----	
DRB1*1103	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	A	G	-----	-----	T	-----	AG	CGA	-----	
DRB1*110401	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	A	G	-----	-----	T	-----	AG	C	-----	
DRB1*110402	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	A	G	-----	-----	T	-----	AG	C	-----	
DRB1*120101	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	TC	-----	C	-----	A	-----	AG	C	-----	
DRB1*120102	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	TC	-----	C	-----	A	-----	AG	C	-----	
DRB1*130101	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----	AG	CGA	-----	
DRB1*130102	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----	AG	CGA	-----	
DRB1*130103	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----	AG	CGA	-----	
DRB1*130201	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----	AG	CGA	-----	
DRB1*130202	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----	AG	CGA	-----	
DRB1*130301	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AGC	-----	-----	-----	A	-----	AG	C	A	
DRB1*130302	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AGC	-----	-----	-----	A	-----	AG	C	A	
DRB1*1305	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	AG	C	-----	
DRB1*1308	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----	AG	CGA	-----	
DRB1*140101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	G	-----	C	-----	-----	G	-----	
DRB1*140102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	G	-----	C	-----	-----	G	-----	
DRB1*1404	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	G	-----	C	-----	-----	G	-----	
DRB1*140701	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	G	-----	C	-----	-----	G	-----	
DRB1*140702	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	G	-----	C	-----	-----	G	-----	
DRB1*150101	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	A	-----	GC	-----	
DRB1*150102	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	A	-----	GC	-----	
DRB1*150103	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	A	-----	GC	-----	
DRB1*150104	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----	GC	-----	-----	
DRB1*150105	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	A	-----	GC	-----	
DRB1*150201	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	A	-----	GC	-----	
DRB1*150202	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----	GC	-----	-----	
DRB1*150203	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	A	-----	GC	-----	
DRB1*1503	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	A	-----	GC	-----	
DRB1*160101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	T	-----	AG	C	-----
DRB1*160102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	T	-----	AG	C	-----
DRB1*160201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	-----	-----	AG	C	-----
DRB1*160202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	-----	-----	AG	C	-----
DRB1*1605	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	T	-----	-----	A	-----	AG	C	-----

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
DRB1*010101	CGGGCCGCGG	TGGACACCTA	<u>CTGCAGACAC</u>	<u>AACTACGG</u> GG	TTGGTGAGAG	CTTCACAGTG	CAGCGG	CGAG	TTGAGCCTAA	GGTGACTGTG	TATCCTTCAA
DRB1*010102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*010201	-----	-----	T-----	-----	C--TG-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*010202	-----C-	-----	T-----	-----	C--TG-	****	*****	*****	*****	*****	*****
DRB1*0103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*030101	---G-CG--	---A----	-----	-----	---TG-	-----	-----	---CC-T---	-----	-----	-----
DRB1*030102	---G-CG--	---AT----	-----	-----	---TG-	-----	-----	*****	*****	*****	*****
DRB1*030201	---G-CG--	---A----	-----	-----	-----	-----	-----	---CC-T---	-----	-----	-----
DRB1*030202	---G-CG--	---AT----	-----	-----	-----	-----	-----	---CC-T---	-----	***	*****
DRB1*0304	---G-CG--	---A----	-----	-----	---TG-	-----	-----	*****	*****	*****	*****
DRB1*040101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---CT-T--G-	-----	-----	---G---
DRB1*040102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****	*****
DRB1*0402	-----	-----	-----	-----	---TG-	-----	-----	---CT-T--G-	-----	-----	---G---
DRB1*040301	---A----	-----	-----	-----	---TG-	-----	-----	---CT-T--G-	-----	-----	---G---
DRB1*040302	---A----	-----	-----	-----	---TG-	-----	-----	*****	*****	*****	*****
DRB1*0404	-----	-----	-----	-----	---TG-	-----	-----	---CT-T--G-	-----	-----	---G---
DRB1*040501	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*	*****	*****	*****
DRB1*040502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*040503	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*040504	-----	-----	-----	-----	-----	-----G---	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*040701	---A----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*	*****	*****	*****
DRB1*040702	---A----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	****	*****	*****	*****
DRB1*040703	---A----	-----	-----	-----	-----	-----G---	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*0408	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*070101	---G-CA-	---GT G-	-----	-----	-----	-----	-----	---CC-T--G-	-----	-----	---G-C-
DRB1*070102	---G-CA-	---GT G-	-----	-----	****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DRB1*080101	---CT---	-----	-----	-----	-----	-----G---	-----	---CC-T---	-----	-----	-----
DRB1*080102	---CT---	-----	-----	-----	-----	-----G---	-----	*****	*****	*****	*****
DRB1*080401	---CT---	-----	-----	-----	---TG-	-----	-----	---CC-T---	-----	-----	*****
DRB1*080402	---CT---	-----	-----	-----	---T---	-----	-----	****	*****	*****	*****
DRB1*080403	---CT---	-----	-----	-----	---T---	-----G---	-----	*	*****	*****	*****
DRB1*080404	---CT---	-----	-----	-----	---TG-	-----G---	-----	*****	*****	*****	*****
DRB1*0805	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
DRB1*0806	---CT---	-----	-----	-----	---TG-	-----	-----	*****	*****	*****	*****
DRB1*090102	---A----	---GT G-	-----	-----	-----	-----	A-----	---CC-T--G-	-----	-----	---G-C-
DRB1*100101	---T---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---C-A---	-----	-----	-----
DRB1*100102	---C---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****	*****
DRB1*110101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---CC-T---	-----	-----	-----
DRB1*110102	-----	-----	-----	-----	-----	-----G---	-----	---CC-T---	-----	-----	*****

DRB1*110103	--C-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*110104	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*110105	-----	-----	T-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*1102	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*1103	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*110401	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*110402	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*120101	--C-----	-----	T-----	-----	C--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*120102	-----	-----	-----	-----	C--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*130101	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*130102	-----	-T-----	-----	-----	--TG-	-----	*****	*****	*****
DRB1*130103	-----	-----	T-----	-----	--TG-	-----	*****	*****	*****
DRB1*130201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*130202	--C-----	-----	-----	-----	-----	-----	****	*****	*****
DRB1*130301	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*130302	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****
DRB1*1305	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*1308	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	*****	*****	*****
DRB1*140101	-----	-A-----	T-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*140102	-----	-A-----	-----	-----	--TG-	****	*****	*****	*****
DRB1*1404	-----	-A-----	T-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-T----	-----
DRB1*140701	-----	-A-----	T-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*140702	-----	-A-----	T-----	-----	-----	-----	*****	*****	*****
DRB1*150101	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-A-----	-A-----
DRB1*150102	-----	-----	-----	-----	-A--TG-	-----	****	*****	*****
DRB1*150103	-----	-----	T-----	-----	--TG-	-----	****	*****	*****
DRB1*150104	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	*****	*****	*****
DRB1*150105	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	*****	*****	*****
DRB1*150201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-CC-A-----	-A-----
DRB1*150202	-----	-----	-----	-----	-----	****	*****	*****	*****
DRB1*150203	-----	-----	-----	-----	-----	****	*****	*****	*****
DRB1*1503	-----	-----	-----	-----	--TG-	-----	-----	-CC-A-----	-A-----
DRB1*160101	--C-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-CC-A-----	-A-----
DRB1*160102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	***	*****	*****
DRB1*160201	--C-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-CC-A-----	-A-----
DRB1*160202	-----	-----	-----	-----	-----	****	*****	*****	*****
DRB1*1605	--C-----	-----	-----	-----	-----	---	*****	*****	*****

6.5.3 Häufig vorkommende HLA-B Allele

	[Exon2																
	73	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170						
	CCG	GC	TCCCA	CTCCATGA	GG	TATTTCTACA	CC	TCCGTGTC	CCGGCCCGGC	CGCGGG	GAGC	CCCGCTTCAT	CTCA	GTGGGC	TACGTGGACG	ACACCCAGTT	
B*070201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B*070202	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B*070203	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*070204	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B*0705	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B*0801	---	---	---	---	G	G	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*0804	---	---	---	---	G	G	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*0805	---	---	---	---	G	G	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*1302	---	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	A	C	---	---	---
B*1401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*1402	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*15010101	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*1503	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*1507	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*1508	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*1509	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*1510	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*15170101	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*15170102	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*1518	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*180101	-T-	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*180102	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G
B*2702	-T-	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	A	C	---	---	G
B*2704	-T-	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	A	C	---	---	G
B*270502	-T-	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	A	C	---	---	G
B*270503	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	A	C	---	---	G
B*270504	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	A	C	---	---	G
B*270505	-T-	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	A	C	---	---	G
B*270506	---	---	---	---	C	---	---	T	---	---	---	---	A	C	---	---	G
B*350101	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*350102	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*3502	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*3503	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---
B*3504	---	---	---	---	---	G	A	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---

B*3505	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-----	-G-	-----	-----
B*3508	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-----	-G-	-----	-----
B*3520	***	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-----	-G-	-----	-----
B*3701	-T-	-----	-----	-C-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*3801	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-
B*390101	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-
B*390103	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-
B*390104	***	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-
B*3903	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-
B*3905	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-
B*390601	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-
B*390602	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-G-
B*400101	-G-	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*400102	---	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*400103	***	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*400104	***	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*4002	-T-	-----	-----	-C-	-----	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*40060101	-T-	-----	-----	-C-	-----	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*40060102	-T-	-----	-----	-C-	-----	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*4101	---	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*4102	---	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*4201	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*44020101	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*44020102S	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*440202	***	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*440203	***	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*440301	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*440302	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*4405	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*4501	---	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*47010101	-T-	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*47010102	-T-	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*4801	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*4901	---	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*5001	---	-----	-----	-C-	-G-A-	-----	-----	-A-C-	-----	-----	-G-T-
B*510101	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	TG	-----	-----	-----
B*510102	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	-G-	-----	-----	-----
B*510103	***	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	TG	-----	-----	-----
B*510104	***	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	TG	-----	-----	-----
B*510105	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	TG	-----	-----	-----
B*510201	---	-----	-----	-----	-G-A-	-----	-----	TG	-----	-----	-----

B*510202	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----
B*5109	***	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	TG-----	-----	-----
B*520101	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----
B*520102	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	TG-----	-----	-----
B*520103	***	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----
B*520104	***	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	TG-----	-----	-----
B*5301	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----
B*5501	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	---G---
B*5502	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	---G---
B*5601	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	---G---
B*570101	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----
B*570102	***	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----
B*570301	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----
B*5801	---	-----	-----	-----	---G--A---	-----	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----
B*7301	---	-----	-----	-----C---	-----	-----	-----T---	-----	-----	-A-C-----	-----	-----

	180	190	200	210	220	230	240	250
	CGTG	<u>AGGTTT</u>	<u>GACAGCGACG</u>	<u>CCGCGAGTCC</u>	<u>GAG</u>	AGAGGAG	CCGCGGGCGC
						CGTG	<u>GATAGA</u>	<u>GCAGGAGGGG</u>
								<u>C</u> <u>CGGAGTATT</u>
B*070201	----	----	----	----	----	----	----	----
B*070202	----	----	----	----	----	----	----	----
B*070203	----	----	----	----	----	----	----	----
B*070204	----	----	----	----	----	----	----	----
B*0705	----	----	----	----	----	----	----	----
B*0801	----	----	----	----	----	----	----	----
B*0804	----	----	----	----	----	----	----	----
B*0805	----	----	----	----	----	----	----	----
B*1302	----	----	-A-	-GAT-	-C-	----	----	----
B*1401	----	----	----	----	----	----	----	-A-
B*1402	----	----	----	----	----	----	----	-A-
B*15010101	----	----	----	-GAT-	-C-	----	----	----
B*1503	----	----	----	----	----	----	----	----
B*1507	----	----	----	-GAT-	-C-	----	----	----
B*1508	----	----	----	-GAT-	-C-	----	----	----
B*1509	----	----	----	----	----	----	----	----
B*1510	----	----	----	----	----	----	----	----
B*15170101	----	----	----	-GAT-	-C-	----	----	----
B*15170102	----	----	----	-GAT-	-C-	----	----	----
B*1518	----	----	----	----	----	----	----	----
B*180101	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-
B*180102	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-
B*2702	----	----	----	----	----	----	----	----
B*2704	----	----	----	----	----	----	----	----
B*270502	----	----	----	----	----	----	----	----
B*270503	----	----	----	----	----	----	----	----
B*270504	----	----	----	----	----	----	----	----
B*270505	----	----	----	----	----	----	----	----
B*270506	----	----	----	----	----	----	----	----
B*350101	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-
B*350102	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-
B*3502	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-
B*3503	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-
B*3504	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-
B*3505	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-
B*3508	----	----	----	-GAC-	-C-	----	----	-A-

B*520101	-----	-----	-----	---GAC---	--C-----	-A-----	-----	-----
B*520102	-----	-----	-----	---GAC---	--C-----	-A-----	-----	-----
B*520103	-----	-----	-----	---GAC---	-----	-A-----	-----	-----
B*520104	-----	-----	-----	---GAC---	--C-----	-A-----	-----	-----
B*5301	-----	-----	-----	---GAC---	--C-----	-A-----	-----	-----
B*5501	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*5502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*5601	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*570101	-----	-----	-----	---GAT--C-	--C-----	-A-----	-----	-----
B*570102	-----	-----	-----	---GAT--C-	--C-----	-A-----	-----	-----
B*570301	-----	-----	-----	---GAT--C-	--C-----	-A-----	-----	-----
B*5801	-----	-----	-----	---GAC---	--C-----	-A-----	-----	-----
B*7301	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

B*520102	-----G- G-----	-C---A--A	-CA-----	-T-----	-A-----	T-GC--T-C-	-----...---	-----	---	-----
B*520103	-----G- G-----	-C---A--A	-CA-----	-T-----	-A-----	T-GC--T-C-	-----...---	-----	---	-----
B*520104	-----G- G-----	-C---A--A	-CA-----	-T-----	-A-T-----	T-GC--T-C-	-----...---	-----	---	-----
B*5301	-----	-T---A--A	-CA-----	-T-----	-A-----	T-GC--T-C-	-----...---	-----	---	-----
B*5501	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----...---	-----	---	-----
B*5502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----...---	-----	---	-----
B*5601	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----...---	-----	---	-----
B*570101	----G--G- G---G--A-	ATG-----T	CC--G----	-T-----	-A-----	T-GC--T-C-	-----...---	-----	---	-----
B*570102	----G--G- G---G--A-	ATG-----T	CC--G----	-T-----	-A-----	T-GC--T-C-	-----...---	-----	---	-----
B*570301	----G--G- G---G--A-	ATG-----T	CC--G----	-T-----	-A-----	T-GC--T-C-	-----...---	-----	---	-----
B*5801	----G--G- G---G--A-	ATG-----T	CC--G----	-T-----	-A-----	T-GC--T-C-	-----...---	-----	---	-----
B*7301	-----	-G-----A	-----	-----T-	G-----	-----	-----...---	-----	A--	-----

	[Exon3														
	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440					
	GGTCTCA	CA	CCCTCCAG	AGCAT	GTACG	GCTGCGAC	GT	GGGCCCGAC	GGG	CGCCTCC	TCCGCGGG	CA	TGACCAGTAC	GCCTACGACG	GCAAGGATTA
B*070201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*070202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*070203	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*070204	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*0705	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	-----	-----	-----	-----	-----
B*0801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	-----	-----	-----	-----	-----
B*0804	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	-----	-----	-----	-----	-----
B*0805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	-----	-----	-----	-----	-----
B*1302	-----	TTGG	-CG-	-T-	-----	C-	-----	-----	-----	-A-	-----	TA	-----	-----	-----
B*1401	-----	-----	T-G	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	-A-	-----	T-	-----	-----	-----
B*1402	-----	-----	T-G	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	-A-	-----	T-	-----	-----	-----
B*15010101	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*1503	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*1507	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*1508	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*1509	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	-----	-----	-----	A	-----
B*1510	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*15170101	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*15170102	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*1518	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*180101	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*180102	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*2702	-----	-----	-AT-	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*2704	-----	-----	-AT-	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*270502	-----	-----	-AT-	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*270503	-----	-----	-AT-	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*270504	-----	-----	-AT-	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*270505	-T-	-----	-AT-	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*270506	-----	-----	-AT-	-T-	-----	-----	-----	-----	-T-	CC	-----	G-	-----	-----	-----
B*350101	-----	T-A	-----	-G-	-T-	-----	C-	-----	C-	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*350102	-----	T-A	-----	-G-	-T-	-----	C-	-----	C-	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
B*3502	-----	T-A	-----	-G-	-T-	-----	C-	-----	C-	-----	T-	-----	-A-	-----	-----
B*3503	-----	T-A	-----	-G-	-T-	-----	C-	-----	C-	-----	-----	-T-	-----	-----	-----
B*3504	-----	T-A	-----	-G-	-T-	-----	C-	-----	C-	-----	-----	-A-	-----	-----	-----
B*3505	-----	-----	-----	-----	-----	C-	-----	C-	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----

B*3508	-----	--T-A-----	--G-----T-	-----C-	-----C--	-----	-----	-----C-	-----
B*3520	-----	--T-A-----	--G-----T-	-----C-	-----C--	-----	-----	-----C-	-----
B*3701	-----	---A-----	--G----CT-	-----C-	-----C--	-----	-----T-	-A-----T-	-----
B*3801	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----	-A-----T-	-----
B*390101	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----	-A-----T-	-----
B*390103	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----	-A-----T-	-----
B*390104	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----	-A-----T-	-----
B*3903	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----T-	-----
B*3905	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----	-A-----T-	-----
B*390601	-----	---TTGG---	-CG-----	-----	-----	-----	-----	-A-----T-	-----
B*390602	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----T-	-----
B*400101	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*400102	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*400103	-----	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*400104	-----	-----	--G----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*4002	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*40060101	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*40060102	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*4101	-----	---TTGG---	--G----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*4102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*4201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*44020101	-----	--T-A-----	--G-----	-----	-----	-----	-----T-	-----G-	-----
B*44020102	-----	--T-A-----	--G-----	-----	-----	-----	-----T-	-----G-	-----
B*440202	-----	--T-A-----	--G-----	-----	-----	-----	-----T-	-----G-	-----
B*440203	-----	--T-A-----	--G-----	-----	-----	-----	-----T-	-----G-	-----
B*440301	-----	--T-A-----	--G-----	-----	-----	-----	-----T-	-----G-	-----
B*440302	-----	--T-A-----	--G----T-	-----	-----	-----	-----T-	-----G-	-----
B*4405	-----	--T-A-----	--G-----	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----
B*4501	-----	---TTGG---	--G----T-	-----C-	-----C--	-----	-----T-	-A-----TA	-----
B*47010101	-----	-----	--G----TT-	-----	-----	-----	-----T-	CC----G-	-----
B*47010102	-----	-----	--G----TT-	-----	-----	-----	-----T-	CC----G-	-----
B*4801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----
B*4901	-----	---TTGG---	--G----T-	-----C-	-----C--	-----	-----T-	-A-----TA	-----
B*5001	-----	---TTGG---	--G----T-	-----C-	-----C--	-----	-----T-	-A-----TA	-----
B*510101	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----A-----
B*510102	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----A-----
B*510103	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----A-----
B*510104	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----A-----
B*510105	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----A-----
B*510201	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----A-----
B*510202	-----	---TTGG---	-CG----T-	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----A-----

B*5109	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----	---A-----
B*520101	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----	---A-----
B*520102	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----	---A-----
B*520103	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----	---A-----
B*520104	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----	---A-----
B*530101	-----	--T-A-----	--G-----T-	-----C-	-----C--	-----	-----	-----	-----C-	-----	-----
B*5501	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----C-	-----	-----	-----	-----	-A-----TA	-----	-----
B*5502	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----C-	-----	-----	-----	-----	-A-----TA	-----	-----
B*5601	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----C-	-----	-----	-----	-----	-A-----TA	-----	-----
B*570101	-----	--T-A-----	GTG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-	-----	-----
B*570102	-----	--T-A-----	GTG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----CT	-----	-----
B*570301	-----	--T-A-----	GTG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----	-----
B*570302	-----	--T-A-----	GTG-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-A-----	-----	-----
B*5801	-----	--T-A-----	--G-----T-	-----C-	-----C--	-----	-----	-----	-----C-	-----	-----
B*7301	-----	---TTGG---	-CG-----T-	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----T-	-A-----T-	-----

	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	
	CATCG	CCCTG AACGAGGACC	TGCGCTCCTG	GACCGCCGCG	GACACG	GCGG CTCAGATC	AC CCAGCGCAAG	TGG	GAG...GCGG CCCGTG	AGGC	GGAGCAGCGG
B*070201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*070202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*070203	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*070204	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*0705	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*0801	-----	-----	-----	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----GAC	-----
B*0804	-----	-----	-----	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----GAC	-----
B*0805	-----	-----	-----	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----GAC	-----
B*1302	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----T---	-----T---	-----T-	-----
B*1401	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*1402	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*15010101	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*1503	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*1507	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*1508	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*1509	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*1510	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*15170101	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*15170102	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*1518	-----	-----	-----A-	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*180101	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*180102	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*2702	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*2704	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
B*270502	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*270503	-----	-----	-----A-	-----	-----A-	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*270504	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*270505	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*270506	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*350101	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*350102	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*3502	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*3503	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*3504	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----	-----	-----T---	-----T-	-----
B*3505	-----	-----	-----A-	-----G--	-----C---	-----A-	-----	-----T---	-----T-	-----

	550	560	570	580	590	600	610	619 0	630
	AGA	GCCTACC TGGAGGGC	GA	GTGCGTGGAG TGGCTCCGCA	GATA	CCTGGA GAACGGGA	AAG	GACAAGCTGG AGCGCGCTG	A CCCCCCA...AAG
B*070201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*070202	-----	-----	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*070203	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	* *****
B*070204	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	* *****
B*0705	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*0801	-----	-----AC	-----	-----	-----	-----C	-----G	-----	-----
B*0804	-----	-----AC	-----	-----	-----	-----C	-----G	-----	* *****
B*0805	-----	-----AC	-----	-----	-----	-----C	-----G	-----	* *****
B*1302	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*1401	-----	-----AC	-----	-----C	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*1402	-----	-----AC	-----	-----C	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*15010101	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*1503	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*1507	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*1508	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*1509	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*1510	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*15170101	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*15170102	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*1518	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*180101	-----	-----AC	-----	-----C	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*180102	-----	-----AC	-----	-----C	-----	-----G-C	-----C	-----G	* *****
B*2702	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*2704	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*270503	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	* *****
B*270504	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	* *****
B*270505	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*270506	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	* *****
B*350101	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*350102	-----T-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	* *****
B*3502	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*3503	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*3504	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----
B*3505	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----G-C	-----C	-----G	-----

B*3508	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*3520	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	*	*****
B*3701	-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*3801	---A-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*390101	---A-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*390103	---A-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*390104	---A-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	*	*****
B*3903	---A-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*3905	---A-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*390601	---A-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*390602	---A-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*400101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*400102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*400103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*400104	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*	*****
B*4002	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*40060101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*40060102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*4101	-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---C-----	-----G-	-----
B*4102	-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---C-----	-----G-	-----
B*4201	-----	-----AC	-----	-----	-----	-----	---C-----	-----G-	-----
B*44020101	-----	-----CT	-C-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*44020102	-----	-----CT	-C-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*440202	-----	-----CT	-C-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*440203	-----	-----CT	-C-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	*	*****
B*440301	-----	-----CT	-C-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*440302	-----	-----CT	-C-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*4405	-----	-----CT	-C-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*4501	-----	-----CT	-C-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*47010101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*47010102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*4801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*4901	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*5001	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*510101	-----	-----CT	-----	---C-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*510102	-----	-----CT	-----	---C-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*510103	-----	-----CT	-----	---C-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	*	*****
B*510104	-----	-----CT	-----	---C-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	*	*****
B*510105	-----	-----CT	-----	---C-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*510201	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----
B*510202	-----	-----CT	-----	-----	-----	-----	---G-C---C	-----G-	-----

```

B*5109      -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- * *****
B*520101   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*520102   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*520103   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- * *****
B*520104   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- * *****
B*530101   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*5501     -----AC ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*5502     -----AC ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*5601     -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*570101   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*570102   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- * *****
B*570301   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*570302   -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*5801     -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
B*7301     -----CT ----- --C----- --G-C---C -----G- - .....
    
```

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Marion Nagy, bei der ich besondere Unterstützung zum Thema meiner Arbeit bekam und die mich in die HLA-Thematik einführte. Ihre freundliche Art zu motivieren und der konstruktive Austausch waren mir eine große Hilfe.

Peter Nürnberg danke ich für seine Unterstützung meiner Arbeit in den ersten zwei Jahren in seiner leider nun so nicht mehr bestehenden Arbeitsgruppe am MDC in Berlin-Buch. Dort hatte ich die Möglichkeit alles Wissenswerte über das Pyrosequencing zu erlernen.

Mein besonderer Dank gilt beiden für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in ihren jeweiligen Arbeitsgruppen.

Allen Mitarbeitern beider Arbeitsgruppen, am MDC und an der Charité danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die freundliche Atmosphäre, für den Austausch, Anregungen und gegenseitige Unterstützung.

Für die Arbeitsgruppe am MDC: Mohammad Reza Toliat, Christian Becker, Jana Thiede, Björn Fischer, Jenny Pech, Kirsten Lenzen, Thomas Sander, Cornelia Dokup, Dominik Seelow und allen „Mitbewohnern“ des Doktorandenraumes „007“ Anja Brinckmann, Christian Astrosini, Annett Kramer, Katja-Martina Eckl, Dajana Neichel, Petra Hempel und Michael Radke.

Für die Arbeitsgruppe an der Charité: Carmen Krüger, Petra Otremba, Marion Meschkat, Petra Anders, Corinna Hahne, Bärbel Henske, Sacha Willuweit, Lutz Roewer.

Herrn Prof. Ulf Stahl danke ich für die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der TU Berlin sowie seiner Hilfe bei der Anmeldung, Hinweise und Ratschläge zum Verfassen meiner Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und allein unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen erarbeitet und verfaßt habe.
- dass ich weder früher noch gleichzeitig ein Promotionsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe.
- dass mir die Promotionsordnung der TU Berlin zur Doktorin oder zum Doktor der Ingenieurwissenschaften in der Fassung vom 15. Dezember 1996, mit den Ergänzungen vom 26. Januar 2000 und 29. November 2000 bekannt ist.

Berlin, den
