

Das HLA-System

Genetik, Funktion und Typisierungsverfahren



Priv. Doz. Dr. med. J. Mytilineos
Abteilung Transplantationsimmunologie
Institut für klinische Transfusionsmedizin
und Immunogenetik Ulm

Immungenetische Verwandtschaft zw. Spender und Empfänger

Neuer Name	Bezeichnung	Verwandschaft	Ausgang
Autolog	Autotransplantat	Spender = Empfänger	keine Abstoßung
Syngen	Isotransplantat	Eineiige Zwillinge	keine Abstoßung
Allogen	Allotransplantat	gleiche Spezies - Verwandt (außer ident. Zwilling) - Nicht verwandt (Verstorbenen-Tx)	- Transplantat geht zunächst an wird jedoch innerhalb von 10-15 Tagen abgestoßen. - Bei erneuter Exposition (Retransplantation - second set) erfolgt die Abstoßung innerhalb von Stunden o. Minuten
		andere Spezies	Transplantat wird innerhalb von Minuten bis Stunden abgestoßen

PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Einteilung nach dem Ort der Transplantation

Orthotop	Organ wird in seiner physiologischen Position angebracht
Heterotop	Organ wird an einer nicht-physiologischen Lokalisation eingepflanzt

PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Einteilung nach der Methode der Transplantation

Gestieltes Transplantat	Zeitweiliger Gefäßstiel – anschließende Versorgung durch anwachsende Gefäße Immer nur autolog	Hauttransplantation
Zelluläres Transplantat	Transplantat wird in Form einer Zellsuspension injiziert	Knochenmark / PBSZ - Transplantation
Freies Transplantat	Anbringen eines Zellverbundes Versorgung per Diffusionem durch das umliegende Gewebe	Nebenschilddrüsen-transplantation
Organ-transplantat	Versorgung durch eine Spender-Empfänger Gefäßanastomose	Nierentransplantation

PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Probleme bei der Organtransplantation

- Chirurgisch-Anatomischer Natur
 - Atypische Gefäße
 - Schädigung des Organs während der Entnahme
 - Konservierungsprobleme
 - Angiologische Komplikationen (Venen- bzw. Arterielverschlüsse, etc.)
- Immunologischer Natur
 - Abstoßungsreaktion
 - Graft versus Host Krankheit

PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Abstoßungsreaktionen

- Zellulär (T-Zellen)
 - Früh akut (innerhalb von 10 Tagen nach Tx)
 - Spät akut (nach 10 Tagen post Tx)
 - Chronisch
- Humoral (Antikörper)
 - Hyperakut

PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Maßnahmen zur Beherrschung von Abstoßungsreaktionen

- Medikamentös (Immunsuppressiva)
 - Cyclosporin A
 - FK506
 - Rapamycin
 - Mucophenolat Mofetil (MMF)
 - Kortisonpräparate
 - Azathioprin
 - OKT/ATG
 - Monoklonale Anti IL2-Ak's

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Maßnahmen zur Beherrschung von Abstoßungsreaktionen

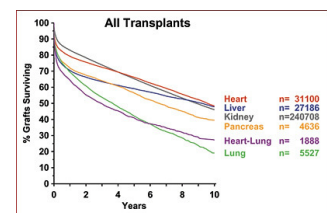
- Laboruntersuchungen
 - HLA-Typisierung (bei Spender u. Empfänger)
 - Ak-Screening
 - Crossmatch
 - Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Welche Organe werden transplantiert?

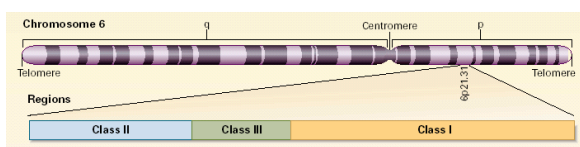
- Niere
- Leber
- Herz / Herz-Lunge
- Lunge
- Pankreas
- Knochenmark / PBSZ
- Hornhaut
- Herzklappen
- Gehörknöchelchen
- Knochen
- Darm
- etc....



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

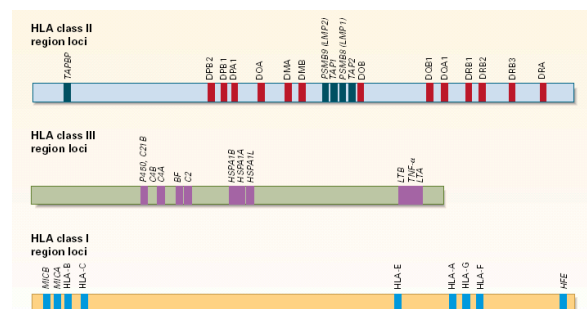
Chromosomale Kodierung der HLA-Merkmale



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Human MHC



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Aktuelle Liste der HLA-Antigene

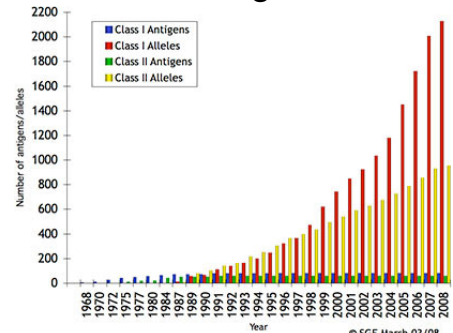
(Die Ziffer in Klammern geben das dazugehörige Breite Antigen an)

A	DR	B	DR	DR	DR	DR
A1	DR1	B1	DR1	DR1	DR1	DR1
A2	DR2	B2	DR2	DR2	DR2	DR2
A3	DR3	B3	DR3	DR3	DR3	DR3
A4	DR4	B4	DR4	DR4	DR4	DR4
A5	DR5	B5	DR5	DR5	DR5	DR5
A6	DR6	B6	DR6	DR6	DR6	DR6
A7	DR7	B7	DR7	DR7	DR7	DR7
A8	DR8	B8	DR8	DR8	DR8	DR8
A9	DR9	B9	DR9	DR9	DR9	DR9
A10	DR10	B10	DR10	DR10	DR10	DR10
A11	DR11	B11	DR11	DR11	DR11	DR11
A12	DR12	B12	DR12	DR12	DR12	DR12
A13	DR13	B13	DR13	DR13	DR13	DR13
A14	DR14	B14	DR14	DR14	DR14	DR14
A15	DR15	B15	DR15	DR15	DR15	DR15
A16	DR16	B16	DR16	DR16	DR16	DR16
A17	DR17	B17	DR17	DR17	DR17	DR17
A18	DR18	B18	DR18	DR18	DR18	DR18
A19	DR19	B19	DR19	DR19	DR19	DR19
A20	DR20	B20	DR20	DR20	DR20	DR20
A21	DR21	B21	DR21	DR21	DR21	DR21
A22	DR22	B22	DR22	DR22	DR22	DR22
A23	DR23	B23	DR23	DR23	DR23	DR23
A24	DR24	B24	DR24	DR24	DR24	DR24
A25	DR25	B25	DR25	DR25	DR25	DR25
A26	DR26	B26	DR26	DR26	DR26	DR26
A27	DR27	B27	DR27	DR27	DR27	DR27
A28	DR28	B28	DR28	DR28	DR28	DR28
A29	DR29	B29	DR29	DR29	DR29	DR29
A30	DR30	B30	DR30	DR30	DR30	DR30
A31	DR31	B31	DR31	DR31	DR31	DR31
A32	DR32	B32	DR32	DR32	DR32	DR32
A33	DR33	B33	DR33	DR33	DR33	DR33
A34	DR34	B34	DR34	DR34	DR34	DR34
A35	DR35	B35	DR35	DR35	DR35	DR35
A36	DR36	B36	DR36	DR36	DR36	DR36
A37	DR37	B37	DR37	DR37	DR37	DR37
A38	DR38	B38	DR38	DR38	DR38	DR38
A39	DR39	B39	DR39	DR39	DR39	DR39
A40	DR40	B40	DR40	DR40	DR40	DR40
A41	DR41	B41	DR41	DR41	DR41	DR41
A42	DR42	B42	DR42	DR42	DR42	DR42
A43	DR43	B43	DR43	DR43	DR43	DR43
A44	DR44	B44	DR44	DR44	DR44	DR44
A45	DR45	B45	DR45	DR45	DR45	DR45
A46	DR46	B46	DR46	DR46	DR46	DR46
A47	DR47	B47	DR47	DR47	DR47	DR47
A48	DR48	B48	DR48	DR48	DR48	DR48
A49	DR49	B49	DR49	DR49	DR49	DR49
A50	DR50	B50	DR50	DR50	DR50	DR50
A51	DR51	B51	DR51	DR51	DR51	DR51
A52	DR52	B52	DR52	DR52	DR52	DR52
A53	DR53	B53	DR53	DR53	DR53	DR53
A54	DR54	B54	DR54	DR54	DR54	DR54
A55	DR55	B55	DR55	DR55	DR55	DR55
A56	DR56	B56	DR56	DR56	DR56	DR56
A57	DR57	B57	DR57	DR57	DR57	DR57
A58	DR58	B58	DR58	DR58	DR58	DR58
A59	DR59	B59	DR59	DR59	DR59	DR59
A60	DR60	B60	DR60	DR60	DR60	DR60
A61	DR61	B61	DR61	DR61	DR61	DR61
A62	DR62	B62	DR62	DR62	DR62	DR62
A63	DR63	B63	DR63	DR63	DR63	DR63
A64	DR64	B64	DR64	DR64	DR64	DR64
A65	DR65	B65	DR65	DR65	DR65	DR65
A66	DR66	B66	DR66	DR66	DR66	DR66
A67	DR67	B67	DR67	DR67	DR67	DR67
A68	DR68	B68	DR68	DR68	DR68	DR68
A69	DR69	B69	DR69	DR69	DR69	DR69
A70	DR70	B70	DR70	DR70	DR70	DR70
A71	DR71	B71	DR71	DR71	DR71	DR71
A72	DR72	B72	DR72	DR72	DR72	DR72
A73	DR73	B73	DR73	DR73	DR73	DR73
A74	DR74	B74	DR74	DR74	DR74	DR74
A75	DR75	B75	DR75	DR75	DR75	DR75
A76	DR76	B76	DR76	DR76	DR76	DR76
A77	DR77	B77	DR77	DR77	DR77	DR77
A78	DR78	B78	DR78	DR78	DR78	DR78
A79	DR79	B79	DR79	DR79	DR79	DR79
A80	DR80	B80	DR80	DR80	DR80	DR80
A81	DR81	B81	DR81	DR81	DR81	DR81
A82	DR82	B82	DR82	DR82	DR82	DR82
A83	DR83	B83	DR83	DR83	DR83	DR83
A84	DR84	B84	DR84	DR84	DR84	DR84
A85	DR85	B85	DR85	DR85	DR85	DR85
A86	DR86	B86	DR86	DR86	DR86	DR86
A87	DR87	B87	DR87	DR87	DR87	DR87
A88	DR88	B88	DR88	DR88	DR88	DR88
A89	DR89	B89	DR89	DR89	DR89	DR89
A90	DR90	B90	DR90	DR90	DR90	DR90
A91	DR91	B91	DR91	DR91	DR91	DR91
A92	DR92	B92	DR92	DR92	DR92	DR92
A93	DR93	B93	DR93	DR93	DR93	DR93
A94	DR94	B94	DR94	DR94	DR94	DR94
A95	DR95	B95	DR95	DR95	DR95	DR95
A96	DR96	B96	DR96	DR96	DR96	DR96
A97	DR97	B97	DR97	DR97	DR97	DR97
A98	DR98	B98	DR98	DR98	DR98	DR98
A99	DR99	B99	DR99	DR99	DR99	DR99
A100	DR100	B100	DR100	DR100	DR100	DR100

PD Dr. med. J. Myllineos

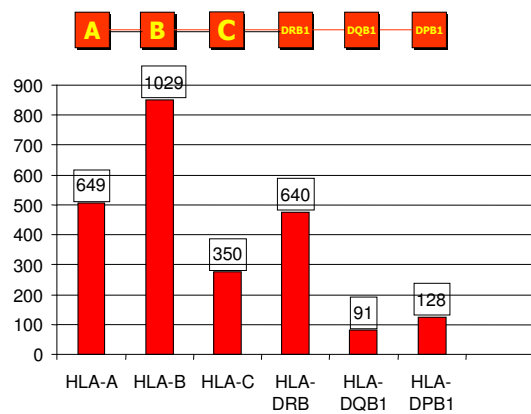
Vorlesung TPL-Immunologie

Jährlicher Anstieg der Anzahl der HLA-Antigene/Allele



PD Dr. med. J. Myllineos

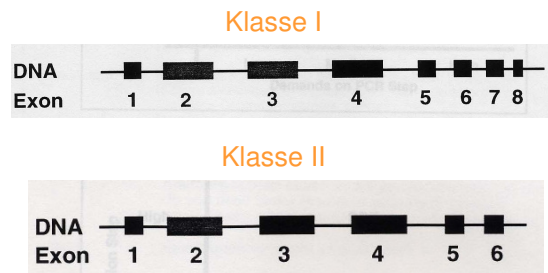
Vorlesung TPL-Immunologie



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

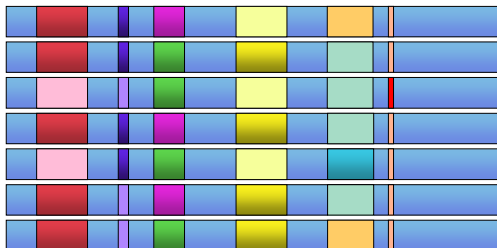
Exon-Intron Aufbau der HLA-Gene



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Der Polymorphismus der HLA-Genorte ist "patchwork"-mäßig aufgebaut



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

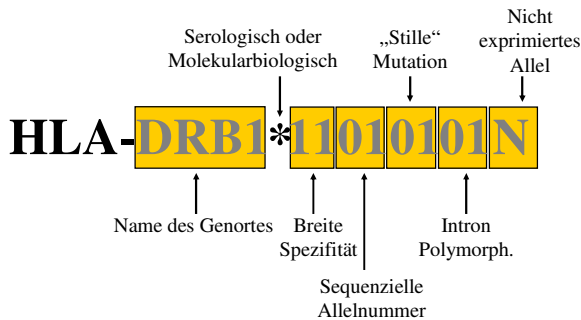
Die Mehrheit der polymorphen Positionen befindet sich innerhalb der **exone 2 und 3** für **HLA class I** Gene und innerhalb des **exons 2** für **HLA class II** Gene.

Polymorphe Positionen, die ausserhalb dieser Exone liegen (meistens Exon 1 & 4 für Klasse I, und Exon 3 für Klasse II) tragen ebenfalls zum hohen Grad allelischer Variabilität des HLA Systems.

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Nomenklatur von HLA-Allelen



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

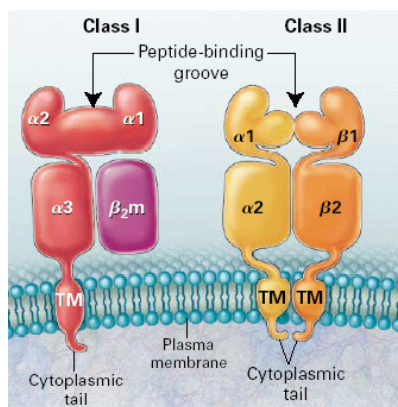
Vererbung der HLA-Merkmale

Mutter				Vater			
HLA-A:	1	29		HLA-A:	2	3	
HLA-B:	8	35		HLA-B:	8	60	
HLA-Cw:	7	4		HLA-Cw:	3	7	
HLA-DRB1:	0701	0301		HLA-DRB1:	1301	0801	
HLA-DQA1:	0201	0501		HLA-DQA1:	0103	0401	
HLA-DQB1:	0303	0201		HLA-DQB1:	0403	0402	
HLA-DPB1:	0901	0401		HLA-DPB1:	0401	1501	
	1	2			3	4	

Kind 1				Kind 2				Kind 3				Kind 4			
HLA-A:	29	3		HLA-A:	1	3		HLA-A:	29	3		HLA-A:	1	2	
HLA-B:	35	60		HLA-B:	8	60		HLA-B:	35	60		HLA-B:	8	8	
HLA-Cw:	4	7		HLA-Cw:	7	7		HLA-Cw:	4	7		HLA-Cw:	7	3	
HLA-DRB1:	0301	0801		HLA-DRB1:	0701	0801		HLA-DRB1:	0301	0801		HLA-DRB1:	0701	1301	
HLA-DQA1:	0501	0401		HLA-DQA1:	0201	0401		HLA-DQA1:	0501	0401		HLA-DQA1:	0201	0103	
HLA-DQB1:	0201	0402		HLA-DQB1:	0303	0402		HLA-DQB1:	0201	0402		HLA-DQB1:	0303	0403	
HLA-DPB1:	0401	1501		HLA-DPB1:	0901	1501		HLA-DPB1:	0401	1501		HLA-DPB1:	0901	0401	
	2	4			1	4			2	4			1	3	

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Expression der HLA-Antigene

HLA-Klasse I – Antigene	- Alle kernhaltige Zellen - Thrombozyten - Spermatozoen
HLA-Klasse II – Antigene	- Makrophagen - Monozyten - Aktiv. T-Lymphozyten - B-Lymphozyten

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Biologische Funktionen des MHC

- Unterscheidung von „selbst“ u. „fremd“
- Schlüssel-Moleküle für die Initiierung der spezifischen immunologischen Antwort
- Ligand für Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)
- Reifung der T-Lymphozyten

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Aufteilung der HLA-Typisierungsmethoden

- Nach Auflösungsgrad
 - Hochauflösend (High Resolution = 4 stellig: A*0201)
 - Niedrigauflösend (Low Resolution = 2 stellig: A*02)
- Nach dem Verfahren
 - Serologisch
 - Molekularbiologisch
 - Zellulär
 - Biochemisch

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Auflösungsgrad einer Typisierung (2)

Auflösung	Ziffer	Klin. Anwendung	Methode
Niedrig	2	Nieren Tx Thromb. Transf.	Serologie PCR-SSO PCR-SSP SBT
Hoch	4	Stammzell Tx Forensik Krankheitsa	PCR-SSO, PCR-SSP, SBT

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Klassische Verfahren

- **Serologische Typisierung (CDC)**
 - NIH-Test, LCT, Mikrolymphozytotoxizitätstest
- Zelluläre Verfahren
 - MLC
 - PLT
- Biochemische Typisierung
 - Eindimensionale, isoelektrische Fokussierung
 - Zweidimensionale, isoelektrische Fokussierung

PD Dr. med. J. Myllineos

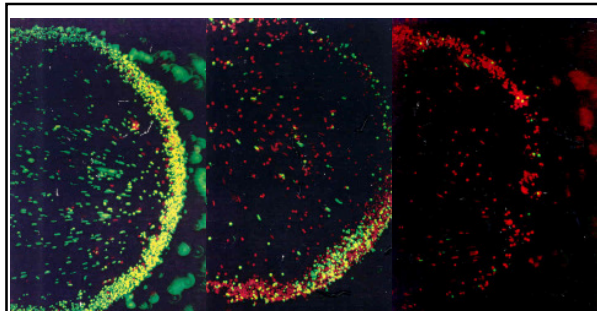
Vorlesung TPL-Immunologie

Microlymphocytotoxicity Test

	+ve Reaction	-ve Reaction
HLA antiserum (Ab) + lymphocyte suspension (Ag) (Ag - Ab reaction)		
Complement dependent cell lysis		
Staining with AO/EB/DA (as seen through microscope)		

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

SCORING

Percent dead cells	Score	Interpretation
0 - 10%	1	negative
11 - 20%	2	possibly negative
21 - 50%	4	weakly positive
51 - 80%	6	positive
81 - 100%	8	strongly positive
	0	not interpretable

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Molekularbiologische Verfahren

- PCR-SSP
- PCR-SSO
 - Klassisch
 - RDB
 - Beads
 - ELPHA
 - Chips-Arrays
- SBT
- RFLP
- PCR-RFLP
- RSCA
- SSCP
- sonstigen

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

PCR-SSP

- Prinzip: **PCR** mit **Sequenzspezifischen Primers**
- Auflösung: Niedrig, mittelhoch und hoch
- Genorte: HLA-A, -B, -Cw, DRB1,3,4,5, DQB1, DQA1, DPB1
- Vorteil: Schnell, leicht zu auswerten
- Nachteil: Verbraucht viel DNA!!

PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

PCR-SSP

DNA-Isolation



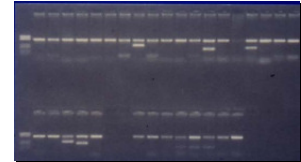
PCR Mit spezifischen Oligonukleotidprimer



Elektrophorese



Ablesung und Interpretation



PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

PCR-SSO (Luminex)

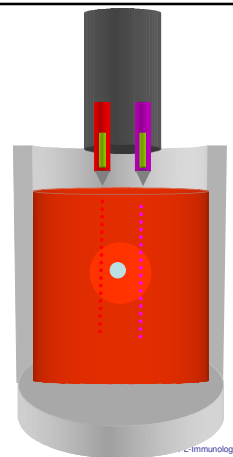
- Prinzip: PCR-SSO und anshl. Hybridisierung mit **Sequenz Spezifischen Oligonukleotiden**, die auf Beads gekoppelt sind. Analyse in einem speziellem FACS-Gerät (Luminex)
- Auflösung: Niedrig bis hoch
- Genorte: HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DQB1
- Firmen: Tepnell (Inno-Train) und One Lamda (BMT)
- Vorteil: bis 100 Hybridisierungen in einem Tube! Enorm Arbeitserleichternd! Schneller Durchsatz.
- Nachteil: Preis

PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

- Luminex beads werden mit zwei verschiedenen Farben (rot und infrarot) gefärbt

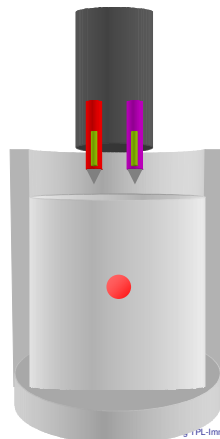
- Für jede Bead-Population gibt es immer ein bestimmtes Mengenverhältnis der beiden Farben zueinander



PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

- Nach der Färbung werden die Beads gewaschen
- Es gibt 10 mögliche Farbtöne von Rot und 10 weiteren für Infrarot
- Das Vermischen der beiden Farben resultiert zu 100 verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten

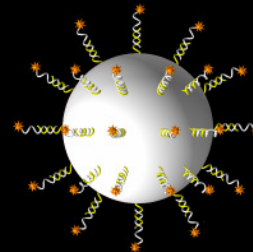


PD Dr. med. J. Mytilineos

Vorlesung TPL-Immunologie

Beispiel einer allelspezifischen Hybridisierungsreaktion:

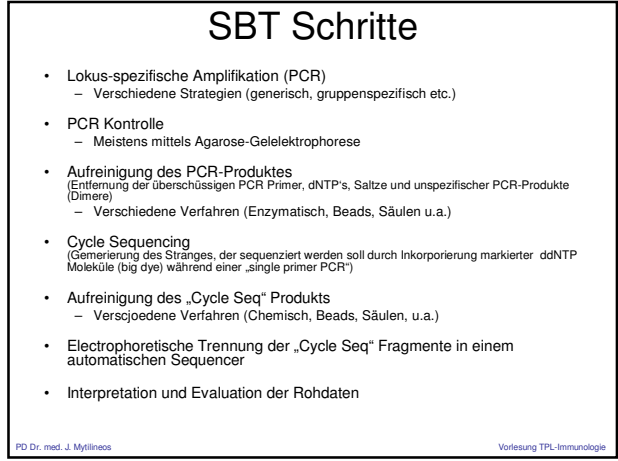
Eine bestimmte Bead-Population ist mit einem spezifischen Oligonukleotid gekoppelt. Um eine biologische Reaktion zu erzeugen (Hybridisierung) wird ein orange farbenes fluoreszenzmarkiertes PCR Produkt eingesetzt.



Probe wird vom Instrument aufgesogen und passiert zwei Laserstrahlquellen.

Signaldetektion

The diagram illustrates the signal detection process in a flow cytometer. A large blue arrow at the bottom indicates the direction of 'Flow' from left to right. A stream of beads, represented by pink, orange, and green circles, moves through the flow. Each bead has a small horizontal bar with three segments (red, yellow, green) attached to it. The beads pass through two laser beams, represented by thin black lines that diverge. The first laser beam is labeled 'Roter Laser bestimmt die innere Farbe des Beads' (Red laser determines the inner color of the bead). The second laser beam is labeled 'Grüner Laser quantifiziert die Menge des an das Bead gebundenen Amplifikats' (Green laser quantifies the amount of amplifier bound to the bead). The beads are shown in two positions relative to the laser beams: one before the first beam and one after the second beam. The beads are shown in two positions relative to the laser beams: one before the first beam and one after the second beam.



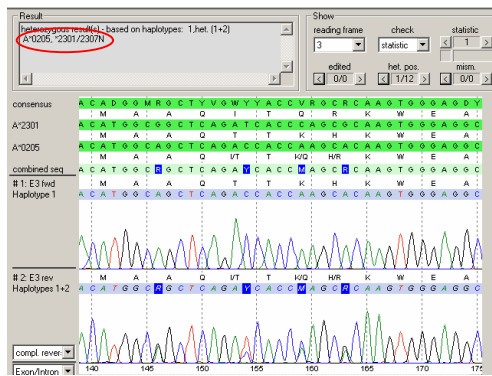
PD Dr. med. J. Mytilineos Vorlesung TPL-Immunologie

PD Dr. med. J. Mytilineos Vorlesung TPL-Immunologie

PD Dr. med. J. Mytilineos

PD Dr. med. J. Mytilineos

SBT – Interpretation der Rohdaten



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

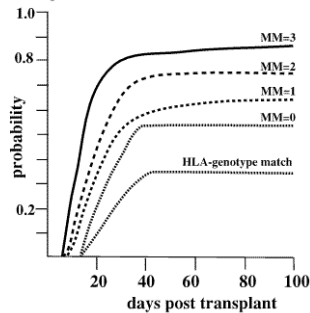
Klinische Bedeutung des HLA-Systems

- Transplantationsmedizin
 - Knochenmark- und Stammzelltransplantation
 - Nierentransplantation
- Assoziation zwischen HLA-Antigenen und diversen Erkrankungen
- Abstammungsbegutachtung

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

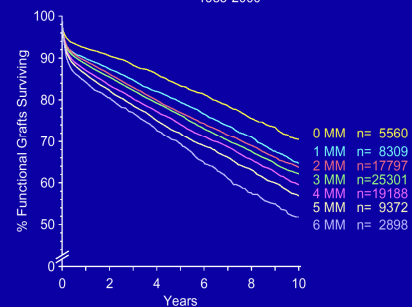
Incidence of severe GvH HLA-identical sibs vs partial mismatched relative donor



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

FIRST CADAVER KIDNEY TRANSPLANTS HLA-A+B+DR MISMATCHES 1985-2000



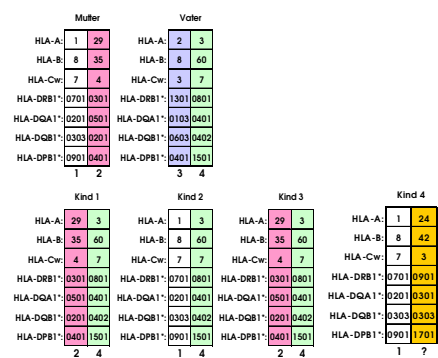
HLA-Krankheitsassoziationen

1.Disease	1.HLA allele	1.Relative risk
1.Rheumatoid arthritis	1.DR4	1.6
1.IDDM	1.DR3	1.5
	1.DR4	1.6-7
	1.DR3/DR4	1.20
	1.DR3, DQw8/DQw2	1.30
	1.DR2	1.0.25
1.Pemphigus	1.DR4	1.24
1.Chronic Active Hepatitis	1.DR3	1.14
1.Coeliac Disease	1.DR3	1.12

PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie

HLA und Abstammungsbegutachtung



PD Dr. med. J. Myllineos

Vorlesung TPL-Immunologie