

104 DR-Subtypisierung

C. Neviny-Sticke¹, J. Kürschner¹, A. Volgger², J. Bönisch², E.D. Albert²

¹Medizinisch Immunologische Laboratorien München; ²Labor für Immungenetik, Kinderpoliklinik der Universität München

Unbedingte Voraussetzung für eine Knochenmarkstransplantation ist die exakte Typisierung der HLA-Merkmale von Spender und Empfänger. Wir haben eine Strategie für die Typisierung von HLA-DRB1-Merkmalen entwickelt, die auf sequenzspezifischer Amplifikation (PCR-SSP) und Oligonukleotid-Hybridisierung beruht. Aus 5 ml EDTA-Blut wird genomische DNA extrahiert, die anschließend in 14 verschiedenen PCR-Ansätzen unter gleichen Reaktionsbedingungen amplifiziert wird. Dabei werden die Primer spezifisch gewählt, so daß nur bestimmte Allele amplifiziert werden. In einer darauffolgenden Oligonukleotid-Hybridisierung kann anschließend die genaue Typisierung erfolgen.

Die sequenzspezifische Amplifikation erlaubt bereits eine „low resolution“ Typisierung, die einer serologischen Typisierung entspricht. Die Primer werden so gewählt, daß die spezifischen Amplifikate sämtliche hypervariable Regionen des 2. Exons des DRB1-Gens enthalten. In einem 2. Schritt werden die erhaltenen Amplifikate auf positiv geladene Nylonmembranen aufgetragen und mit Oligonukleotiden hybridisiert (high resolution).

Diese Vorgehensweise erlaubt eine schnelle Grobtypisierung und anschließende Bestätigung des Amplifikates. Heterozygote Kombinationen, die üblicherweise nicht aufgelöst werden, können typisiert werden und neue Allele fallen auf.

105 Anreicherung und Charakterisierung fetaler erythrozytärer Vorstufen aus mütterlichem Blut als Grundlage nichtinvasiver pränataler Diagnostik

C. Neviny-Sticke¹, J. Kürschner¹, P. Dörffler², J. Koch², W. Bieger¹

¹Medizinisch Immunologische Laboratorien, München; ²Paracelsus Klinik, München

Fragestellung

Die Anreicherung fetaler Zellen aus maternalem Blut ist die Voraussetzung für eine nichtinvasive pränatale Diagnostik. Wir haben mit unterschiedlichen Separationsverfahren erythrozytäre Vorstufen aus mütterlichem Blut angereichert und mit Hilfe der in situ Hybridisierung und PCR in dieser Fraktion enthaltenen Zellen charakterisiert und deren genetisches Geschlecht bestimmt.

Methode

Aus 20 ml ACD-Blut schwangerer Frauen wurden kernhaltige erythrozytäre Zellen (nucleated red blood cells, NRBC) über Dichte-Gradienten-Zentrifugation und magnetische Zellseparation angereichert. Der Anteil der fetalen NRBC's wurde lichtmikroskopisch bestimmt. Die anschließende in situ Hybridisierung mit Y-spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden bei einer Anreicherung von mindestens 6% NRBC's ermöglichte eine eindeutige Charakterisierung männlicher fetaler Zellen.

Ergebnisse

Eine Anreicherung erythrozytärer Vorstufen war bis zu einem prozentualen Anteil von 24% möglich. Es konnten mit Hilfe von sequenzspezifischer PCR und Oligonukleotid-Hybridisierung der HLA-DRB1-Genorte eindeutig paternal vererbte Merkmale detektiert werden.

Schlußfolgerung

Aus mütterlichem Blut können fetale NRBC angereichert und eindeutig identifiziert werden. Die in situ Hybridisierung erlaubt unter nichtinvasiven Bedingungen den Ausschluß bzw. Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen (z.B. Trisomie 21, 18, 13) in einem frühen Stadium der Schwangerschaft.

106 Therapieabhängige NK-Zell-Veränderungen

R. Nowack, J. Muehe, J. Oppermann, Dagmar Möbius
Institut für Klin. Chemie und Lab.-diagn. und Kinderklinik des Carl-Thiem-Klinikums, Cottbus

Bei der Therapie von Kindern mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, meist Rheumatoid-Arthritis, wurden zwei unterschiedliche Therapieschemata angewandt.

Eine Gruppe wurde mit Methylprednisolon (Bolus, hochdosiert) behandelt, während in einer anderen Gruppe Immunglobuline zur Anwendung kamen.

Beide Medikationen wurden i.v. verabreicht. Zusätzlich zu den „üblichen“ krankheitsassoziierten Untersuchungen wurde die Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes und in einzelnen Fällen auch in Synovialflüssigkeit ermittelt.

Neben einem ausgesprochen individuellen Verlauf für einzelne Patienten, der während der Therapie reproduzierbar war, wurde in einigen Fällen auch eine Zunahme der CD 57⁺ NK-Lymphozyten-Population beobachtet.

Besonders interessant war das Auftreten einer CD 57⁺/CD 8⁺ doppelt positiven Population bei einigen Patienten unter Methylprednisolon-Therapie.

Interleukine wurden begleitend bestimmt. Gleichzeitig war bei diesen Patienten eine Zunahme der B-Lymphozyten (CD⁺ 19 und CD 20⁺) festzustellen.

Eine T-Lymphozyten-Aktivierung, beurteilt durch das Auffinden CD 3⁺/CD 25⁺ und CD 3⁺/HLA DR doppelt positiver Zellen, war nicht feststellbar. Eine befriedigende Erklärung dieses Phänomens steht für uns noch aus.

Möglicherweise sind dafür Zell/Zell-Interaktionen, entweder auf Interleukin-Ebene oder auf der Ebene von Adhäsions(protein)molekülen, verantwortlich.

107 Aussagekraft von Pyruvatkinase Typ Tumor M 2 bei Patienten mit einem Seminom

G.M. Oremek, U.B. Seiffert, D. Jonas, U. Scheefers-Borchel, H. Scheefers

Universitätskliniken, Zentrallabor – ZIM, 60590 Frankfurt/Main

Die quantitative Bestimmung der Pyruvatkinase Typ Tumor M2 ist bei Patienten mit Malignomen erhöht. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Aussage bei Patienten mit einem Seminom zu überprüfen. Untersucht wurden 70 Patienten mit einem gesicherten Seminom. Die Bestimmung der Pyruvatkinase erfolgte mit einem Elisa der Fa. Sche Bo. Tech. Dieser Test erfaßt mit zwei monoklonalen Antikörpern die TU M2-PK. Nicht erfaßt werden die anderen Isoenzyme der Pyruvatkinase. Zusätzlich wurden die Tumormarker NSE, β -HCG und AFP bestimmt. Für das gesunde Kollektiv wurde bei einer Spezifität von 95% ein cut-off von 17 U/ml ermittelt. Als Ergebnis kann mitgeteilt werden, daß der Pyruvatkinase Typ Tumor M2 in 71% der Fälle deutlich erhöht war. Die Konzentrationen lagen im Bereich von 9,6 U/ml bis 272 U/ml Die etablierten Tumormarker: AFP lag im Normbereich, β -HCG war in 10% der Fälle erhöht und NSE in 58% erhöht. Die Bestimmung von NSE und Pyruvatkinase Typ Tumor M2 bei Patienten mit Seminomen erscheint sinnvoll und hilfreich in der Diagnostik.