

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. J. Langner); Interdisziplinäres HLA-Labor (Leiter: Dr. rer. nat. H. K. G. Machulla)



**Typisierung der HLA-DPB1-Allele und
HLA-Assoziation der Chronisch Lymphatischen Leukämie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Lutz Peter Müller

geboren am 04.10.1970 in Bleicherode

verteidigt am 07.11.2000

Gutachter:

1. Prof. Dr. Langner Halle/S., Deutschland
2. Prof. Dr. Schmoll Halle/S., Deutschland
3. Prof. Dr. Claas Leiden, Niederlande

Referat und bibliographische Beschreibung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Typisierung der HLA-DPB1-Allele zu entwickeln und deren Verteilung in einer Gruppe gesunder kaukasoider Probanden aus der mitteldeutschen Region Sachsen-Anhalts (n = 157) zu bestimmen. Im zweiten Teil wurden die Frequenzen der HLA-DPB1-Allele und weiterer HLA-Merkmale unter an Chronisch Lymphatischer Leukämie (CLL) erkrankten kaukasoiden Patienten aus Sachsen-Anhalt (n = 101) untersucht und mit der Normalverteilung verglichen.

Mit der entwickelten PCR-SSO-Methode gelang bei allen Probanden die eindeutige Typisierung der HLA-DPB1-Allele. Die Normalverteilung entsprach der Verteilung in kaukasoiden Populationen. Zwischen HLA-DPB1 und Merkmalen anderer Loci existierte nur eine schwache Kopplung. Die Ergebnisse belegen, dass die Vererbung der HLA-DP-Merkmale durch eine genetische Variabilität und Selektion geprägt ist.

Die HLA-DPB1-Typisierung ergab eine positive Assoziation der CLL mit HLA-DPB1*0301 und den für dieses Allel typischen Aminosäuresequenzen. Unter CLL-Patienten waren weiterhin die Frequenzen der HLA-Allele DRB4*0103, DRB1*0401, DQB1*0302 sowie der DQB1-Homozygoten erhöht und die des Allels HLA-DQB1*0202 verringert. Der Unterschied für HLA-DRB4*0103 behielt seine Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche bei. Nicht bestätigt wurde eine in anderen Studien beschriebene Assoziation der CLL mit HLA-Klasse-I-Merkmalen. Die Kopplungsanalyse demonstrierte eine positive Assoziation der CLL insbesondere mit der Kombination HLA-DRB4*0103:DQB1*0302 sowie mit der erweiterten Kombination HLA-Cw*03:B*62:DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302. Für die HLA-Kombinationen DRB1*0401:DRB4*0103 und DRB4*0103:DQB1*0302 wurde eine CLL-spezifische, auch nach Korrektur für multiple Vergleiche signifikante Kopplung beobachtet. Bemerkenswert war eine erhöhte Frequenz von HLA-Cw*06 unter Patienten mit frühem Krankheitsbeginn sowie der HLA-DRB1/3/4/5- und -DQB1-Homozygoten unter weiblichen Patienten. Insgesamt war eine positive Assoziation der CLL mit Allelen des HLA-DR4:DR53 Haplotyps auffällig, für den eine Assoziation mit Autoimmunkrankheiten bekannt ist. Die erstmals unter CLL-Patienten erfolgte Untersuchung der HLA-DPB1-Allele lässt eine schwache Assoziation der CLL mit HLA-DP unabhängig von der Assoziation mit HLA-DR- und -DQ-Merkmalen vermuten. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass der menschliche MHC die Pathogenese sowie den Verlauf der CLL beeinflusst.

Müller, Lutz Peter: Typisierung der HLA-DPB1-Allele und HLA-Assoziation der Chronisch Lymphatischen Leukämie. Halle, Univ., Med. Fak., Diss. 91 Seiten, 2000.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das HLA-System des Menschen	1
1.1.1.	Molekülstruktur, Nomenklatur und Funktion der HLA-Merkmale	1
1.1.2.	Struktur und Nomenklatur des menschlichen MHC	4
1.1.3.	Polymorphismus und Populationsgenetik der HLA-Merkmale	6
1.2.	Typisierung der HLA-Merkmale	6
1.2.1.	Serologische Typisierungsmethoden	6
1.2.2.	Molekulargenetische Typisierungsmethoden	7
1.3.	Biologie des HLA-DP-Merkmales	9
1.4.	HLA-Merkmale und Chronisch Lymphatische Leukämie	10
1.4.1.	Epidemiologie, Ätiologie und immunologische Charakteristik der CLL	10
1.4.2.	Assoziation von HLA-Merkmalen und CLL	11
2.	Problem- und Zielstellung	12
3.	Material und Methoden	13
3.1.	Probanden und Referenz-DNA	13
3.2.	Typisierung der HLA-DPB1-Allele	15
3.2.1.	Prinzip der HLA-DPB1-Typisierung mittels PCR-SSO	15
3.2.2.	Präparation der DNA	15
3.2.3.	Synthese der verwendeten Oligonukleotide und Dig-Markierung	16
3.2.4.	Amplifikation des zweiten HLA-DPB1-Exons und dot blot der Amplifikate	18
3.2.5.	Hybridisierung der Dig-SSO-Sonden	19
3.2.6.	Auswertung	20
3.3.	Typisierung weiterer HLA-Klasse-I- und -II-Merkmale mittels PCR-SSP	20
3.4.	Serologische HLA-Typisierung	22
3.4.1.	Präparation von Lymphozyten des peripheren Blutes	23
3.4.2.	Typisierung der HLA-Klasse-I- und -II-Antigene	23
3.5.	Qualitätskontrolle und statistische Auswertung	25
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Testung und Optimierung der HLA-DPB1-Typisierungsmethode	27
4.1.1.	Effizienz der PCR-Amplifikation	27
4.1.2.	Spezifität der SSO-Hybridisierung	28
4.1.3.	Aussagekraft der PCR-SSO-Methode und Typisierung von Referenz-DNA	30
4.2.	Verteilung der HLA-DPB1-Allele bei gesunden kaukasoiden Probanden	32
4.2.1.	HLA-DPB1-Normalverteilung in der Bevölkerung Sachsen-Anhalts	32

4.2.2.	HLA-DPB1-Allelverteilung bei gesunden IgA-Mangel-Probanden	34
4.3.	Assoziation der CLL mit HLA-DPB1-Allelen und HLA-DPβ1-Aminosäuresequenzen	35
4.4.	Verteilung weiterer HLA-Klasse-I- und -II-Merkmale bei CLL-Patienten	37
4.4.1.	HLA-A-, -B- und -DR-Antigene	37
4.4.2.	HLA-A-, -B-, -Cw-, -DRB1/3/4/5- und -DQB1-Merkmale	38
4.4.3.	Kopplungsungleichgewichte der HLA-DPB1-Allele sowie CLL-assoziiertes HLA-Allele	41
4.5.	Verteilung der HLA-Merkmale bei CLL-Patienten in Abhängigkeit vom Geschlecht und Erkrankungsalter	43
4.5.1.	Unterteilung der Patientengruppe nach Alter und Geschlecht	43
4.5.2.	HLA-Assoziationen der CLL in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter	45
4.5.3.	HLA-Assoziationen der CLL in Abhängigkeit vom Geschlecht	49
5.	Diskussion	53
5.1.	PCR-SSO-Typisierung der HLA-DPB1-Allele	53
5.2.	Verteilung der HLA-DPB1-Allele in der Bevölkerung Sachsen-Anhalts	57
5.3.	HLA-Assoziation der CLL	61
6.	Zusammenfassung	67
7.	Literaturverzeichnis	71
8.	Anlage	86
9.	Thesen	89

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen der SI-Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ALL	Akut Lymphatische Leukämie
AML	Akut Myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende-Zellen (antigen presenting cells)
CD	Differenzierungsantigene (Cluster of Differentiation)
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	Wasser für Injektionszwecke
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
Fab	Antigen-bindendes-Fragment der Immunglobuline nach Papain-Verdau (fragment antigen binding)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen (human leukocyte antigen)
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes mellitus (Insulin Dependent Diabetes Mellitus)
IHW	Internationaler Histokompatibilitäts Workshop
IL	Interleukin
k. A.	keine Angaben
LMP	Multifunktionale Protease (large multifunctional protease)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MLCT	Mikrolymphozytotoxizitätstest (Micro Lymphocyte Toxicity Testing)
ns	nicht signifikant
MLR	Gemischte-Lymphozyten-Reaktion (Mixed Lymphocyte Reaction)
p	p-Wert des statistischen Vergleiches
p _{MV}	für multiple Vergleiche korrigierter p-Wert
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PBMC	Mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PCR-SSP	Polymerasekettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern (sequence specific primers)
PCR-SSO	Polymerasekettenreaktion mit nachfolgender Hybridisierung sequenzspezifischer Oligonukleotide

PLT	Aktivierte-Lymphozyten-Typisierung (Primed Lymphocyte Testing)
RA	Rheumatoide Arthritis
RCLB	Erythrozyten-Lyse-Lösung (Red Cell Lysis Buffer)
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
pf	Phänotypfrequenz
SD	einfache Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sIg	Zelloberflächen-Immunglobulin (surface immunoglobulin)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat Lösung
SSO	sequenzspezifisches Oligonukleotid (sequence specific oligonucleotide)
TAP	Antigen-Prozessierung-assoziiierter-Transporter (transporter associated with antigen processing)
Taq-Polymerase	<i>Thermus-aquaticus</i> DNA-Polymerase
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor)
TMAC	Tetramethyl-ammoniumchlorid
TNF	Tumornekrosefaktor (Tumor Necrosis Factor)

1. Einleitung

Ein Merkmal der erworbenen Immunität ist die adaptive Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Strukturen. Die Präsentation antigener Peptide erfolgt durch spezifische heterodimere Glykoproteine die beim Menschen als Human Leukocyte Antigens (HLA) bezeichnet werden. Diese HLA-Merkmale werden durch polymorphe Gene eines als Major Histocompatibility Complex (MHC) benannten Chromosomenabschnittes kodiert. Ein gegenüber gesunden Probanden gehäuftes Auftreten bestimmter HLA-Merkmale bei Patienten ist Anlass zur Untersuchung einer Beteiligung dieser Merkmale an der Pathogenese einer Krankheit. Die zunehmende Zahl identifizierter HLA-Merkmale erfordert hierfür eine stete Weiterentwicklung der Methoden der HLA-Typisierung. Die Funktion der HLA-Merkmale lässt insbesondere einen Einfluss auf die Pathogenese von Autoimmunkrankheiten oder malignen Erkrankungen vermuten. Zu letzteren gehört die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) deren Pathogenese bis heute nicht vollständig verstanden ist.

1.1. Das HLA-System des Menschen

Nach der Transplantation von Gewebe einer Maus auf eine andere Maus wird das Transplantat um so langsamer abgestoßen je enger die Tiere miteinander verwandt sind. Peter A. Gorer stellte vor ca. siebzig Jahren fest, dass dieses Abstoßungsmuster einem Mendelschen Erbgang folgt und von mehreren Genen kontrolliert wird (Gorer, 1936). Die Erforschung des homologen menschlichen Genkomplexes begann mit der u. a. durch Dausset beschriebenen Agglutination von väterlichen Leukozyten durch das Serum von Multipara (Dausset, 1954). Das erste menschliche Leukozyten-Antigen wurde von Dausset 1958 als Mac-2, heute HLA-A2 definiert (Dausset, 1958). Van Rood beschrieb 1962 ein weiteres, unabhängiges Merkmal (FOUR) mit den Allelen 4a und 4b (Klein, 1986). Damit entstand das noch heute gültige Konzept des HLA-Systems: Die HLA-Merkmale werden von mehreren Genen des MHC kodiert. Diese Gene sind polymorph, d. h. sie kodieren mehrere zu differenzierende Antigene.

1.1.1. Molekülstruktur, Nomenklatur und Funktion der HLA-Merkmale

HLA-Moleküle sind an der Zelloberfläche exprimierte heterodimere Glykoproteine, die aufgrund ihrer Molekülstruktur zur Superfamilie der Immunglobuline gezählt werden. Entsprechend der Struktur und Funktion werden HLA-Klasse-I-Merkmale und HLA-Klasse-II-Merkmale unterschieden (Abb. 1). HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer transmembranär an der Zelloberfläche verankerten α -Kette (43 kDa) die mit dem ausschließlich extrazellulären

β_2 -Mikroglobulin (12 kDa) nicht kovalent assoziiert ist. Die tertiäre Struktur der α -Kette ist durch drei extrazelluläre Domänen ($\alpha 1 - 3$) charakterisiert. β_2 -Mikroglobulin bildet als gesamtes Molekül die vierte Domäne in der Quartärstruktur des heterodimeren Komplexes (Bjorkman et al., 1987b). Die Röntgenkristallanalyse zeigt, dass die N-terminal gelegenen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen eine durch α -Helix-Strukturen und antiparallele β -Faltblattabschnitte begrenzte Grube formen, die der Bindung von antigenen Peptiden dient (Bjorkman et al., 1987a). HLA-Klasse-II-Moleküle bestehen aus einer α -Kette (34 kDa) und einer β -Kette (29 kDa). Im Gegensatz zu den HLA-Klasse-I-Moleküle verfügen beide Polypeptidketten über einen kurzen intrazytoplasmatischen und transmembranären Abschnitt und bilden in ihrer Raumstruktur je zwei extrazelluläre Domänen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$ bzw. $\beta 1$ und $\beta 2$). Eine den HLA-Klasse-I-Molekülen ähnliche, allerdings geringfügig größere Peptid-bindende-Grube wird durch die N-terminalen $\alpha 1$ - und $\beta 1$ - Domänen geformt (Brown et al., 1993).

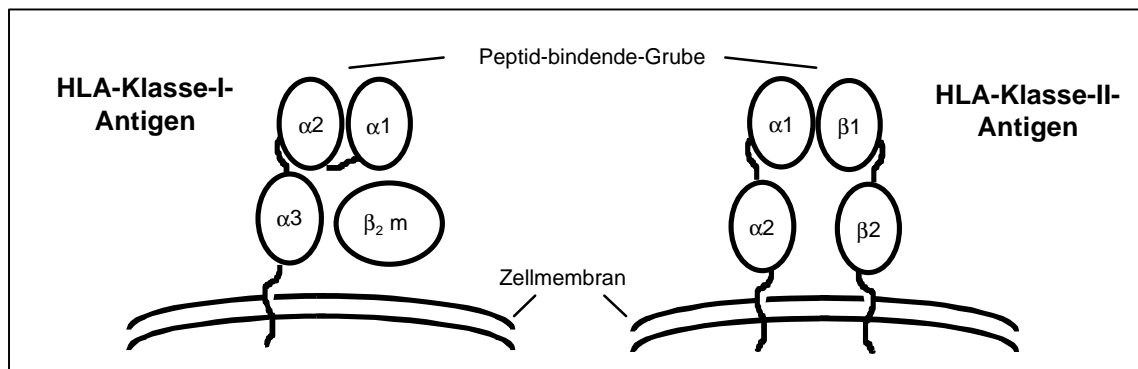


Abb. 1: Schematische Struktur der HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Moleküle; $\beta_2 m$ - β -2 Mikroglobulin

Die nicht an der Bildung der Peptid-bindenden-Grube beteiligten Domänen der HLA-Moleküle weisen, wie auch β_2 -Mikroglobulin, eine strukturelle Ähnlichkeit zu den konstanten Domänen der Immunglobuline auf (Kappes und Strominger, 1988). Gleichzeitig charakterisieren sie die isotypische Spezifität des HLA-Merkmales (Parham et al., 1989), so dass eine Unterscheidung der Klasse-I-Isotypen HLA-A, -B, -Cw sowie der Klasse-II-Isotypen HLA-DR, -DQ und -DP möglich ist. Die Primärstruktur der extrazellulären Domänen der HLA-Moleküle ist durch eine hohe Polymorphie der Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Dieser Polymorphismus konzentriert sich auf bestimmte Regionen der Peptid-bindenden-Grube (Bjorkman et al., 1987a) und charakterisiert dem Paratop der Immunglobuline ähnlich die antigenen Determinanten eines HLA-Merkmales. Durch die Verwendung gegen diese 'Paratope' der HLA-Moleküle gerichteter Antikörper können die verschiedenen idiotyp-artigen Antigene eines HLA-Isotyps unterschieden werden. Bis 1996 waren von jedem der HLA-Isotypen zwischen 6 und 49 spezifische Anti-

gene unterscheidbar (Bodmer et al., 1997). Die Nomenklatur der HLA-Antigene setzt sich zusammen aus dem Buchstaben der Isotypbezeichnung (z. B. HLA-DR) sowie einer Ziffer (z. B. HLA-DR4). Die Fokussierung des Polymorphismus in einen funktionell wichtigen Bereich erinnert an die hypervariablen Regionen der Immunglobuline im Bereich der Antigenbindungsstelle. Es ist jedoch für die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Antigenen entscheidend, dass sich der HLA-Polymorphismus im Gegensatz zu den Immunglobulinen während der ontogenetischen Reifung des Immunsystems nicht ändert (Zinkernagel et al., 1978).

Eine wichtige Funktion der HLA-Moleküle besteht in der nicht-kovalenten Bindung antigener Peptide in der Peptid-bindenden-Grube und deren Präsentation auf der Zelloberfläche (Madden et al., 1992). Die Art dieser Peptide wird durch die paratop-ähnliche Struktur der Peptid-bindenden-Grube bestimmt (Engelhard, 1994; Rammensee et al., 1993). Da die zwischenmolekularen Wechselwirkungen nur durch bestimmte Aminosäuren innerhalb der Peptid-bindenden-Grube vermittelt werden, besteht eine Flexibilität, die eine Präsentation verschiedener Peptide durch ein spezifisches HLA-Molekül erlaubt (Guo et al., 1992). HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle unterscheiden sich in der Art der präsentierten Peptide. Klasse-II-Moleküle binden im endoplasmatischen Retikulum zytoplasmatische körpereigene oder körperfremde Peptide, z. B. viraler Herkunft von ca. 10 - 12 Aminosäuren Länge (Monaco, 1992). Die selektive Bereitstellung der zu präsentierenden Peptide wird dabei von zwei, als Proteasom und TAP (transporter associated with antigen processing) bezeichneten Proteinkomplexen vermittelt (Cresswell et al., 1994). Klasse-II-Moleküle hingegen binden innerhalb von Phago lysosomen Peptide von bis zu 34 Aminosäuren Länge. Diese Peptide entstammen phagozytierten Proteinstrukturen, die im sauren Milieu des Lysosomes durch Proteinase lysiert werden (Cresswell, 1994). Auch hier ist die Bindung abhängig von der Expression akzessorischer Proteine, wie z. B. der sogenannten Invarianten Kette und HLA-DM (Fling et al., 1994). Diesem unterschiedlichen Spektrum präsentierter Peptide entspricht eine unterschiedliche Gewebsexpression der HLA-Klasse-I- und -II-Merkmale. Während sich Klasse-I-Moleküle mit wenigen Ausnahmen auf allen kernhaltigen Zellen nachweisen lassen, erfolgt eine konstitutive Expression von Klasse-II-Molekülen nur durch die zur Phagozytose fähigen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie z. B. B-Lymphozyten und Makrophagen (Neeffjes und Momburg, 1993). Verschiedene Mediatoren modulieren die Expression von HLA-Merkmalen oder initiieren, wie z. B. Interferon- γ , die Expression von Klasse-II-Merkmalen auf T-Lymphozyten und Epithelien (Glimcher und Kara, 1992).

Die spezifische, erworbene Immunität erfordert die klonale Aktivierung von T-Lymphozyten als Effektorzellen. Diese Spezifität wird durch das auf der Zelloberfläche präsentierte HLA : Peptid : Heterotrimer vermittelt, das dem polymorphen T-Zell-Rezeptor (TCR) als Li-

gand dient (Germain, 1994). Für eine Immunantwort werden in einem als MHC-Restriktion bezeichneten Prozess nur jene T-Zellen aktiviert, deren TCR einen exprimierten HLA : Peptid : Komplex spezifisch erkennen (Zinkernagel und Doherty, 1975). Voraussetzung ist hierfür der ontogenetische Prozess der positiven und negativen Selektion im Thymus, bei dem nur jene $CD4^+CD8^+$ T-Zellen der Apoptose entgehen, deren TCR HLA : Peptid : Komplexe aus körpereigenem HLA-Antigen und fremdem Peptid erkennen (Jameson et al., 1994). Der Rezeptor CD8 interagiert dabei mit der $\alpha 3$ -Domäne der Klasse-I-Antigene, so dass zytotoxische $CD8^+$ T-Lymphozyten vorrangig durch zytoplasmatische Antigene aktiviert werden. Die Bindung des CD4 Moleküls an die $\beta 2$ -Domäne der Klasse-II-Antigene bedingt eine Aktivierung von inflammatorischen T_{H1} - oder T_{H2} -Helfer-Lymphozyten durch extrazelluläre, phagozytierte Antigene (Janeway et al., 1992). Neben kostimulatorischen Signalen (Schwartz, 1992) ist die Interaktion der variablen Regionen des TCR sowohl mit dem HLA-gebundenen Peptid als auch mit den polymorphen Domänen des HLA-Moleküls selbst entscheidend (Davis und Bjorkman, 1988).

1.1.2. Struktur und Nomenklatur des menschlichen MHC

Mit Ausnahme des $\beta 2$ -Mikroglobulin-Gens, welches sich auf dem Chromosom 15 (15q21) befindet, sind die Gene der HLA-Merkmale auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p23.1) im 4000 kB umfassenden Bereich des MHC lokalisiert (Campbell und Trowsdale, 1993). Die Kombination der Allele verschiedener Gene eines Chromosoms wird als Haplotyp bezeichnet. Der menschliche MHC wird traditionell in die Abschnitte der Klasse-I-, -Klasse-III- und -Klasse-II-Gene unterteilt (Abb. 2). Die Nomenklatur der HLA-Gene und ihrer Allele setzt sich zusammen aus (Bodmer, 1997):

1. dem Buchstaben des serologischen Isotypes (z. B. HLA-DR)
2. im Fall der Klasse-II-Merkmale dem Buchstaben A oder B für die Gene der α - bzw. β -Ketten (z. B. HLA-DRB)
3. einer Ziffer, wenn mehrere Gene für das jeweilige Protein kodieren (z. B. HLA-DRB1)
4. aus der vier- oder fünfstelligen Ziffer des spezifischen Allels, wobei die ersten zwei Ziffern denen der serologischen Spezifität entsprechen (z. B. HLA-DRB1*0401).

In Nähe des Zentromers befinden sich die MHC-Klasse-II-Gene. Dazu gehören die polymorphen Gene HLA-DPA1 und HLA-DPB1, die für die α - und β -Kette des HLA-DP-Merkmales kodieren, sowie die Pseudogene HLA-DPA2 und -DPB2. In Richtung des Telomers folgen die teilweise polymorphen Gene der HLA-DM-Moleküle, der TAP-I- und -II-Proteine und der Proteasomen-Untereinheiten LMP2 (large multifunctional protease) und LMP7. In größerem Ab-

stand in Richtung Telomer befinden sich neben den Pseudogenen HLA-DQA2 und -DQB2 die polymorphen Gene HLA-DQA1 und -DQB1, die für die α - und β -Proteinketten des HLA-DQ-Merkmales kodieren. Der sich anschließende Bereich der HLA-DR-Gene weist eine komplexe Struktur auf. Das stets vorhandene, nicht polymorphe HLA-DRA-Gen kodiert für die α -Kette aller HLA-DR-Merkmale, während das polymorphe HLA-DRB1-Gen für die β -Kette der HLA-DR-Merkmale HLA-DR1 bis -DR18 kodiert. Zusätzlich existieren die Gene HLA-DRB2 bis -DRB9, wobei es sich bei den Genen HLA-DRB2 und HLA-DRB6 - -DRB9 um Pseudogene handelt. Auf jedem Chromosom findet sich nur eines der polymorphen HLA-DRB3-, -DRB4- und -DRB5-Gene, abhängig von der Spezifität des HLA-DRB1 Gens. Das HLA-DRB3-Gen kodiert für die β -Kette des Antigens HLA-DR52 und liegt in kaukasoiden Populationen mit wenigen Ausnahmen dann vor, wenn das HLA-DRB1-Gen des gleichen Chromosoms für das Merkmal HLA-DR4, -DR7 oder -DR9 kodiert. HLA-DRB4 kodiert für die β -Kette des Antigens HLA-DR53 und findet sich bei kaukasoiden Probanden in haplotypischer Kopplung mit dem HLA-DR3-, -DR5- oder -DR6-Merkmal. Das HLA-DRB5-Gen kodiert für die β -Kette von HLA-DR51 und tritt bei kaukasoiden Individuen im Haplotyp mit dem HLA-DR2-Merkmal auf. Bei kaukasoiden Probanden, deren HLA-DRB1-Gen für die Merkmale HLA-DR1, -DR8 oder -DR10 kodiert, existiert auf dem gleichen Chromosom kein weiteres exprimiertes HLA-DRB-Gen. Einen Überblick über dieses Kopplungsschema gibt Abbildung 2.

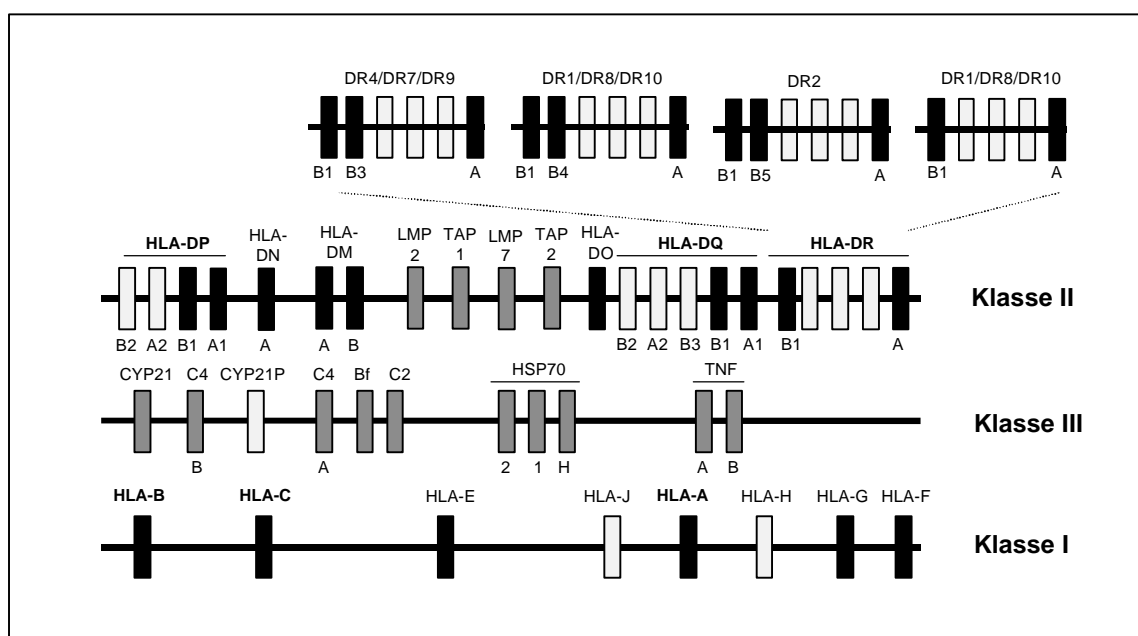


Abb. 2: Genkarte des humanen MHC. Abgebildet sind HLA-Gene (schwarz), Pseudogene (hellgrau) sowie Gene anderer Proteine (dunkelgrau). Die Struktur der HLA-DR-Region ist in Abhängigkeit des HLA-DRB1-Alleles dargestellt. [modifiziert nach (Campbell und Trowsdale, 1993)].

In Richtung Telomer folgt ein Abschnitt, der als MHC-Klasse-III-Region bezeichnet wird, obwohl seine Gene nicht für Transplantationsantigene kodieren. Dies sind die Gene der 21-Hydroxylase (CYP21), der Komplementproteine C4, C2 und Faktor-B (Bf), der Hitzeschock-Proteine (HSP-70) und des Tumornekrosefaktors- α und - β (TNF- α , TNF- β) sowie eine Vielzahl von Genen unbekannter Funktion. Am telomeren Ende des MHC befindet sich die Klasse-I-Region mit den polymorphen HLA-B-, HLA-C- und HLA-A-Genen, die für die α -Ketten der entsprechenden Klasse-I-Moleküle kodieren. Hier sind weiterhin die HLA-E-, -F- und -G-Gene lokalisiert, über deren Genprodukte derzeit noch wenig bekannt ist.

1.1.3. Polymorphismus und Populationsgenetik der HLA-Merkmale

Die Allele der HLA-Gene werden kodominant exprimiert. Somit stehen bei völliger Homozygotie abhängig vom HLA-DRB1-Allel fünf bis sechs verschiedene HLA-Moleküle für die Antigenpräsentation zur Verfügung. Eine Heterozygotie vergrößert die Zahl der exprimierten HLA-Merkmale und damit das Spektrum der präsentierten Peptide. Im Falle der HLA-DQ- und -DP-Merkmale entsteht eine zusätzliche Variabilität durch die *cis*- und *trans*-Kombination der α - und β -Kette der mütterlichen und väterlichen Gene (Giles et al., 1985). Weiterhin zeichnet sich der MHC durch das Phänomen des Kopplungsungleichgewichtes aus. Dies bezeichnet die Beobachtung, dass Allele verschiedener Gene häufiger innerhalb eines Haplotypes zusammen auftreten, als ausgehend von ihren Einzelfrequenzen bei völliger Zufallsvererbung zu erwarten wäre (Klein, 1986). Diese Kopplung wird als Differenz (Δ) zwischen beobachteter und erwarteter Häufigkeit des Haplotypes ausgedrückt (Mattiuz et al., 1970). Sowohl Polymorphismus als auch Kopplungsungleichgewicht der HLA-Merkmale deuten darauf hin, dass die Struktur der HLA-Moleküle und deren Fähigkeit zur Peptidpräsentation ein Selektionsmerkmal darstellt (Begovich et al., 1992; Bodmer, 1972). Diese Annahme wird durch die unterschiedliche Häufigkeit der HLA-Allele in Bevölkerungsgruppen verschiedener ethnischer und geographischer Herkunft bestätigt (Baur et al., 1984). Die Bedeutung der HLA-Merkmale für die Transplantationsmedizin, für die Erforschung der Pathogenese HLA-assoziiierter Krankheiten, für die Evolutionsforschung sowie für die Vaterschaftsbestimmung erfordert eine Typisierung der Allel- und Antigenfrequenzen mittels zuverlässiger Methoden.

1.2. Typisierung der HLA-Merkmale

1.2.1. Serologische Typisierungsmethoden

Die ursprüngliche Methode der serologischen Bestimmung der HLA-Antigene bestand im Lymphozytenagglutinationstest unter Einsatz der von Multipara gewonnenen Antisera (Dausset,

1958). Diese wurde später durch den auch heute noch zur Routinetypisierung angewandten zweistufigen Mikrolymphozytotoxizitätstest (MLCT) (Terasaki und McClelland, 1964) ersetzt. Dabei werden Anti-HLA-Antikörper mit der zu typisierenden Lymphozyten-Probe unter nachfolgendem Zusatz von Komplement inkubiert. Durch die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe wird der klassische Komplementweg aktiviert, und die Lyse der Zellmembran ermöglicht das Eindringen eines zugesetzten Vitalfarbstoffes und damit die mikroskopisch sichtbare Anfärbung des Zellkerns (positive Reaktion). Wenn die Lymphozyten HLA-Antigene exprimieren, die kein durch den Antikörper erkanntes Epitop besitzen, unterbleibt eine Komplementaktivierung (negative Reaktion). Entsprechend der zellspezifischen Expression der HLA-Klasse-II-Moleküle erfordert deren Typisierung eine Anreicherung der B-Lymphozyten durch Adhärenzmethoden (Nylonwatte) oder immunomagnetische Zellseparation (Vartdal et al., 1986). Die Nomenklatur der einzelnen Antigene spiegelt die Entwicklung der HLA-Typisierung wider. So konnten vom zunächst als HLA-A9 identifizierten Antigen mittels spezifischerer Antikörper die Subspezifitäten ('splits') HLA-A23 und -A24 unterschieden werden. Im Falle des HLA-B-Isotypes ist weiterhin eine Unterteilung der HLA-B-Antigene hinsichtlich ihrer supertypischen Spezifitäten HLA-Bw4 und -Bw6 möglich (Bodmer et al., 1997). Weitere serologische Typisierungstechniken sind die Mixed-Lymphocyte-Reaction (MLR) und das Primed-Lymphocyte-Testing (PLT), die auf der klonalen Proliferation von T-Lymphozyten nach Inkubation mit Lymphozyten eines nicht HLA-identischen Spenders basieren (Bach und Hirschorn, 1964; Shaw et al., 1980).

1.2.2. Molekulargenetische Typisierungsmethoden

Mit der Polymerase-Kettenreaktion steht eine Methode der molekulargenetischen HLA-Typisierung zur Verfügung (Saiki et al., 1986). Deren Prinzip besteht in der exponentiellen Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes durch die mehrmalige Wiederholung eines dreistufigen Reaktionszyklus (Mullis et al., 1986). In diesem Zyklus erfolgt nacheinander die thermische Denaturierung der DNA, die Hybridisierung (Annealing) von zwei als Primer bezeichneten Oligonukleotiden an ihre Komplementärsequenzen und abschließend die Synthese der DNA-Komplementärstränge, beginnend am 3'-Ende der Primer durch eine DNA-Polymerase (Abb. 3). Der Einsatz einer hitzestabilen Taq- (*Thermus aquaticus*) DNA-Polymerase (Chien et al., 1976) ermöglicht das mehrmalige, ununterbrochene Durchlaufen dieses Zyklus. Der Reaktionsansatz enthält die vier Desoxynuklotidtriphosphate in äquimolaren Mengen sowie $MgCl_2$ als Kofaktor der DNA-Polymerase. Die an der Ausgangs-DNA synthetisierten Tochterstränge weisen ein variables 3'-Ende auf. Dagegen besitzen Stränge, bei denen ein Tochterstrang als Synthesevorlage diente, fest definierte 3'- und 5'-Enden. Die mehrmalige

inkubiert. Die Sequenzen dieser sogenannten SSO-Sonden (sequence specific oligonucleotides) sind zu allelspezifischen Sequenzen innerhalb der amplifizierten DNA komplementär. Durch einen Waschschrift werden unspezifisch gebundene Sonden entfernt. Abhängig von der Temperatur als auch dem Ionen-Gehalt der Waschlösung erfolgt eine Bindung der Sonde nur bei vollständig komplementären Sequenzen. Je nach Markierung der Sonden kann die Hybridisierung abschließend autoradiographisch oder in einer durch ein Antikörper-gebundenes Enzym katalysierten Farbreaktion dargestellt werden.

Die Methode des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) basiert auf der Existenz allelspezifischer Endonukleasen-Schnittstellen innerhalb der hypervariablen Zonen der HLA-Allele. Abhängig von der Spezifität des Allels liefert die Inkubation mit Endonukleasen Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge (Stephens et al., 1989).

1.3. Biologie des HLA-DP-Merkmales

Ende der achtziger Jahre gelang die Kartierung eines weiteren, später als HLA-DP bezeichneten HLA-Klasse-II-Merkmales (Mawas et al., 1978; Shaw et al., 1980). Die α - und β -Kette des HLA-DP-Heterodimers werden durch die MHC-Gene HLA-DPA1 und -DPB1 kodiert (Okada et al., 1985). Eine serologische Typisierung der HLA-DP-Antigene mittels Antiseren gelingt im Gegensatz zu den anderen HLA-Klasse-II-Merkmalen nur unzureichend (Mueller-Eckhardt et al., 1990). Eine HLA-DP-Inkompatibilität resultiert nur in einer schwachen Reaktion in der gemischten Lymphozytenkultur (Salazar et al., 1992). Jedoch bedingt HLA-DP eine starke sekundäre allogene T-Zellaktivierung (Shaw et al., 1980). Mittels PLT lassen sich bisher sechs HLA-DP-Antigene definieren (Bodmer et al., 1997). Dieser Zahl steht ein ausgeprägter Polymorphismus des HLA-DPB1-Gens mit seinen derzeit über siebenzig bekannten Allelen gegenüber (Bodmer et al., 1997). Dieser Polymorphismus konzentriert sich auf sechs hypervariable Regionen (A bis F) innerhalb des für die β 1-Domäne kodierenden zweiten Exons des HLA-DPB1-Gens (Kelly und Trowsdale, 1985; Marsh und Bodmer, 1995). Allerdings existieren in jeder dieser Regionen keine allelspezifischen Sequenzen (Abb. 4). Jedes HLA-DPB1-Allel ist erst durch die spezifische Kombination der Sequenzen in allen sechs hypervariablen Regionen charakterisiert (Bugawan et al., 1990). Diese Struktur erschwert eine HLA-DPB1-Typisierung mittels PCR-SSP. Obwohl HLA-DP-Antigene in wesentlich geringerer Dichte auf der Zellmembran von APC exprimiert werden (Brooks und Moore, 1988), sind sie ebenso an der Präsentation antigenen Peptide beteiligt (Celis et al., 1990). Die Bedeutung der HLA-DP-Antigene für die Transplantationsmedizin und die Entwicklung einer Graft-versus-host-disease (GvHD) wird angesichts der fehlenden MLR-Reaktivität bei HLA-DP-Inkompatibilität kontrovers diskutiert

Leukämie bei Erwachsenen darstellt (Kipps, 1995), liegen die Erkrankungszahlen in ostasiatischen Ländern wesentlich niedriger (Linnet und Cartwright, 1988). Bei Erstdiagnose sind 80 % der Patienten älter als 50 Jahre, und zwei Drittel der Patienten sind männlichen Geschlechts.

Die Ätiologie der CLL ist weitgehend ungeklärt. Das bei Verwandten von CLL-Patienten erhöhte Leukämierisiko (Gunz et al., 1975; Gunz et al., 1978; Linnet und Cartwright, 1988) deutet auf eine genetische Prädisposition hin. Es konnte bisher weder ein Zusammenhang mit der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung (Bizzozero et al., 1967), noch eine virale Genese (Faguet, 1994) nachgewiesen werden. Eine höhere Inzidenz in bestimmten Berufsgruppen (Arp et al., 1983) lässt auf einen Einfluss von Umweltfaktoren schließen. In ca. 50 % aller CLL-Patienten finden sich Chromosomen-Anomalien die vorrangig die Chromosomen 12, 13 oder 14 (Faguet, 1994) und somit auch die Immunglobulin-Schwerketten-Gene betreffen. Eine Mutation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ist wahrscheinlich (Rozman und Montserrat, 1995). Die gesteigerte Expression des bcl-2 Gens in CLL-Lymphozyten (Hanada et al., 1993) lässt eine Störung der Apoptose-Regulation vermuten. Die Diagnose basiert auf einer anhaltenden Lymphozytose mit Knochenmark-Infiltration reif erscheinender Lymphozyten sowie auf einer Immunphänotypisierung (Dighiero et al., 1991; International-Workshop-on-Chronic-Lymphocytic-Leukemia, 1989). Neben den charakteristischen B-Zell-Markern CD19, CD20, HLA-DR und monoklonalem, Leichtketten-restringiertem sIg exprimieren die CLL-B-Zellen CD5 (Wang et al., 1980). CD5⁺ B-Zellen, sogenannte B-1-Zellen stellen den Hauptanteil der fetalen B-Lymphozyten (Kipps, 1989). Eine Abstammung der CLL-Zellen von CD5⁺ B1-B-Lymphozyten wird kontrovers diskutiert (Dighiero et al., 1991). Die Prognose der Erkrankung spiegelt sich in den gebräuchlichen klinischen Stadieneinteilungen wider (Binet et al., 1981; Rai et al., 1975). Die Therapie basiert auf der Stadieneinteilung (International-Workshop-on-Chronic-Lymphocytic-Leukemia, 1989) und besteht in einer Chemotherapie, bei der u. a. Chlorambucil, Prednisolon und Fludarabin eingesetzt werden. Keine dieser Therapien verspricht einen kurativen Erfolg, so dass neuere Therapieansätze auf der allogenen oder autologen Knochenmarktransplantation basieren (Rozman und Montserrat, 1995).

1.4.2. Assoziation von HLA-Merkmalen und CLL

Erste Untersuchungen zur familiären Häufung von CLL-Erkrankungen deuteten bereits auf einen Zusammenhang zwischen Krankheitssuszeptibilität und HLA-Typ der Patienten hin (Delmas-Marsalet et al., 1974). Gleichzeitig wurde für die Chronisch Myeloische Leukämie (CML), die Akut Myeloische Leukämie (AML) und die Akut Lymphatische Leukämie (ALL) in einer großen Studie (n = 1834) eine Assoziation mit den HLA-Antigenen Cw3 und Cw4 belegt

(Bortin et al., 1987). Bisherige Untersuchungen zur Assoziation von HLA und CLL basierten vorrangig auf der serologischen HLA-Typisierung und lieferten keine einheitlichen Resultate. Eine demonstrierte Assoziationen mit HLA-B18 (Richter et al., 1973) und -DR5 (Winchester et al., 1983) konnte durch andere Studien nicht bestätigt werden (Tiwari und Terasaki, 1985). In späteren Untersuchungen wurde eine erhöhte Frequenz von HLA-Cw6 (Linnet et al., 1988), HLA-A1 und -B8 (Kilpatrick et al., 1984) sowie HLA-B35 (Cuttner et al., 1994) unter CLL-Patienten beobachtet. Weiterhin wurde eine Assoziation von HLA-B8 sowie des Haplotypes HLA-A2:B12(44):DR7 mit leichtem bzw. schwerem Krankheitsverlauf beschrieben (Dyer et al., 1986). Trotz dieser unterschiedlichen Ergebnisse besteht die Vermutung, dass HLA-Merkmale an einer multifaktoriellen Pathogenese der CLL beteiligt sind. Diese Hypothese wird durch die Assoziation von MHC-Allelen mit boviner, viral-induzierter Lymphozytose (van Eijk et al., 1992) sowie mit B-Zell-CLL in Mäusen (Okamoto et al., 1993) unterstützt. Ebenfalls bei Mäusen wurde eine Assoziation zwischen spezifischen MHC-Merkmalen und viral induzierten Leukämien (Lilly et al., 1964) und B-Zell-Lymphomen (Vasmel et al., 1988) beschrieben.

Eines der Modelle zur Krankheitsassoziation von HLA-Merkmalen basiert auf einem Kopplungsungleichgewicht von krankheitsassoziierten HLA-Allelen mit pathogenetisch relevanten Genen. Die Abklärung dieser Hypothese erfordert die molekulargenetische Typisierung von HLA-Allelen. In der nach Kenntnis des Autors einzigen molekulargenetischen Untersuchung zur Verteilung von HLA-Merkmalen bei CLL-Patienten wurde eine Assoziation mit HLA-DRB1*0401 beschrieben (Dorak et al., 1996). Gleichfalls lag zu Beginn der Arbeit nur eine Studie zur Assoziation zwischen HLA-DP und CLL vor. In dieser, mittels PLT durchgeführten serologischen Untersuchung beschrieben Pawelec et al. unter 51 CLL-Patienten eine gegenüber den Kontrollprobanden erhöhte Frequenz der PLT-Spezifität HLA-DP-blank sowie eine erniedrigte Frequenz von HLA-DPw1 (Pawelec et al., 1989). Während für den Morbus Hodgkin (Klitz et al., 1994) und die ALL (Taylor et al., 1995) eine Assoziation mit HLA-DPB1-Allelen gezeigt werden konnte, liegt nach Kenntnis des Verfassers derzeit keine molekulargenetische Untersuchung zur Verteilung der HLA-DPB1-Merkmale bei CLL-Patienten vor.

2. Problem- und Zielstellung

Die Typisierung der HLA-Merkmale hat eine große Bedeutung für die Erforschung der Pathogenese HLA-assoziiierter Erkrankungen. Zu Beginn der vorliegenden Studie lagen nur wenige Untersuchungen sowohl zur Verteilung der HLA-DPB1-Allele in der deutschen Bevölkerung als auch zu Krankheitsassoziationen des HLA-DP-Merkmals vor. Gleichzeitig war kein kommerzielles Verfahren zur Typisierung aller bis dahin bekannten HLA-DPB1-Allele erhältlich.

Das erste Ziel der Arbeit bestand daher darin, eine Methode zur HLA-DPB1-Typisierung auf der Basis des PCR-SSO-Verfahrens zu entwickeln. Mit dieser Methode sollte dann die Frequenz der HLA-DPB1-Allele in einer größeren Gruppe von gesunden, kaukasoiden Probanden aus Mitteldeutschland bestimmt und mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen werden.

Die CLL ist eine häufige, maligne Erkrankung, für die eine multifaktorielle Ätiologie unter Beteiligung prädisponierender genetischer Faktoren vermutet wird. In wenigen, zumeist serologischen Studien wurde für verschiedene HLA-Merkmale eine Assoziation mit der CLL beschrieben, ohne dass bisher ein Zusammenhang als gesichert gilt. Molekulargenetische Methoden ermöglichen eine differenziertere HLA-Typisierung und könnten helfen, die Bedeutung des HLA-Systems für die Pathogenese der CLL zu klären.

Zweites Ziel dieser Studie war es deshalb, mit der entwickelten Methode die Verteilung der unter CLL-Patienten noch nicht untersuchten HLA-DPB1-Allele in einer größeren Gruppe von kaukasoiden CLL-Patienten aus dem mitteldeutschen Raum zu bestimmen und mit der Verteilung in der Kontrollgruppe zu vergleichen. Diese Studie wurde als Teil des Forschungsprojektes „HLA und Leukämie“ am Interdisziplinären HLA-Labor des Institutes für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle durchgeführt. Im Rahmen dieses Projektes sollten weiterhin die Frequenzen anderer HLA-Merkmale und deren Kopplung mit HLA-DPB1-Allelen in beiden Gruppen verglichen werden. Hierfür wurden die Ergebnisse der für alle Probanden beider Gruppen erfolgten serologischen und molekulargenetischen Typisierung der Merkmale HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DRB3/4/5/, -DQB1 ausgewertet. Der statistische Vergleich der Frequenzen dieser HLA-Merkmale sollte die Frage nach einer HLA-Assoziation der CLL beantworten helfen und dabei insbesondere die Rolle der erstmals in einer Gruppe von CLL-Patienten typisierten HLA-DPB1-Allele berücksichtigen. Anhand der molekulargenetischen Typisierung konnte auch eine Aussage über die Assoziation der CLL mit HLA-Homozygotien getroffen werden. Abschließend sollte die Verteilung der typisierten HLA-Merkmale in Abhängigkeit der Prognosefaktoren Geschlecht und Alter der Patienten bei Erstdiagnose verglichen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Probanden und Referenz-DNA

Die Kontrollgruppe umfasste 157 gesunde kaukasoiden Probanden mit Wohnsitz in Sachsen-Anhalt und setzte sich aus 94 Frauen (59,9 %) und 63 Männern (40,1 %) zusammen. Bis zum Abschluss der Studie 1997 war bei keinem der Probanden eine relevante, insbesondere mit HLA-Merkmalen assoziierte Krankheit bekannt. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Typisie-

zung betrug 27 Jahre (Minimum 16 Jahre, Maximum 87 Jahre) mit einem Durchschnittsalter von 29,2 Jahren ($\pm 9,7$ Jahre SD). Bei allen freiwilligen Probanden erfolgte sowohl eine Bestimmung der HLA-DPB1-Allele als auch eine molekulargenetische und serologische Typisierung weiterer HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Merkmale.

Die Patientengruppe umfasste 101 an CLL erkrankte Patienten und bestand aus 56 männlichen (55,5 %) und 45 weiblichen (45,5 %) Patienten. Dies entspricht einem Verhältnis von Frauen : Männern von 1 : 1,2. Das mediane Alter bei Erstdiagnose betrug in der gesamten Patientengruppe 61 Jahre (Minimum 34 Jahre, Maximum 89 Jahre). Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose lag bei 61,5 Jahren ($\pm 11,0$ Jahre SD). Bei allen CLL-Patienten handelte es sich um kaukasoiden Probanden aus Sachsen-Anhalt, die sich im Zeitraum von 1986 bis 1997 an der Klinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, der hämatologisch-onkologischen Praxis PD Dr. Rohrberg in Halle sowie den Abteilungen für Innere Medizin des Krankenhauses Stendal und des Städtischen Klinikums Dessau in Betreuung befanden. Die Diagnose einer CLL wurde seitens der betreuenden Ärzte gestellt. Da die Diagnostik durch verschiedene Kliniken erfolgte, wurden Stadieneinteilung und Krankheitsverlauf nicht in die Auswertung einbezogen. Im Einverständnis mit den Patienten wurde bei allen Patienten eine Typisierung der HLA-DPB1-Allele sowie der weiteren HLA-Merkmale durchgeführt. Für die Typisierung der Patienten und der Kontrollen kamen jeweils die gleichen Methoden zur Anwendung.

Im Rahmen einer im Interdisziplinären HLA Labor der MLU durchgeführten Studie zur Assoziation von HLA und IgA-Mangel (Schönermarck, 1998) erfolgte zusätzlich eine HLA-DPB1-Typisierung bei 65 kaukasoiden IgA-Mangel-Probanden, bei denen neben einem IgA-Mangel keine weiteren Erkrankungen vorlagen. In diese Gruppe wurden 26 (40,0 %) weibliche und 39 (60 %) männliche Probanden aufgenommen. Es bestanden keine Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Probanden der verschiedenen untersuchten Gruppen.

Die DNA von 21 B-lymphoblastoiden Zelllinien (freundlicherweise überlassen von Prof. Bein; Med. Hochschule Lübeck und Dr. A. Wöpl, Med. Fakultät, Univ. Ulm) mit bekanntem HLA-DPB1-Genotyp (Kimura et al., 1992) diente als Referenzmaterial (Tab. 1). Die Qualität der PCR-SSO-Methode wurde mit der Typisierung von insgesamt 22 DNA-Proben unbekanntem HLA-DPB1-Genotyps des International HLA DNA Exchange der University of California Los Angeles (DNA-Nr. 127 - 132, 139 - 144; Tissue Typing Laboratory UCLA, USA) und der Eurotransplant Tissue Typing Quality Control Exercises (DNA-Nr. 0701 - 0710; University of Leiden, Niederlande) getestet.

Tab. 1: HLA-DPB1-Genotyp der typisierten Referenz-Zelllinien (Kimura et al., 1992)

Name	DPB1	Name	DPB1	Name	DPB1
EHM	0401/0402	MOU	0201	CB6B	1901
DEM	0301/0401	DKB	0401	RML	0402
KAS011	0401/1401	L-BUF	1701	DUCAF	0202
RSH	0101/0402	WIN	0401/1301	QBL	0202
VAVY	0101	SAVC	1001	PLH	1501
BOLETH	0401	WT47	1601	COX	0301
KOSE	1301/0201	LUY	0101/0401	YAR	0401

3.2. Typisierung der HLA-DPB1-Allele

3.2.1. Prinzip der HLA-DPB1-Typisierung mittels PCR-SSO

In dieser Studie wurde eine PCR-SSO-Methode der HLA-DPB1-Typisierung in Anlehnung an das Protokoll des 11th International Histocompatibility Workshop (11th IHW) (Kimura und Sasazuki, 1992) entwickelt und für die Typisierung aller Probanden angewandt. Der erste Schritt dieser Methode bestand in der generischen Amplifikation des zweiten HLA-DPB1-Exons. Anschließend wurde je ein Amplifikat auf ein Feld einer mit einem 1 cm x 1 cm großen Raster versehenen Membran aufgetragen und fixiert. Pro Membran wurden die Amplifikate von 20 bis 60 Probanden aufgetragen und von jeder Membran wurden mindestens 24 Exemplare mit identischem Belegungsmuster hergestellt. Danach erfolgte die Hybridisierung von je einer Membran eines Belegungsmusters mit je einer von 24 SSO-Sonden deren Nukleotidsequenzen zu jeweils einer der Sequenzen der hypervariablen Regionen komplementär waren (Abschnitt 3.2.3.). Diese Sonden waren kovalent mit Digoxigenin (Dig) markiert. Als Hybridisierungslösung wurde Tetramethyl-ammoniumchlorid (TMAC) verwandt. Dabei hängt die spezifische Dissoziationstemperatur der SSO-Sonden nicht von der Zahl der Adenin–Thymin- und Guanin–Cytosin-Bindungen, sondern nur von der Oligonukleotidlänge ab (Wood et al., 1985). Die Detektion erfolgte in einer Farbreaktion, die nach Substratzusatz durch eine an Anti-Dig-Fab-Fragmente kovalent gebundene alkalische Phosphatase katalysiert wurde. Im Vergleich des Reaktionsmusters einer erfolgten Bindung - positive Reaktion - oder einer ausbleibenden Bindung - negative Reaktion - mit dem bekannten Reaktionsmuster der HLA-DPB1-Allele konnte auf den HLA-DPB1-Typ der amplifizierten DNA geschlossen werden.

3.2.2. Präparation der DNA

Die Extraktion chromosomaler DNA erfolgte durch Salzausfällung (Miller et al., 1988). Dabei werden die Zellen mittels Detergentien und Proteinasen lysiert und die freigesetzten Proteine in

einer gesättigten Salzlösung ausgefällt. Die DNA wird danach mit Isopropanol präzipitiert. Pro Proband wurden 10 ml Zitratblut für 5 min bei 2100 x g zentrifugiert, um die Leukozytenschicht (buffy coat) zwischen Plasma und Erythrozytensediment zu gewinnen. Alternativ konnten die leukozytenreichen Überstände nach Lymphozytenpräparation (Abschnitt 3.4.1.) direkt für die DNA-Präparation verwendet werden. In beiden Fällen wurde das gewonnene Material mit 45 ml 1 x RCLB (Red Cell Lysis Buffer: 10 mM Tris-Cl pH 7,6, Sigma, St. Louis, USA; 10 mM MgCl₂, Carl Roth, Karlsruhe; 10 mM NaCl, Merck, Darmstadt) resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 2100 x g). Dieser Schritt wurde wiederholt, bis sowohl Überstand als auch Leukozytensuspension optisch frei von Hämoglobin-Verunreinigungen waren. Für die Lyse der Leukozyten erfolgte die Resuspension in 200 µl 0,5 x RCLB, 50 µl Proteinase-K (Boehringer, Mannheim) und 30 µl 10% SDS (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) sowie die anschließende Inkubation für 60 min bei 60 °C. Daraufhin wurden 100 µl gesättigte 6 M NaCl Lösung zugeetzt, die Probe für 30 min bei 4 °C inkubiert und für 1 min bei 2100 x g zentrifugiert. Die Ausfällung der DNA aus dem gewonnenen Überstand erfolgte dann durch die Zugabe von 750 µl Isopropanol (Laborchemie, Apolda) und vorsichtiges Mischen. Nach der erneuten Zentrifugation (5 min, 2100 x g) wurde der Überstand dekantiert, das DNA-Pellet luftgetrocknet und danach in 200 µl ddH₂O (Braun, Melsungen) resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung konnte die DNA-Suspension bei -70 °C aufbewahrt werden. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte spektrophotometrisch (Ultraspec III, Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein). Bei einem Koeffizienten der Messwerte DNA/Protein > 1,8 wurde die Proteinverunreinigung als tolerabel erachtet und die DNA für die PCR eingesetzt.

3.2.3. Synthese der verwendeten Oligonukleotide und Dig-Markierung

Gemäß dem Protokoll des 11th IHW (Kimura und Sasazuki, 1992) erfolgte die generische Amplifikation des zweiten Exons des HLA-DPB1-Locus mit den Primern DPBAMP-A (GAG AGT GGC GCC TCC GCT CAT) und DPBAMP-B (GCC GGC CCA AAG CCC TCA CTC). Die gleiche Länge und der ähnliche Guanin-Cytosin-Gehalt resultieren in einer identischen Annealing-Temperatur beider Primer von 62 - 67°C. Die Sequenzen der verwendeten SSO-Sonden sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Sonden B0, B2 - B5 und F1 - F3 wurden neu entworfen, während die Sequenzen A1 - A4, B1 und C1 - E3 aus den Protokollen anderer Autoren (Kimura und Sasazuki, 1992; Tiercy et al., 1993) entnommen wurden. Die Synthese aller Oligonukleotide erfolgte nach der Zyanethyl-Phosphoramidit-Methode im 'short oligomer' Modus (Oligo 1000, Beckman, München) mit abschließender Detritylation entsprechend den Herstellerangaben. Für die Aufarbeitung der Syntheseprodukte wurde das Abspaltungs- und Entschützungskit (Beck-

man, München) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Durch eine Inkubation für 120 min in Ammoniumhydroxid und eine nachfolgende Inkubation für 90 min bei 70°C wurden die synthetisierten Oligonukleotide von der festen Trägerphase abgespalten und die Schutzgruppen von den N-Seitenketten der Basen entfernt. Anschließend wurden die Oligonukleotide vakuum-getrocknet (Univapo 100 H, UniEquip, Martinsried) und in 200 µl ddH₂O resuspendiert. Die Bestimmung der Konzentration der Oligonukleotide erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm. 100 pmol jeder SSO-Sonde wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll mit Digoxigenin-Di-deoxyuridin-triphosphat (Dig-ddUTP) markiert (Dig Oligonucleotide 3-End Labeling Kit, Boehringer, Mannheim). Die kovalente Bindung von Dig-ddUTP an das 3'-Ende der Sonde erfolgt dabei enzymatisch durch eine Terminale Transferase.

Tab. 2: SSO-Sonden; Nomenklatur (Nr.), Sequenz, Aminosäure (AS)-Position und Aminosäure (AS)-Sequenz der Hybridisierungsregion, Waschtemperatur (T_w) sowie Referenz (Ref.): Sequenzen (1) aus (Kimura und Sasazuki, 1992); (2) aus (Tiercy et al., 1993).

Nr.	Nukleotidsequenz 5' - 3'	AS- Position	AS-Sequenz	T_w (°C)	Ref.
A1	TCC CTG GAA AAG GTA ATT C	5 - 11	NYLFQG	65	(1)
A2	CG TAA CTG GTA CAC GTA AT	6 - 12	YVYQLR	63	(2)
A3	G CCG TCC CTG GTA CAC GTA	7 - 13	YVYQGR	63	(2)
A4	G CCG TAA CTG GTG CAC GTA	7 - 13	YVHQLR	63	(2)
B0	G CGC GTA CTC CTC CCG GTT	31 - 37	NREEYA	63	
B1	C GAA GCG CGC GAA CTC CTC	33 - 39	EEFARF	65	(2)
B2	AAC AGG CAG GAG TAC GCG C	31 - 37	NRQEYA	63	
B3	AAC CGG CAG GAG TAC GCG C	31 - 37	NRQEYA	63	
B4	GAG GAG TTC GTG CGC TTC	33 - 38	EEFVRF	65	
B5	GAG GAG CTC GTG CGC TTC	33 - 38	EELVRF	65	
C1	AGT ACT CCG CAG CAG GCC G	53 - 59	RPAAEY	65	(2)
C2	AGT ACT CCT CAT CAG GCC G	53 - 59	RPDGEY	65	(2)
C3	AGT ACT CCG CCT CAG GCC G	53 - 59	RPSAEY	63	(2)
C4	CCA GTA GTC CTC ATC AGG C	53 - 59	PDEDYW	65	(2)
D1	C TGC CCG CTT CTC CTC CAG	66 - 72	LEEKRA	65	(2)
D2	C TGC CCG CTC CTC CTC CAG	66 - 72	LEEERA	65	(2)
D3	CG CTT CTC CTC CAG GAG GTC	64 - 70	DLLEEKR	65	(1)
D4	C CTC CAG GAG GTC CTT CTG	62 - 68	QKDLLE	63	(2)
E1	G GAC AGG ATG TGC AGA CA	73 - 79	DRMCR	65	(1)
E2	G GAC AGG GTA TGC AGA CA	73 - 79	DRVCR	63	(1)
E3	G GAC AGG ATA TGC AGA CA	73 - 79	DRICR	63	(1)
F1	TG GGC GGG CCC ATG ACC CT	83 - 89	GGPMTL	65	
F2	TG GAC GAG GCC GTG ACC CT	83 - 89	DEAVTL	65	
F3	TG GTC GGG CCC ATG ACC CT	83 - 89	VGPMTL	63	

3.2.4. Amplifikation des zweiten HLA-DPB1-Exons und dot blot der Amplifikate

Die generische Amplifikation des zweiten HLA-DPB1-Exons erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz folgender Zusammensetzung:

- 200 µM dNTPs (Applied Biosystems, Weiterstadt),
- 1 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8,4, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % Gelatine, Perkin Elmer, Norwalk, USA),
- 300 - 1000 ng DNA,
- 0,25 - 0,35 µM Primer DPBAMP-A/DPBAMP-B,
- 2 - 3 U Taq-Polymerase (AGS, Heidelberg).

Da die Amplifikation auf einem Thermocycler ohne beheizten Deckel (Trio-Thermoblock, Biometra, Berlin) erfolgte, wurde pro Reaktionsansatz eine Deckölschicht von 50 µl Paraffinöl (Berlin Chemie, Berlin) als Verdunstungsschutz aufgetragen. Ein Ansatz ohne DNA diente als Negativkontrolle, um eine DNA-Kontamination auszuschließen. Nach initialer Denaturierung bei 95 °C für 5 min und Abkühlung auf 4 °C wurde die Taq-DNA-Polymerase zugegeben. Die Amplifikation erfolgte dann in 33 Zyklen folgenden Programms: Denaturierung bei 95 °C für 60 s, Annealing bei 65 °C für 45 s, DNA-Synthese bei 72 °C für 60 s und abschließende Synthese nach Durchlauf der 33 Zyklen bei 72 °C für 5 min. Die PCR mit den Primern DPBAMP-A und DPBAMP-B liefert ein Amplifikationsprodukt von 327 bp Länge. Die Kontrolle der Amplifikation erfolgte mittels Elektrophorese in mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid gefärbtem 3%-Agarose-Gel (Agarose N, Pharmacia, Freiburg) in 1 x TBE (0,09 M Tris-Base, Fluka, Buchs, Schweiz; 0,09 M Borsäure, Pharmacia, Uppsala, Schweden; 2 mM EDTA, Roth, Karlsruhe, pH 8,3). 8 µl Amplifikat wurden mit 6 µl einer 20%-Bromphenolblau-0,1%-Ethidiumbromid-Ficoll-Lösung (Bromphenolblau, Merck, Darmstadt; Ethidiumbromid, Serva Feinbiochemica, Heidelberg; Ficoll, Pharmacia, Freiburg) gemischt und pro Gelkavität aufgetragen. Nach der Elektrophorese bei 100 mV über 20 min in 1 x TBE in einer horizontalen Elektrophoresekammer erfolgte die Beurteilung des Gels unter UV-Licht (Transilluminator, MWG Biotech, Ebersberg). Wenn eine homogene Bande mit erwarteter Wanderungsgeschwindigkeit vorlag und sich gleichzeitig in der Negativkontrolle keine Amplifikat-Banden darstellten, konnte das Amplifikationsprodukt für die SSO-Hybridisierung verwendet werden. Hierfür wurden die Amplifikate bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend auf 4 °C gekühlt, um eine Renaturierung auszuschließen. Nach Zugabe von 50 µl Chloroform (Berlin Chemie, Berlin) wurden 1 µl Amplifikat pro Rasterfeld einer 20 - 60 cm² großen, mit einem 1 cm x 1 cm messenden Raster versehenen Nylon Membran (Boehringer, Mannheim) manuell pipettiert (dot blot). Ein Rasterfeld dien-

te der Nummerierung der Membran und in einem weiteren Feld wurde ein Dig-markiertes Oligonukleotid (Dig-ddUTP labeled Oligonucleotide, Boehringer, Mannheim) als Detektions-Kontrolle aufgetragen. Es wurden mindestens 24 Membranen identischen Belegungsmusters vorbereitet. Für jede PCR-SSO Membran wurde DNA der B-lymphoblastoiden Zelllinien MOU, DKB, WIN, SAVC, DUCAF, PLH, COX und VAVY (Kimura et al., 1992) amplifiziert und aufgetragen. Nach vollzogenem Transfer und Lufttrocknung der Membranen erfolgte die Fixierung der DNA durch UV-Vernetzung mit 120 – 200 mJ für 5 min.

3.2.5. Hybridisierung der Dig-SSO-Sonden

Die Hybridisierung wurde in verschraubbaren 38 mm x 150 mm Glasgefäßen (Biometra, Berlin) im Hybridisierungssofen (OV5, Biometra, Berlin) bei ständiger Rotation durchgeführt. Das nachfolgende Protokoll bezieht sich auf eine Membranfläche von ca. 30 cm². Die Prähybridisierung der Membranen erfolgte bei 52 °C für 1 h in 5 ml TMAC-Hybridisierungslösung (3 M TMAC, Merck, Darmstadt; 50 mM Tris, pH 8,0, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA). Anschließend wurde pro Membran eine Dig-SSO-Sonde in einer Endkonzentration von 2 nM zugesetzt und bei 46 °C für 70 min hybridisiert. Nach dem kurzen Spülen in 2 x SSPE-Puffer (0,1 % SDS, 20 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,4) erfolgte das spezifische Waschen der Membranen im vorgewärmten Hybridisierungssofen für 20 min in 7,5 ml TMAC-Lösung bei der für die jeweilige Sonde spezifischen Temperatur (Tab. 2). Nach zweimaligem Spülen mit Puffer I (0,2 M Tris, 0,3 M NaCl, pH 7,5) erfolgte eine Inkubation mit 5 ml 10 % Blockierungs-Lösung (in Puffer I gelöste Blockingreagens, Boehringer, Mannheim) für 30 min bei 21 °C zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Nach dem Zusatz von 4 U/ml Anti-Dig-Fab-AP-Konjugat (Boehringer, Mannheim) wurden die Membranen erneut für 30 min bei 21 °C inkubiert und anschließend jeweils zweimal in Puffer I und Puffer II (0,1 M MgCl₂, 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris, pH 9,5) gewaschen. Für die abschließende Farbreaktion wurden je 1,3 µmol 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (Boehringer, Mannheim) als Substrat in je 32 µl Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) gelöst und mit 4 ml Puffer II verdünnt. Die Membranen wurden dann in Plastikfolie verschweißt und unter Luft- und Lichtabschluss bei 21 °C über 2 - 24 h mit der Substratlösung inkubiert. Die Qualität der Farbreaktion konnte anhand der Detektions-Kontrolle überprüft werden. Nach 15, 30, 60 und 120 min sowie bei beginnender unspezifischer Hintergrundreaktion der Referenz-DNA war dann eine Auswertung der Membranen möglich. Diese wurden danach aus der Substratlösung entnommen, mit Leitungswasser gewaschen und für die nachträgliche Dokumentation kopiert.

3.2.6. Auswertung

Anhand der Detektions-Kontrolle konnte eine Aussage über die Bindung der Fab-Fragmente sowie über die Qualität der Farbreaktion getroffen werden. Das Ausmaß der unspezifischen Bindung wurde anhand der Referenz-DNA beurteilt, deren bekannte Basensequenz in den hypervariablen Regionen (Kimura et al., 1992) ein Abschätzen der Zahl der Basenfehlpaarungen erlaubt. Bei positiver Detektions-Kontrolle und maximal einer Basenfehlpaarung wurden die Membranen ausgewertet. Anderenfalls erfolgte eine erneute Hybridisierung einer Membran gleichen Belegungsmusters mit der betreffenden Sonde bei geänderter Wasch-Temperatur. Die HLA-DPB1-Spezifität jeder Probe wurde durch den Vergleich der positiven Reaktionen der Probe mit dem bekannten Reaktionsmuster der einzelnen Allele (Tab. 3) bestimmt. Eine Homozygotie konnte dann angenommen werden, wenn alle positiven Reaktionen durch ein einziges Allel erklärbar waren. Im Falle einer Heterozygotie wurden anhand von Tabelle 3 alle Allele identifiziert, deren Reaktionsmuster durch die positiven Reaktionen der Probe erklärbar waren. Die Probe wurde als positiv für die beiden Allele typisiert, deren kombiniertes Reaktionsmuster alle positiven Reaktionen der Probe eindeutig erklärte. So ist z. B. für das Reaktionsmuster A1, A2, B0, B4, C1, C2, D1, D2, E1, E3, F1 und F2 ein Vorliegen der Allele HLA-DPB1*0201, -DPB1*0402, -DPB1*1301, -DPB1*1601, -DPB1*2301, -DPB1*26011, -DPB1*2701, -DPB1*3201, -DPB1*3901, und -DPB1*4101 möglich (Tab. 3). Im diploiden Genom können jedoch in einer Probe maximal zwei HLA-DPB1 Allele vorliegen. Im dargestellten Fall erklärt nur die Kombination HLA-DPB1*0402/DPB1*1301 alle positiven Reaktionen, während z. B. die Kombination HLA-DPB1*0201/DPB1*1301 die Reaktion mit D1 nicht erklärt.

3.3. Typisierung weiterer HLA-Klasse-I- und -II-Merkmale mittels PCR-SSP

Die molekulargenetische Typisierung der HLA-A-, -B-, -Cw-, -DRB1/3/4/5- und -DQB1-Merkmale erfolgte mit kommerziellen PCR-SSP-Verfahren. Zur Anwendung kamen für die Klasse-I-Typisierung die niedrigauflösenden ('low resolution') Primer-Kits Dynal HLA-A, -B, -C (Deutsche Dynal, Hamburg) und CTS HLA-A, -B, -C (Universität Heidelberg). Für die Klasse-II-Typisierung wurden die niedrigauflösenden Primer-Kits HLA-DRB1/DQB1 der Firmen BAG (BAG, Lich) und OneLambda (OneLambda, Conaga, USA) sowie die hochauflösenden ('high resolution') Primer-Kits Dynal HLA-DRB1/3/4/5 und -DQB1 (Deutsche Dynal, Hamburg) verwendet. Die Typisierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. In den Tabellen 4 und 5 sind die in dieser Arbeit mit PCR-SSP typisierten HLA-Klasse-I- und -II-Merkmale aufgeführt. Das nachfolgend kurz dargestellte Protokoll orientiert sich am Beispiel der Dynal-Primer-Kits.

Tab. 3: Hybridisierungsschema der HLA-DPB1 Allele *0101 - *4501 und *5901 mit den verwendeten 24 SSO-Sonden.

HLA-DPB1*	SSO-Sonden																							
	A 1	A 2	A 3	A 4	B 0	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	C 1	C 2	C 3	C 4	D 1	D 2	D 3	D 4	E 1	E 2	E 3	F 1	F 2	F 3
0101			+		+						+				+					+				+
0201	+								+			+				+				+			+	
0202	+									+			+				+			+			+	
0301		+							+					+	+		+	+		+				+
0401	+					+					+				+				+			+		
0402	+								+			+			+				+			+		
0501	+								+			+			+				+			+		+
0601		+							+				+		+			+	+					+
0801	+								+			+			+				+			+		+
0901					+				+					+	+				+			+		+
1001					+				+			+			+				+			+		+
11011		+						+			+							+	+				+	+
11012		+					+				+							+	+				+	+
1301		+			+						+				+						+		+	+
1401				+					+					+	+		+	+		+				+
1501			+					+			+						+	+		+				+
1601	+								+			+				+			+				+	+
1701				+					+					+		+			+				+	+
1801			+						+			+			+			+		+			+	+
1901	+								+				+		+		+				+		+	+
2001		+							+				+	+		+	+	+	+			+		+
2101		+							+			+			+		+		+				+	+
2201	+								+			+			+		+		+				+	+
2301	+								+		+				+		+		+				+	+
2401	+				+				+				+		+		+		+			+		+
2501		+							+			+			+		+	+		+			+	+
26011		+			+				+			+			+		+	+		+			+	+
26012		+			+				+			+			+		+		+			+	+	+
2701		+			+				+			+			+		+		+			+	+	+
2801	+					+			+			+			+		+	+	+				+	+
2901		+							+				+		+		+	+	+				+	+
3001				+					+			+			+		+	+	+				+	+
3101	+					+			+		+				+		+	+	+				+	+
3201	+								+						+		+	+	+			+	+	+
3301	+					+			+		+				+		+	+	+			+	+	+
3401	+								+	+					+		+	+	+				+	+
3501				+					+				+	+			+	+	+				+	+
3601		+							+			+			+		+		+			+	+	+
3701		+							+		+				+		+		+			+	+	+
3801	+								+			+			+		+		+				+	+
3901	+				+				+		+				+		+		+			+	+	+
4001	+				+				+		+				+		+		+			+	+	+
4101	+								+		+				+		+		+			+	+	+
4401		+							+				+		+		+		+			+	+	+
4501				+					+		+				+		+	+	+			+	+	+
5901	+								+		+				+		+	+	+			+	+	+

Entsprechend der Zahl an Primer-Sets pro Kit wurden für eine Typisierung die äquivalente Zahl an Reaktionsansätzen vorbereitet. Je 5 µl Mastermix, bestehend aus 3 µl PCR-Lösung (dNTPs, MgCl₂ und PCR-Puffer in optimaler Konzentration), 100 ng DNA, 0,4 U Taq-Polymerase und ddH₂O ad 5 µl sowie 5 µl des jeweiligen Primermixes wurden in einem dünnwandigen 0,2-ml-PCR-Reaktionsgefäß (Biozyme Diagnostic, Hess. Oldendorf) gemischt. Die Amplifikation erfolgte auf einem GenAmp 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterbach) nach folgendem Programm: Denaturierung bei 94°C für 2 min, anschließend 10 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 10 sec, Annealing und Synthese jeweils bei 65 °C für 1 min, gefolgt von 20 Zyk-

len mit Denaturierung bei 94 °C für 10 sec, Annealing bei 61 °C für 50 sec, Synthese bei 72 °C für 30 sec. Für die Auswertung wurde das Amplifikat analog zur HLA-DPB1-Typisierung mittels Elektrophorese in Ethidiumbromid gefärbtem Agarose Gel dargestellt (Abschnitt 3.2.4.). Als Positivkontrolle enthielt jedes der Primer-Sets zusätzlich ein Paar generischer Primer. Somit stellten sich bei positiver Reaktion zwei Banden dar, hingegen lag bei negativer Reaktion nur die Bande der Positivkontrolle vor.

Tab. 4: PCR-SSP typisierte HLA-Klasse-I-Merkmale.

HLA-A		HLA-B				HLA-Cw	
*1	*29	*51	*75	*54	*46	*01	*14
*2	*30	*52	*76	*55	*47	*02	*15
*3	*31	*7	*77	*56	*48	*03	*16
*23	*32	*8	*38	*27	*53	*04	*17
*24	*33	*44	*39	*35	*59	*05	*18
*25	*74	*45	*57	*37	*67	*06	
*26	*28	*13	*58	*60	*71	*07	
*34	*36	*14	*18	*61	*72	*08	
*66	*80	*62	*49	*41	*73	*12	
*11		*63	*50	*42	*78	*13	

Tab. 5: PCR-SSP typisierte HLA-Klasse-II-Allele. Allele mit fortlaufender Nummer sind zusammengefasst.

HLA-DRB1		HLA-DRB3/4/5		HLA-DQB1
*0101-0104	*1301-1329	3*0101	5*0101	*0501-0504
*1501-1506	*1401-1417	3*0201-0202	5*0102	*0601-0604
*1601-1608	*0701	3*0202	5*0202	*0201-0202
*0301-0309	*0801-0813	3*0301	5*0203	*0301-0304
*0401-0424	*0901			*0401-0402
*1101-1130	*1001	4*0101-0103		
*1201-1204				

3.4. Serologische HLA-Typisierung

Die im folgenden kurz dargestellte serologische Typisierung der HLA-A-, -B- und -DR-Merkmale erfolgte mittels des zweistufigen MLCT nach Terasaki und McClelland (Terasaki und McClelland, 1964) gemäß des standardisierten NIH-Protokolls.

3.4.1. Präparation von Lymphozyten des peripheren Blutes

Die Gewinnung von Lymphozyten erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation (Boyum, 1968). Deren Prinzip besteht in der Separation von Zellen entsprechend ihrer Größe und Dichte durch die Zentrifugation in einem Gradientenmedium. In der Interphase zwischen Plasma und Gradientenflüssigkeit reichert sich eine mononukleäre Zellpopulation an, die bei gesunden Blutspendern zu 90 - 99 % aus Lymphozyten besteht. Es wurden 10 ml venöses Zitratblut 1 : 2 mit 1 x PBS (Sifin, Berlin) verdünnt. Nach dem Übersichten auf Gradientenmedium (Lymphoprep, Biotest, Dreireich) im Verhältnis 3 : 2 erfolgte die Zentrifugation bei 1050 x g für 20 min. Die Zellschicht der Interphase wurde aufgenommen, in 1 x PBS resuspendiert, bei 125 x g für 10 min gewaschen und in 200 µl 1 x PBS resuspendiert. Für die Beurteilung der Zellvitalität und -konzentration wurde 1 µl Zellsuspension mit 2 µl 0,003-%-Acridinorange-0,01-%-Ethidiumbromid-1-%-EDTA-1-x-PBS Lösung (Acridinorange, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) versetzt und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die Suspension wurde dann mit 1 x PBS auf $2 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und direkt für die HLA-Klasse-I-Typisierung oder für die Anreicherung von B-Lymphozyten eingesetzt. Die Separation der B-Lymphozyten erfolgte mittels ferromagnetischer Anti-HLA-DR-Antikörper (HLA Class II⁺ Dynabeads, Dynal, Oslo, Norwegen) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurden die Lymphozyten mit 100 µl Class II⁺ Dynabeads in 10-%-Na-Zitrat-PBS bei 4 °C für 4 min inkubiert. Danach wurde die Probe im Permanentmagneten platziert, unter Belassen im Magneten dekantiert und außerhalb des Magnetfeldes in 1 x PBS resuspendiert. Nach Wiederholung dieses Separationsschrittes erfolgte die Vitalitätskontrolle und Einstellung der Zellkonzentration analog zur Lymphozytenpräparation nach Dichtezentrifugation.

3.4.2. Typisierung der HLA-Klasse-I- und -II-Antigene

Für die Bestimmung der HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Antigene kamen kommerzielle Typisierungskits zur Anwendung. Dabei handelt es sich um Mikrotestkammern, in deren Kavitäten je ein Anti-HLA-Antiserum pro Kavität unter einer Deckölschicht vorgetropft ist. Jede Kammer enthält ein nicht-zytotoxisches humanes AB-Serum als Negativkontrolle sowie ein multispezifisches Anti-Lymphozytenserum als Positivkontrolle. Für die HLA-Klasse-I-Typisierung wurden die Kammern BAG ABC 144 (BAG, Lich), Italia 144 (Biotest, Dreireich) und BmT-C (One Lambda, Krefeld) verwendet. Die HLA-Klasse-II-Typisierung erfolgte mit den Kammern BAG DR72 (BAG, Lich), Biotest DR72 (Biotest, Dreireich) und MDR72 (OneLambda, Krefeld). Pro Kavität wurden 1 µl Lymphozytensuspension zugesetzt. Nach einer Inkubation für 30 min bei 22 °C erfolgte die Zugabe von 5 µl Kaninchenkomplement pro Kavität (Eigenher-

stellung, Pool aus 200 Tieren). Nach erneuter Inkubation für 60 min bei 22 °C wurden dann pro Kavität 2 µl 0,003%-Acridinorange-0,01%-Ethidiumbromid-1%-EDTA-1-x-PBS Lösung zugesetzt und die Kammern für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Abschließend wurde je Kavität 1 µl Hämolyt als Kontrastmittel (Hämopath, Pharma, Dessau) zugegeben. Die Beurteilung der Reaktionen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop bei 510 nm (Lambda Scan TM Plus II, BmT, Krefeld). Lysierte Zellen stellten sich durch den Kernfarbstoff Ethidiumbromid rot fluoreszierend dar (positive Reaktion); vitale Zellen erschienen dagegen durch die pinozytotische Anfärbung mit Acridinorange grün (negative Reaktion). Anhand der Negativkontrolle (max. 10 % lysierte Zellen) wurde der Anteil unspezifisch lysierter Zellen beurteilt. Die Positivkontrolle mit einer erwartungsgemäßen Lyse von 80 - 100 % aller Lymphozyten erlaubte eine Aussage über den Anreicherungsgrad der Lymphozytensuspension sowie die Komplementaktivität. Die Bewertung der Reaktion erfolgte anhand des in Tabelle 6 dargestellten Schemas. Die Bestimmung des vorliegenden HLA-Merkmales wurde anhand des vom Hersteller vorgegebenen Belegungsmusters der jeweiligen Kammer vorgenommen. Die serologische Typisierung ermöglichte die Unterscheidung der in Tabelle 7 aufgeführten Merkmale.

Tab. 6: Schema der Bewertung der Reaktionsstärken im MLCT

% lysierte Zellen	0 – 10	> 10 - 20	> 20 - 40	> 40 - 80	> 80 - 100	?
Wertung	negativ	fraglich negativ	fraglich positiv	positiv	stark positiv	nicht ablesbar

Tab. 7: Serologisch typisierte HLA-Klasse-I- und -II-Antigene. Die supertypischen Merkmale HLA-Bw4, -Bw6 sowie die Merkmale HLA-DR51/52/53 wurden nicht zugeordnet.

HLA-A		HLA-B			HLA-DR	
1	11	5	17	41	1	9
2	19	7	18	47	2	10
3	28	8	21	53	3	
9	36	12	22		4	
10		13	27		5	
		14	35		6	51
		15	37	w4	7	52
		16	40	w6	8	53

3.5. Qualitätskontrolle und statistische Auswertung

Die verwendeten kommerziellen Typisierungsverfahren kamen im Routinebetrieb des Interdisziplinären HLA-Labors der Martin-Luther-Universität zur Anwendung. Im Rahmen der Ringversuche des Institutes für Standardisierung und Dokumentation in medizinischen Laboratorien e. V. Düsseldorf (Instand e. V.), der Eurotransplant Tissue Typing Quality Control Exercises und des International HLA DNA Exchange, University of California Los Angeles erfolgte während des Untersuchungszeitraumes eine regelmäßige, zertifizierte Qualitätssicherung.

Grundlage der statistischen Auswertung war die 2 x 2 Felder-Tafel (Tab. 8). Diese enthält die Anzahl von Probanden, die für das jeweilige Merkmal positiv oder negativ typisiert wurden. Konnte nur ein Merkmal pro Genlocus identifiziert werden, wurde das Vorliegen einer Homozygotie angenommen, das Merkmal aber nur einmal gezählt. Die Analyse der Homozygotien erfolgte ebenfalls anhand der 2 x 2 Felder Tafel.

Tab. 8: 2 x 2 Felder-Tafel. a, b, c, d = Anzahl der für das Merkmal positiv bzw. negativ typisierten Probanden ohne Berücksichtigung einer Homozygotie.

	Merkmal-positiv	Merkmal-negativ	Σ
Patienten	a	b	U
Kontrollen	c	d	V
Σ	Y	Z	N (= a + b + c + d)

Die Phänotypfrequenz (pf) eines Antigens oder Allels wurde nach der Formel (1) errechnet.

$$pf_{\text{Patienten}} = a/U \times 100 \quad \text{bzw.} \quad pf_{\text{Kontrollen}} = c/V \times 100 \quad (1)$$

Die Genotypfrequenz (gf) wurde in Annahme der Gültigkeit des Hardy-Weinberg Gesetzes (Mattiuz et al., 1970) nach Formel (2) berechnet.

$$gf = 1 - \sqrt{1 - pf} \quad (2)$$

Unter gleicher Annahme konnte die erwartete Homozygotenfrequenz für ein Allel aus der beobachteten Genfrequenz berechnet werden [Formel (3)].

$$gf_{\text{Homozygotie erwartet}} = (gf_{\text{Allel}})^2 \quad (3)$$

Die Stärke der Assoziation eines HLA-Merkmals mit einer Krankheit wird durch das Relative Risiko (RR) ausgedrückt und nach der Formel (4) oder nach der von Haldane (Tiwari und Terasaki, 1985) modifizierten Formel (5) berechnet.

$$RR = \frac{a \times c}{b \times d} \quad (4) \quad \text{oder (wenn } a = 0 \text{ oder } b = 0) \quad RR = \frac{(2a + 1) \times (2c + 1)}{(2b + 1) \times (2d + 1)} \quad (5)$$

Die Testung der statistischen Signifikanz einer Assoziation erfolgte mittels des χ^2 -Testes mit Yates Korrektur [Formel (6)].

$$\chi^2 = \frac{(|ad - bc| - 1/2N)^2}{Y \times Z \times U \times V} N \quad (6)$$

Wenn eine der Variablen der 2 x 2 Felder-Tafel einen Wert < 5 annahm, wurde p durch den Fisher's exact Test (Tiwari und Terasaki, 1985) berechnet (SPSS 8.00, 1998, Chicago, USA). Eine Assoziation mit einem p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Bei Vergleich der Gruppen hinsichtlich mehrerer Merkmale können zufällig signifikante Assoziationen auftreten (Tiwari und Terasaki, 1985). Daher wurden die p-Werte jener Merkmale, für die bisher keine Assoziation mit der CLL bekannt war, mit der Zahl der insgesamt untersuchten Merkmale des jeweiligen Genlocus multipliziert (Korrektur für multiple Vergleiche - p_{MV} ; HLA-A: 15, -B: 28, -Cw: 14, -DR: 13, -DRB1: 32, -DRB3: 4, -DRB4: 4, -DRB5: 4, -DQ: 7, -DQB1 15, -DPB1: 20). Da keine Familientypisierung der untersuchten Probanden erfolgte, war eine Analyse der Haplotypenfrequenz nicht möglich. Um eine Aussage über die Häufigkeit der Kombinationen bestimmter Allele zu erhalten, erfolgte die Analyse dieser Kombinationen mittels der Formeln zur Haplotypanalyse. Im weiteren wird daher der Begriff Haplotyp synonym für Kombinationen von Allelen verwendet, wenn diese zu verschiedenen Loci gehören. Die Berechnung der Haplotypenfrequenz (hf) erfolgte nach der Methode von Mittal (Mittal, 1976). Anhand der Maximumlikelihood Methode (Mattiuz et al., 1970; Yasuda, 1978) konnte dann der Δ -Wert nach Formel (7) berechnet werden.

$$\Delta_{1/2} = hf_{1/2} - gf_1 \times gf_2 \quad (7)$$

Da der absolute Δ -Wert keinen Vergleich der Kopplungsungleichgewichte erlaubt, wurde zusätzlich Δ_{rel} (Baur und Danilovs, 1980) ermittelt. Ein $\Delta_{rel} = 1$ liegt dann vor, wenn Allel 1 stets gemeinsam mit Allel 2 auftritt. Der Test der statistischen Signifikanz einer beobachteten Kopplung erfolgte mittels χ^2 -Test (Imanishi et al., 1992).

4. Ergebnisse

4.1. Testung und Optimierung der HLA-DPB1-Typisierungsmethode

Erstes Ziel der Arbeit war es, ein für die Routineanwendung geeignetes PCR-SSO-Verfahren für die HLA-DPB1-Typisierung zu entwickeln. Zunächst erfolgte die Optimierung der kritischen Parameter dieser Methode.

4.1.1. Effizienz der PCR-Amplifikation

Die Ausgangsbedingungen für die generische PCR entsprachen jenen des Protokolls des 11th IHW (Kimura und Sasazuki, 1992). Abweichend vom Referenzprotokoll wurden die Proben vor Zugabe der Taq-Polymerase für 5 Minuten denaturiert, um den Anteil einsträngiger DNA zu Reaktionsbeginn und somit die Ausbeute der Reaktion zu erhöhen. Die vom Hersteller angegebene $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5 mM wurde beibehalten. Das gerätespezifische Heizprofil des verwendeten Thermocyclers erforderte eine Denaturierungsdauer von 60 s. Gegenüber dem Referenzprotokoll wurde ein um drei Zyklen verlängertes Programm von 33 Zyklen gewählt, um eine größere Amplifikatmenge zu erzielen.

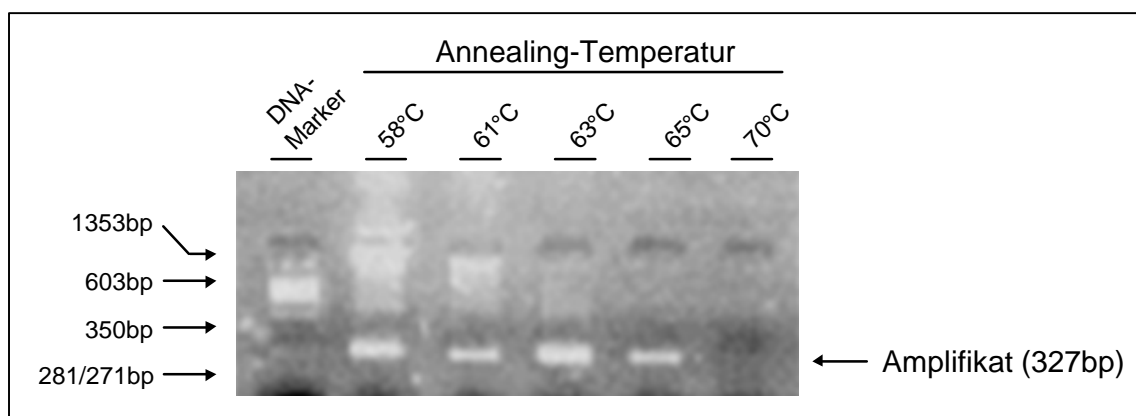


Abb. 5.: Elektrophorese nach PCR mit den Primern DPBAMP-A/-B bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen; übrige Reaktionsbedingungen gemäß Material und Methoden. Angegeben ist die Lokalisation des Amplifikates (327 bp) sowie der Molekulargewichtsmarker. Auf die Darstellung der Negativkontrolle wurde verzichtet.

Für die Primer DPBAMP-A und DPBAMP-B empfiehlt das Referenzprotokoll eine Annealing-Temperatur von 61 - 66 °C (Kimura und Sasazuki, 1992). Die Ergebnisse der Amplifikation bei verschiedenen Annealing-Temperaturen sind in Abbildung 5 dargestellt. Bei einer Temperatur von < 63 °C traten Doppelbanden als Zeichen einer unspezifischen Amplifikation auf. Eine Temperatur > 65 °C resultierte in einer geringeren Amplifikatmenge mit deutlich schwächeren

Banden. Ein Annealing bei 65 °C für 45 s erwies sich als optimal. Diese Optimierungen resultierten in einer höheren Amplifikationsausbeute, so dass im Vergleich zu anderen Protokollen ein geringeres Amplifikatvolumen von 1 µl pro Membran aufgetragen werden konnte.

4.1.2. Spezifität der SSO-Hybridisierung

Die Sequenzen von acht der verwendeten SSO-Sonden (B0, B2 - B5, F1 - F3) wurden gegenüber den Referenzprotokollen (Kimura und Sasazuki, 1992; Tiercy et al., 1993) neu entworfen, um eine genauere Typisierung der wachsenden Zahl von HLA-DPB1-Allelen zu ermöglichen. Mittels dieser Sonden ist eine zuverlässigere Typisierung der Allele HLA-DPB1*0101 (B0), -*0202 und -*0501 (B4, B5), -*0201, -*0202, -*0401, -*0402, -*1501 (F1 - F3) im Falle einer HLA-DPB1-Heterozygotie möglich. Alle verwendeten Sonden besaßen eine Länge von 18 bis 20 Nukleotiden und es ergab sich somit bei Verwendung von TMAC als Hybridisierungslösung eine identische optimale Dissoziationstemperatur für alle Sonden.

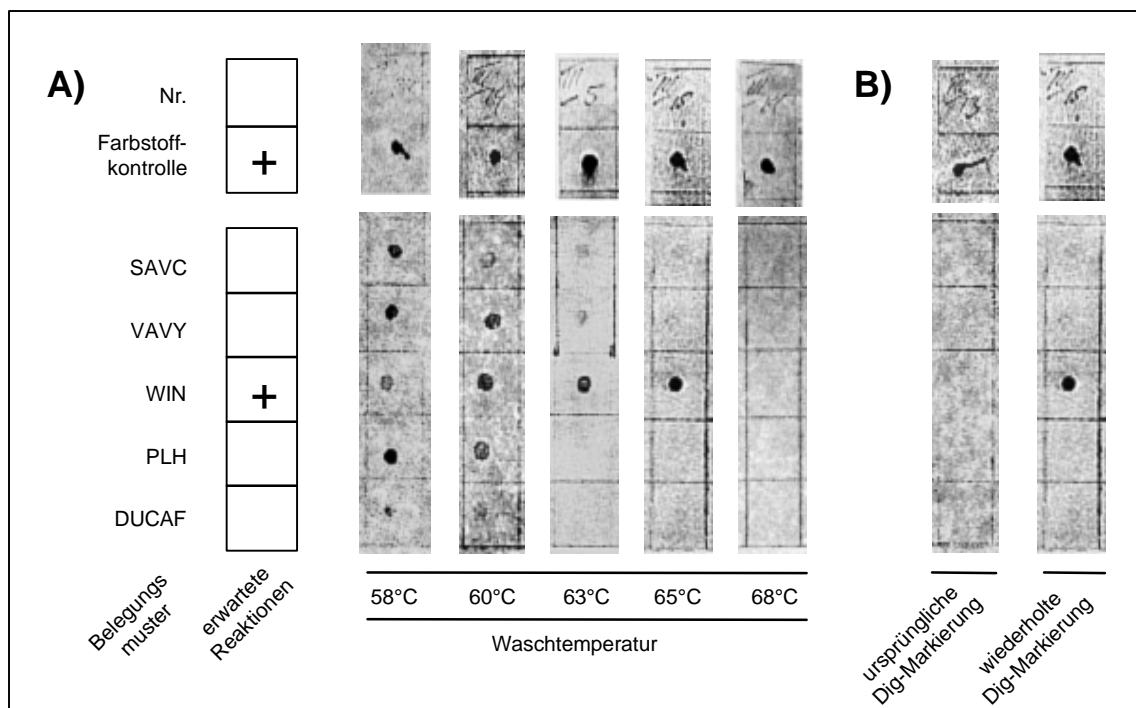


Abb. 6: Einfluss der Waschtemperatur und der Dig-Markierung auf das Typisierungsergebnis.

A) Membranen identischen Belegungsmusters (Referenz-DNA; Abschnitt 3.1.) wurden mit der Sonde B1 hybridisiert und bei unterschiedlichen Temperaturen gewaschen. **B)** Membranen gleichen Belegungsmusters wurden mit der in unterschiedlichen Reaktionen Digoxigenin-markierten Sonde B1 hybridisiert (Waschtemperatur 65°C). Übrige Reaktionsbedingungen gemäß Material und Methoden. (Temperaturangaben beziehen sich auf die verwendeten Hybridisierungsöfen.)

Zunächst wurde eine Temperatur des spezifischen Waschschrittes von 58 – 60 °C gemäß der Referenzmethoden (Kimura und Sasazuki, 1992; Tiercy et al., 1993) zugrunde gelegt. Trotz optimaler PCR traten bei der Typisierung von Referenz-DNA falsch positive und falsch negative Resultate auf. Erst mit einer Erhöhung der Temperatur auf 63 - 65 °C konnte eine unspezifische Bindung vermieden werden (Abb. 6 A). Damit musste eine Temperatureinstellung gewählt werden, die um 5 – 7 °C über den Angaben der Referenzprotokolle lag. Messungen ergaben, dass bei Inkubation in dem auf 63 °C eingestellten Hybridisierungsöfen die Temperatur der TMAC-Lösung in den Glashybridisierungsgefäßen jedoch erst nach ca. 15 min einen Wert von 59 - 60 °C erreicht hatte (Daten nicht gezeigt). Infolge dieses Heizprofils des Hybridisierungsöfens wurde auch eine höhere Temperatur von 46 °C bzw. 52 °C für die Hybridisierung bzw. Prähybridisierung gewählt. Anhand der Referenz-DNA wurde dann das Ausmaß der unspezifischen Bindung beurteilt. Traten falsch positive Reaktionen bei Referenzproben auf, die sich in mehr als einem Nukleotid von der Sequenz der Sonde unterschieden, wurde eine Membran des gleichen Belegungsmusters bei einer um 1 - 1,5 °C höheren Waschtemperatur mit dieser Sonde erneut hybridisiert.

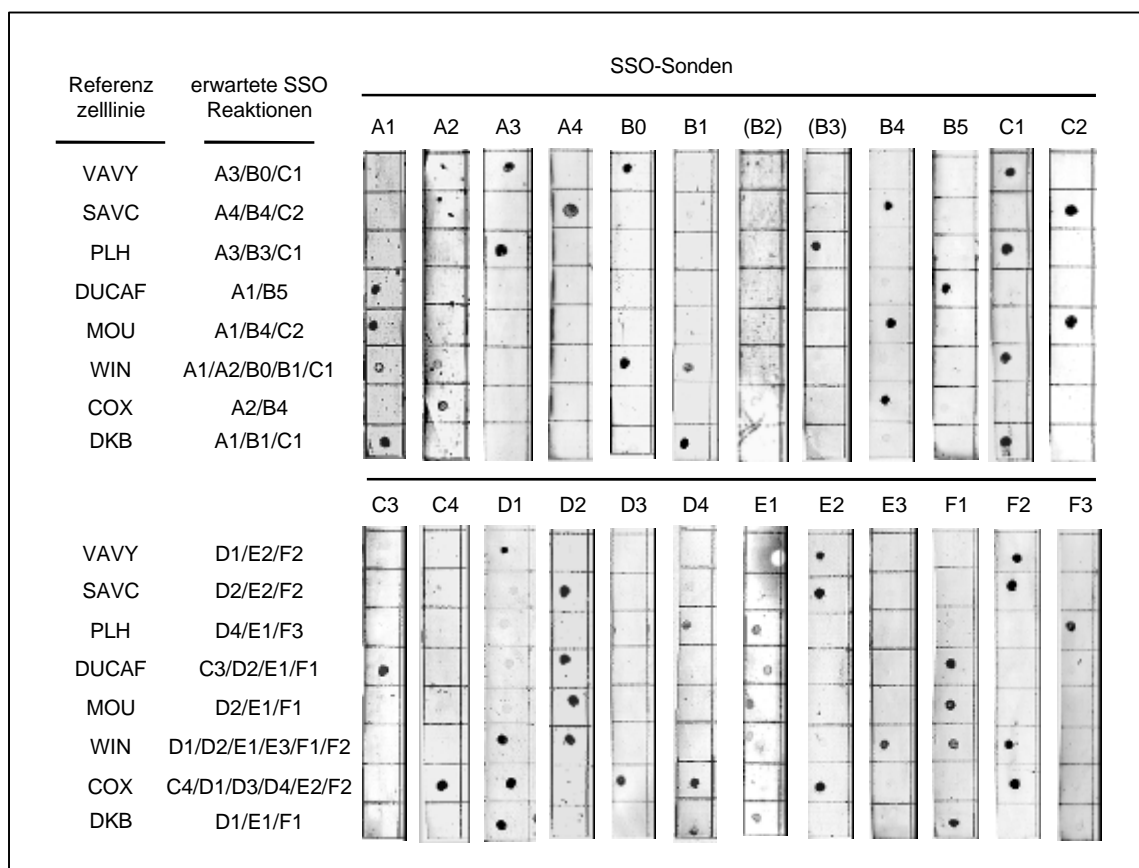


Abb. 7: HLA-DPB1-Typisierung von 8 lymphoblastoiden B-Zelllinien mit den verwendeten 22 (24) SSO-Sonden. Typisierung gemäß Material und Methoden. Die Sonden B2 und B3 wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt.

Hinsichtlich der nur bei bestimmten Sonden auftretenden falsch negativen Reaktionen hatten Veränderungen der Hybridisierungs- und Waschbedingungen keinen Effekt. Die Farbreaktion, die durch das auf der Membran fixierte Dig-Oligonukleotid kontrolliert wurde, war stets positiv. Erst eine erneute Dig-Markierung dieser Sonden erbrachte eindeutige Resultate ohne falsch negative Reaktionen (Abb. 6 B). Diese Beobachtung deutete auf eine nicht vollständige Dig-Markierung der Sonde in der ursprünglichen Markierungsreaktion hin. Nicht markierte Sonden besetzten während der Hybridisierung Amplifikatbindungsstellen ohne den Anti-Dig-AP-Fab-Fragmenten als Epitop zu dienen. Für die Sonden B2 und B3 standen keine positiven Referenzproben zur Verfügung, so dass eine Optimierung der Reaktionsbedingungen für diese Sonden nicht möglich war. Sie wurden daher mit einer Waschtemperatur von 65 °C eingesetzt und nur unter Vorbehalt ausgewertet. Wie in Abbildung 7 dargestellt, ermöglichte die Optimierung der Methode eine eindeutige Typisierung von Referenz-DNA.

4.1.3. Aussagekraft der PCR-SSO-Methode und Typisierung von Referenz-DNA

In theoretischen Vorüberlegungen wurde die Aussagekraft der entwickelten PCR-SSO-Methode abgeschätzt. Aufgrund fehlender Referenzproben für die Testung der Sonden B2 und B3 konnten nur 22 SSO-Sonden für eine zuverlässige HLA-DPB1-Typisierung ausgewertet werden. Mit diesen Sonden ließen sich von den 1993 bei Beginn der Studie bekannten 58 HLA-DPB1-Allelen 54 Allele eindeutig definieren (Bodmer et al., 1997). Infolge fehlender Referenz-DNA war eine hochauflösende Typisierung der Allele HLA-DPB1*0101 (*01011/*01012), -DPB1*1101 (*11011/*11012), und -DPB1*2001 (*20011/ 20012) nicht möglich. Auf eine theoretisch mögliche Differenzierung der Allele HLA-DPB1*02012 und -DPB1*02013 wurde analog zu anderen Untersuchungen (Eiermann et al., 1991) verzichtet. Ebenfalls erlaubten die verwendeten Sonden keine Unterscheidung der häufigen Allele HLA-DPB1*0201 bzw. -DPB1*0501 von den seltenen Allelen HLA-DPB1*4101 bzw. -DPB1*3801. HLA-DPB1*0201 und -DPB1*4101 unterscheiden sich durch einen Austausch von Isoleucin durch Phenylalanin an der Aminosäureposition 65 am 3'-Ende der hypervariablen Region D (Abb. 4). HLA-DPB1*0501 und -DPB1*3801 hingegen unterscheiden sich in der zwischen den Regionen A und B befindlichen Position 16 durch den Austausch von Alanin durch Prolin. Da auch keine HLA-DPB1*3801- bzw. -DPB1*4101-positive Referenz-DNA zur Verfügung stand, um eine spezifische Sonde zu testen, wurden in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (May et al., 1998; Rani et al., 1995) alle Proben, deren Reaktionsmuster nur durch HLA-DPB1*0201 oder -DPB1*4101 bzw. HLA-DPB1*0501 oder -DPB1*3801 erklärt werden konnten, als positiv für HLA-DPB1*0201 bzw. HLA-DPB1*0501 typisiert. Weiterhin war eine Unterscheidung von heterozygoten Kombinationen verschiedener Allele nicht möglich (Tab. 9). Bei der zweiten

Kombination handelte es sich stets um eine Kombination seltener Allele für die keine Referenz-DNA zur Verfügung stand. Daher wurden diese Proben gemäß anderen Studien (May et al., 1998) als positiv für die häufigere Kombination typisiert.

Tab. 9: Heterozygote HLA-DPB1-Kombinationen die mittels PCR-SSO nicht eindeutig zu differenzieren waren. Kombination I - Kombination häufiger Allele; Kombination II - die von Kombination I nicht unterscheidbare Kombination seltener Allele.

Kombination I HLA-DPB1	Kombination II HLA-DPB1	Kombination I HLA-DPB1	Kombination II HLA-DPB1
*0401/*0901	*3301/*3501	*0201/*1001	*1001/*3201, *1001/*3401
*0301/*2601	*2001/*2901	*0301/*1001	*1401/*3701, *0901/*2501, *2901/*4501
*0401/*0201	*0402/*3301		
*0401/*0402	*2301/*5101	*0301/*0501	*0301/*3801
*0201/*0301	*2501/*4601	*0801/*1701	*0901/*1601

Tab. 10: Ergebnisse der HLA-DPB1-Typisierung von Referenz-DNA des International HLA DNA Exchange (Nr. 127 - 132 und 139 - 144) sowie der Eurotransplant Tissue Typing Quality Control Exercises (Nr. 0701 - 0710). Angegeben sind die mittels PCR-SSO eindeutig identifizierten Allele sowie die Referenzbefunde.

Nr.	PCR-SSO Typisierung HLA-DPB1	Referenzresultat HLA-DPB1	Nr.	PCR-SSO Typisierung HLA-DPB1	Referenzresultat HLA-DPB1
127	*0101/*0201	*0101/*0201	0701	*0201/*0401	*0201/*0401
128	*1801/*4001	*1801/*4001	0702	*0301	*0301/*0301
129	*1801/*4001	*1801/*4001	0703	*0101/*0401	*0101/*0401
130	*0601/*0402	*0601/*0402	0704	*0301/*0402	*0301/*0402
131	*0301/*0201	*0301/*0201	0705	*0201/*0401	*0201/*0401
132	*0201/*1301	*0201/*1301	0706	*0201/*0401	*0201/*0401
139	*0301/*0201	*0301/*0201	0707	*0401/*0901	*0401/*0901
140	*0201/*0202	*0201/*0202	0708	*0201	*0201/*0201
141	*0401	*0401/*0401	0709	*0301/*0401	*0301/*0401
142	*0402/*1101	*0402/*1101	0710	*0201/*0402	*0201/*0402
143	*0301/*0401	*0301/*0401			
144	*0301	*0301/*0301			

Nach der Optimierung der Methode wurden in drei getrennten Ansätzen insgesamt 22 DNA-Proben unbekanntem HLA-DPB1-Genotypes im Rahmen der Eurotransplant Tissue Typing Quality Control Exercises (Proben-Nr. 0701 - 0710) und des International HLA DNA Exchange

(Proben-Nr. 127 - 132 und 139 - 144) typisiert. Die Ergebnisse (Tab. 10) zeigen, dass es die Qualität der entwickelten Methode rechtfertigt, für den Fall, dass alle positiven Reaktionen durch ein Allel eindeutig erklärbar waren, eine Homozygotie für dieses Allel anzunehmen. Nachfolgend wurden daher Probanden, bei denen eindeutig nur ein Allel vorlag, als homozygot für dieses Allel typisiert. Die Ergebnisse demonstrierten weiterhin, dass diese PCR-SSO-Methode eine zuverlässige Typisierung auch seltener Allele wie z. B. HLA-DPB1*4001 erlaubt.

4.2. Verteilung der HLA-DPB1-Allele bei gesunden kaukasoiden Probanden

4.2.1. HLA-DPB1-Normalverteilung in der Bevölkerung Sachsen-Anhalts

Die Frequenz der HLA-DPB1-Allele in der Gruppe gesunder kaukasoider Probanden aus Sachsen-Anhalt ist in Tabelle 11 aufgeführt und mit der Verteilung in anderen deutschen Kontrollpopulationen verglichen. Das häufigste Allel in der untersuchten Kontrollgruppe war HLA-DPB1*0401, gefolgt von HLA-DPB1*0201, -DPB1*0402, -DPB1*0301 und -DPB1*0101. Diese Häufigkeitsrangfolge ist identisch mit der von Mella et al. beobachteten Verteilung (Mella et al., 1995). Für das Allel HLA-DPB1*0301 ergab sich ein Unterschied zu der Untersuchung von Ferencik und Grosse-Wilde (Ferencik und Grosse-Wilde, 1998). Dieses Allel trat sowohl in der Kontrollgruppe aus Sachsen-Anhalt, als auch in der Gruppe von Mella et al. mit einer phänotypischen Frequenz von ca. 12 % auf, während Ferencik und Grosse-Wilde eine Frequenz von 22,4 % beobachteten. Die Verteilung aller anderen HLA-DPB1-Allele in der Probandengruppe aus Sachsen-Anhalt entsprach der in den Vergleichsstudien. Mehrere Unterschiede fanden sich im Vergleich zu den Ergebnissen von Seidl et al. (Seidl et al., 1997). Die in dieser Studie gegenüber den Kontrollgruppen aus Sachsen-Anhalt und von Mella et al. deutlich erhöhte Frequenz des Allels HLA-DPB1*0301 entsprach eher den Beobachtungen von Ferencik und Grosse-Wilde. Das seltene Auftreten des Allels HLA-DPB1*0201 hingegen widersprach sowohl der Verteilung in der Population aus Sachsen-Anhalt als auch in den anderen Studien. Obwohl durch diesen Vergleich deutlich wurde, dass sich die HLA-DPB1-Allelverteilung in der Probandengruppe aus Sachsen-Anhalt nicht generell von jener in anderen deutschen Kontrollgruppen unterschied, sollte die Relevanz der Unterschiede in den Frequenzen einzelner Allele wie z. B. HLA-DPB1*0301 analysiert werden. Hierfür wurde die Probandengruppe aus Sachsen-Anhalt mit kaukasoiden Kontrollpopulationen aus Nordirland (Savage et al., 1992), Frankreich (al-Daccak et al., 1991), Deutschland (Eiermann et al., 1991; Rihs et al., 1996) und Nordamerika (Baisch und Capra, 1993) verglichen (Abb. 8). Häufigstes Allel war in allen Untersuchungen HLA-DPB1*0401 mit einer phänotypischen Frequenz von 60 - 70 %. Die Allele HLA-DPB1*0201, -DPB1*0301, und -DPB1*0402 wurden übereinstimmend mit einer Frequenz von jeweils 10 - 30 % beobachtet. HLA-DPB1*0101 fand sich in 10 - 15 % aller Probanden. Alle

anderen Allele traten in der Mehrheit der Studien mit Frequenzen < 10 % auf. Auffällig war die relativ hohe Varianz der Frequenzen von HLA-DPB1*0301 und -DPB1*0401 in den verglichenen Untersuchungen.

Tab. 11: Verteilung der HLA-DPB1-Allele bei kaukasoiden Probanden aus Sachsen-Anhalt und in anderen deutschen kaukasoiden Kontrollgruppen. Zahl (n) und phänotypische Frequenz (pf in %) gemäß den Angaben der Autoren. k. A. - keine Angabe; # die Summe aller Homozygotien wurde berechnet (= 2N - Σ aller gezählten Allele).

HLA-DPB1	Kontrollen Sachsen-Anhalt (n = 157)		Ferencik und Grosse-Wilde 1998 (n = 174)	Mella et al. 1995 (n = 47)	Seidl et al. 1997 (n = 135)
	n	pf (%)	pf (%)	pf (%)	pf (%)
*0101	16	10,19	10,34	8,51	20,00
*0201	43	27,39	28,16	25,53	2,96
*0202	1	0,64	2,87	0,00	1,48
*0301	18	11,46	22,41	12,77	28,89
*0401	108	68,79	62,64	72,34	72,59
*0402	36	22,93	18,39	19,15	29,63
*0501	9	5,73	6,90	6,38	2,22
*0601	4	2,55	0,57	2,13	0,74
*0801	0	0,00	k. A.	0,00	2,22
*0901	3	1,91	2,30	0,00	1,48
*1001	8	5,10	1,15	2,13	2,22
*1101	6	3,82	1,15	2,13	2,22
*1301	6	3,82	4,60	6,38	5,19
*1401	1	0,64	2,87	4,26	11,11
*1501	7	4,46	1,15	0,00	0,74
*1601	3	1,91	1,15	2,13	0,00
*1701	7	4,46	2,87	4,26	0,00
*1801	0	0,00	k. A.	0,00	0,00
*1901	2	1,27	0,57	4,26	1,48
andere	0	0,00	4,02	k. A.	5,19
blank	0	0,00	k. A.	k. A.	k. A.
Homozygote	36	22,93	k. A. (25,86) [#]	k. A. (27,66) [#]	k. A. (9,63) [#]

Die dargestellten Vergleiche demonstrierten, dass die HLA-DPB1-Allelverteilung in der Kontrollgruppe aus Sachsen-Anhalt mit der Verteilung in anderen kaukasoiden Bevölkerungen übereinstimmt. Andererseits zeigte die Varianz in den Frequenzen einzelner Allele, dass die Typisierung einer lokalen Kontrollgruppe für die Untersuchung einer Krankheitsassoziation von HLA-DPB1 in lokalen Patientengruppen notwendig ist.

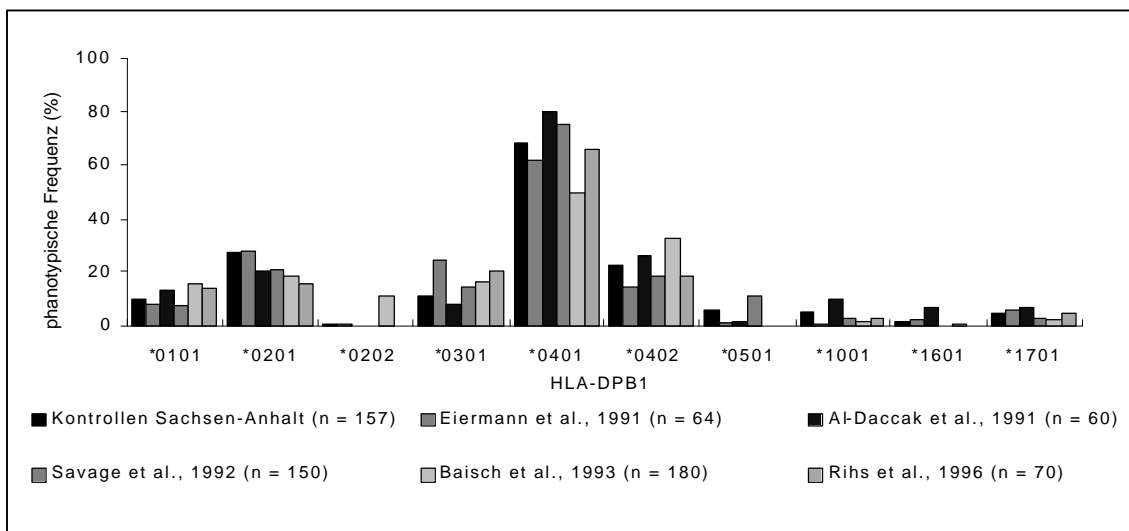


Abb. 8: Phänotypische HLA-DPB1-Frequenzen bei kaukasoiden Kontrollprobanden aus Sachsen-Anhalt sowie aus Europa und Nordamerika. Aufgeführt sind die 10 häufigsten Allele mit einer durchschnittlichen phänotypischen Frequenz > 10 %.

4.2.2. HLA-DPB1-Allelverteilung bei gesunden IgA-Mangel-Probanden

Die HLA-DPB1-Verteilung in den Gruppen der gesunden IgA-Mangel-Probanden und der Kontrollen ist in Abbildung 9 verglichen.

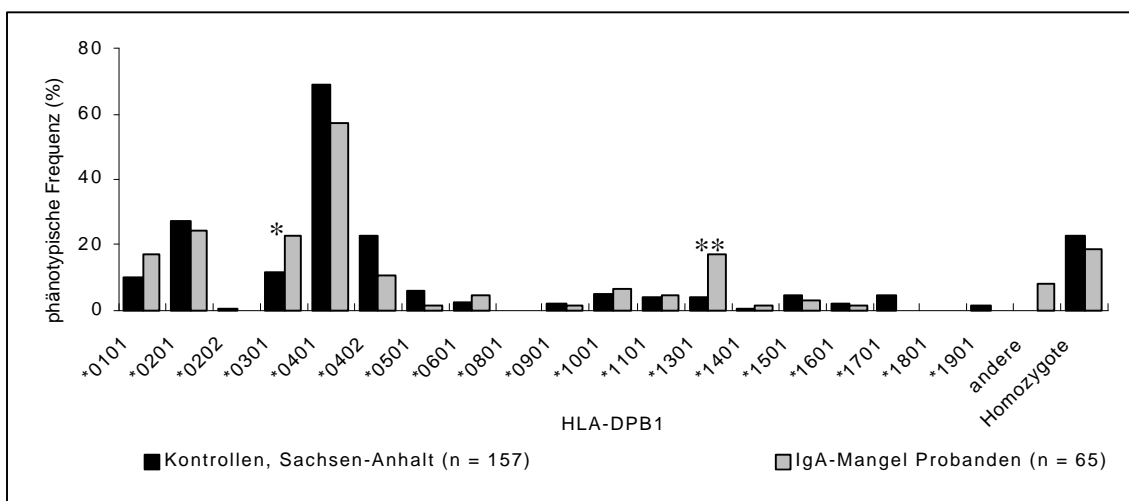


Abb. 9: Phänotypische HLA-DPB1-Frequenzen bei IgA-Mangel-Probanden und Kontrollen aus Sachsen-Anhalt. Die Allele HLA-DPB1*2001, -DPB1*2301, -DPB1*2601, -DPB1*2701 und -DPB1*5901 sind unter 'andere' zusammengefasst. * - $p < 0,05$; ** - $p_{MV} < 0,05$.

In beiden Gruppen trat das Allel HLA-DPB1*0401 am häufigsten auf, gefolgt von -DPB1*0201. Auffällige Frequenzunterschiede wurden für die Allele HLA-DPB1*0301 ($p = 0,05$) und -DPB1*1301 ($p = 0,002$) beobachtet. Der Frequenzunterschied für das Allel HLA-DPB1*1301 war auch nach Korrektur für multiple Vergleiche signifikant ($p_{MV} < 0.05$). Die seltenen Allele HLA-DPB1*2001, -DPB1*2301, -DPB1*2601 und -DPB1*2701 fanden sich ausschließlich in der Gruppe der IgA-Mangel-Probanden. Während bei allen Kontrollprobanden eine eindeutige Typisierung möglich war, konnte der HLA-DPB1-Genotyp eines IgA-Mangel-Probanden mit dem SSO-Reaktionsmuster A1, B4, C2, D1 - D4, E1 und F1 nicht eindeutig durch die bekannten Allele oder Allelkombinationen erklärt werden. Erst eine erneute Auswertung unter Berücksichtigung der bis 1997 neu beschriebenen HLA-DPB1-Allele zeigte, dass bei diesem Probanden das erst vor kurzem beschriebene Allel HLA-DPB1*5901 in Kombination mit -DPB1*0201 vorlag (Bodmer et al., 1997; Noble et al., 1996).

4.3. Assoziation der CLL mit HLA-DPB1-Allelen und HLA-DPB1-Aminosäuresequenzen

Die Ergebnisse der HLA-DPB1-Typisierung in der Gruppe der CLL-Patienten sowie des Vergleiches mit der Kontrollgruppe sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Insgesamt fand sich unter CLL-Patienten eine zur Normalverteilung ähnliche HLA-DPB1-Verteilung. Häufigstes Allel war in beiden Gruppen HLA-DPB1*0401, gefolgt von HLA-DPB1*0201 und -DPB1*0402. Die seltenen Allele HLA-DPB1*2301, -DPB1*3501 und -DPB1*4501 traten nur in der Gruppe der CLL-Patienten auf. Für eine niedrigere Frequenz von HLA-DPB1*01 bei CLL Patienten, wie es eine serologische Untersuchung von Pawelec et al. aus dem Jahre 1989 andeutete (Pawelec et al., 1989), fand sich kein Anhalt. Auffällig war dagegen eine Erhöhung der Frequenz des Allels HLA-DPB1*0301 unter den Patienten ($RR = 2,15$, $p = 0,04$). Allerdings verlor dieser Unterschied seine Signifikanz bei Korrektur für multiple Vergleiche.

Für den Insulin-abhängigen-Diabetes-Mellitus (IDDM) ist eine Assoziation mit dem Auftreten einer neutralen Aminosäure an Position 57 des HLA-DQ β -Moleküls bekannt (Todd et al., 1988). Die Methode der PCR-SSO ermöglicht direkte Aussagen über die Basensequenzen und somit auch über die Aminosäuresequenz in den für die immunologische Funktion entscheidenden hypervariablen Regionen des HLA-DP β -Moleküls. Der beobachtete Frequenzunterschied war daher Anlass zur Analyse struktureller Besonderheiten der HLA-DPB1*0301-spezifischen Aminosäuresequenz. Hierzu wurde die Häufigkeit der HLA-DPB1*0301-typischen Aminosäuresequenzen in den Gruppen der CLL-Patienten und der Kontrollen verglichen (Tab. 13). Das Allel HLA-DPB1*0301 unterscheidet sich in den Sequenzen der hypervariablen Regionen B, E

und F nicht von vielen anderen HLA-DPB1-Allelen. Dagegen ist dieses Allel in den Regionen A, C und D durch Sequenzen charakterisiert, die sich sonst nur bei unter kaukasoiden Probanden seltenen HLA-DPB1-Allelen finden (Abb. 4). Folgerichtig traten unter CLL-Patienten häufiger Allele auf, bei denen die Sequenz für Glutamat an Position 57 in der Zone C durch jene für Aspartat ersetzt ist. Dieser Unterschied war auf Position 57 beschränkt, da in beiden Gruppen ein ähnlicher Anteil von Allelen vorlag, die anstatt für Alanin an Position 55 und 56 für Aspartat bzw. Glutamat kodieren. Weiterhin war unter Patienten der Anteil von jenen Allelen erhöht, deren Basensequenz an Position 65 (Region D) für Isoleucin anstatt Leucin sowie gleichzeitig an Position 69 für die basische Aminosäure Lysin anstatt der neutralen Aminosäure Glycin kodiert. Ebenfalls fand sich unter CLL-Patienten eine erhöhte Frequenz an Homozygotien für eine Glycin-kodierende Basensequenz an Position 11 (Region A). Keiner dieser Unterschiede behielt seine Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche bei.

Tab. 12: Verteilung der HLA-DPB1-Allele bei CLL-Patienten im Vergleich zur Normalverteilung. Anzahl (n) und phänotypische Frequenz (pf in %) der hinsichtlich des angegebenen Allels positiv typisierten Probanden.

HLA-DPB1	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf (%)	n	pf (%)	
*0101	10	9,90	16	10,19	0,040
*0201	25	24,75	43	27,39	
*0202	0	0,00	1	0,64	
*0301	22	21,78	18	11,46	
*0401	68	67,33	108	68,79	
*0402	23	22,77	36	22,93	
*0501	2	1,98	9	5,73	
*0601	2	1,98	4	2,55	
*0901	3	2,97	3	1,91	
*1001	1	0,99	8	5,10	
*1101	2	1,98	6	3,82	
*1301	5	4,95	6	3,82	
*1401	2	1,98	1	0,64	
*1501	0	0,00	7	4,46	
*1601	0	0,00	3	1,91	
*1701	6	5,94	7	4,46	
*1901	1	0,99	2	1,27	
*2301	2	1,98	0	0,00	
*3501	1	0,99	0	0,00	
*4501	1	0,99	0	0,00	
Homozygote	26	25,74	35	22,29	

Tab. 13: Frequenzen ausgewählter HLA-DP β 1-Aminosäuresequenzen unter CLL Patienten und Kontrollen. Zahl (n) und phänotypische Frequenz (pf in %) der für die Sequenz positiven Probanden bzw. homozygoten Probanden. Die spezifischen Aminosäuren sind *kursiv* hervorgehoben.

Aminosäure- position	Aminosäure- sequenz	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
		n	pf (%)	n	pf (%)	
9 + 11	<i>VYQLR</i>	30	29,7	33	21,0	0,02
	<i>VYQLR</i> Homoz.	5	5,0	2	1,3	
11	<i>V~QLR</i>	42	41,6	52	33,1	
	<i>V~QLR</i> Homoz.	8	7,9	2	1,3	
55 - 57	<i>PDEDY</i>	35	34,7	33	21,0	
	<i>PDEDY</i> Homoz.	5	5,0	1	0,6	
55 + 56	<i>PDE~Y</i>	73	72,3	110	70,1	
	<i>PDE~Y</i> Homoz.	20	19,8	20	12,7	
65	<i>DLL</i>	28	27,7	32	20,4	
	<i>DLL</i> Homoz.	4	4,0	1	0,6	
69	<i>EKR</i>	95	94,1	146	93,0	
	<i>EKR</i> Homoz.	50	49,5	72	45,9	
65 + 69	<i>DLLEKR</i>	25	24,8	19	12,1	
	<i>DLLEKR</i> Homoz.	4	4,0	1	0,6	

4.4. Verteilung weiterer HLA-Klasse-I- und -II-Merkmale bei CLL-Patienten

Für die im Rahmen der Untersuchung der HLA-DPB1-Allelverteilung typisierten 101 CLL-Patienten und 157 Kontrollprobanden erfolgte weiterhin sowohl eine serologische HLA-A-, -B- und -DR-Typisierung, als auch die molekulargenetische, niedrigauflösende HLA-A-, -B- und -Cw- sowie hochauflösende -DRB1/3/4/5- und -DQB1-Typisierung.

4.4.1. HLA-A-, -B- und -DR-Antigene

In früheren Untersuchungen waren für verschiedene serologisch typisierte HLA-Merkmale Assoziationen mit der CLL beschrieben worden. Wie in Tabelle 14 gezeigt, konnte für keines der betreffenden Merkmale in dieser Studie eine Assoziation bestätigt werden. Insgesamt fand sich zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Frequenzunterschied für die HLA-A-, -B- und -DR-Antigene (Anlage, Tab. 1 und 2). Die seltenen Antigene HLA-B47 und -B53 wurden nur in der Kontrollgruppe gefunden.

Tab. 14: Verteilung ausgewählter HLA-Antigene unter CLL-Patienten und Kontrollprobanden für die in anderen Untersuchungen eine Assoziation mit der CLL beschrieben wurde. Zahl (n) und phänotypische Frequenz (pf in %) der hinsichtlich des angegebenen Merkmals positiven typisierten Probanden.

HLA-	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p	Referenz
	n	pf (%)	n	pf (%)		
A1	25	24,8	50	31,9	ns	(Kilpatrick et al., 1984)
A2	60	59,4	76	48,4	ns	(Dyer et al., 1986)
A28	4	4,0	18	11,5	ns	
B8	18	17,8	34	21,7	ns	(Kilpatrick et al., 1984)
B18	13	12,9	12	7,6	ns	(Richter et al., 1973)
B35	10	9,9	29	18,5	ns (> 0.08)	(Cuttner et al., 1994)
Cw6	33	32,7	38	24,2	ns	(Linnet et al., 1988)
DR4	30	29,7	36	22,9	ns	
DR5	25	24,8	45	28,7	ns	(Winchester et al., 1983)
DR51	27	26,7	35	22,3	ns	
DR52	61	60,4	111	70,7	ns	
DR53	54	53,5	73	46,5	ns	(Dorak et al., 1996)

4.4.2. HLA-A-, -B-, -Cw-, -DRB1/3/4/5- und -DQB1-Merkmale

In den Tabellen 15 und 16 sind die Frequenzen ausgewählter, molekulargenetisch typisierter HLA-Merkmale in der Patienten- und Kontrollgruppe dargestellt. Für die niedrigauflösend typisierten HLA-A-, -B- und -Cw-Merkmale wurden in beiden Gruppen nahezu ähnliche Frequenzen beobachtet (Anlage, Tab. 3 und 4). Die Unterschiede in der Verteilung der Merkmale HLA-A*28, -A*33 und HLA-B*38 waren nicht signifikant (Tab. 15). Obwohl die Frequenz von HLA-A*3 in beiden Gruppen der typischen kaukasoiden Verteilung entsprach, wurde eine Homozygotie für dieses Merkmal bei 3 CLL-Patienten, aber bei keinem der Kontrollprobanden gefunden (4,0 % vs. 0,0 %, RR = 14,5, p = 0,02). Der Vergleich zwischen der zu erwartenden und der beobachteten HLA-A*3 Homozygotiefrequenz bei Patienten ($pf_{erw} = 4,5\%$ vs. $pf = 4,0\%$) und Kontrollen ($pf_{erw} = 3,7\%$ vs. $pf = 0,0\%$) demonstrierte eine in der Kontrollgruppe verringerte HLA-A3-Homozygotiefrequenz.

Mehrere Unterschiede wurden für HLA-DRB- und -DQB1-Allele beobachtet (Tab. 16). Es fand sich bei Patienten eine Frequenzerhöhung für das Allel HLA-DRB1*0401 (RR = 2,13, p = 0,03) die ihre statistische Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche allerdings verlor. Weiterhin wurde eine statistisch nicht signifikante Verringerung der Frequenz des Allels HLA-

DRB1*1301 innerhalb der Patientengruppe beobachtet. Bei der Analyse der HLA-DRB3/4/5-Merkmale war die auch nach Korrektur für multiple Vergleiche signifikante Erhöhung der Frequenz des Allels HLA-DRB4*0103 in der Gruppe der CLL-Patienten ($RR = 2,74$, $p = 0,003$, $p_{MV} < 0,05$) auffällig. Da die Frequenzerhöhung des zugehörigen supertypischen Merkmals HLA-DRB4 (HLA-DR53) nicht signifikant war (53,5 % vs. 46,5 %; Tab. 14), handelte es sich um eine für HLA-DRB4*0103 spezifische Differenz. Bestätigt wurde diese Hypothese durch die signifikante Erhöhung der Frequenz von HLA-DRB4*0103 in der Gruppe der HLA-DRB4-positiven Patienten gegenüber den HLA-DRB4-positiven Kontrollen (53,6 % vs. 28,8 %, $RR = 2,86$, $p = 0,008$, $p_{MV} < 0,05$; Abb. 10). Für HLA-DRB4*0101 wurde unter Patienten eine niedrigere Frequenz beobachtet, ohne dass dieser Unterschied signifikant ausfiel.

Tab. 15: Verteilung ausgewählter molekulargenetisch typisierter HLA-Klasse-I-Merkmale. Zahl (n) und phänotypische Frequenz (pf in %) der hinsichtlich des angegebenen Allels positiv typisierten Probanden.

HLA	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf (%)	n	pf (%)	
-A*03	28	27,72	40	25,48	
-A*33	5	4,95	2	1,27	0,1
-A*28	4	3,96	18	11,46	0,06
-B*62	19	18,81	24	15,29	
-B*38	2	1,98	12	7,64	0,09
-B*55	0	0,00	5	3,18	0,2
-B*35	10	9,90	29	18,47	0,09
-Cw*03	31	30,69	40	25,48	
-Cw*07	57	56,44	78	49,68	

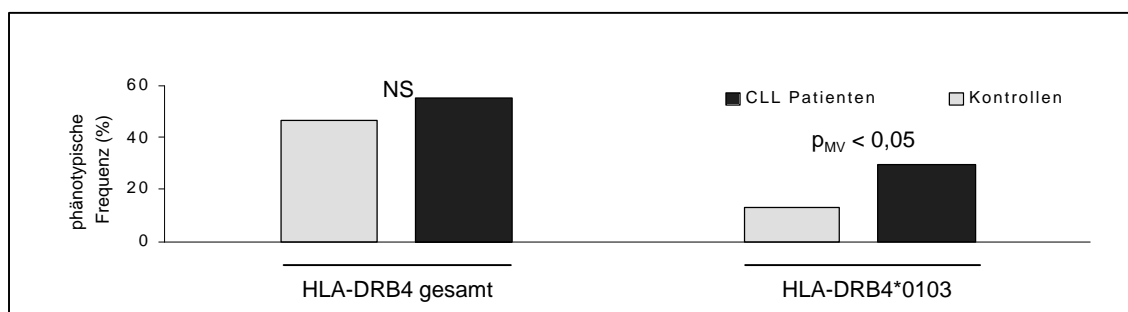


Abb. 10: Phänotypischer Anteil der HLA-DRB4- und HLA-DRB4*0103-positiven Probanden in den Gesamtgruppen der CLL-Patienten und Kontrollen.

Die Patienten- und Kontrollgruppe unterschieden sich ebenfalls in der Frequenz mehrerer HLA-DQB1-Allele (Tab. 16). Der Unterschied mit der geringsten Irrtumswahrscheinlichkeit betraf das Allel HLA-DQB1*0202, dessen Frequenz unter CLL-Patienten verringert war (RR = 0,27, $p = 0,02$). Eine kompensatorische, nicht signifikante Frequenzerhöhung fand sich nur für einige der anderen HLA-DQB1-Allele. Stattdessen trat das Allel HLA-DQB1*0302 in der Patientengruppe mit deutlich erhöhter Frequenz auf (RR = 2,03, $p = 0,03$). Beide Unterschiede verloren jedoch ihre Signifikanz bei Korrektur für multiple Vergleiche. Auffällig war weiterhin eine Erhöhung der Zahl der HLA-DQB1-Homozygoten unter den Patienten (RR = 2,62, $p = 0,02$), ohne dass signifikante Unterschiede für die Homozygotiefrequenz einzelner Allele beobachtet wurden. Die Methode der PCR-SSP erlaubte im Gegensatz zur PCR-SSO keine Aussagen über die Basensequenz zwischen den Primerregionen. Eine Analyse der Assoziationen der CLL mit spezifischen Aminosäuresequenzen außerhalb der Primerregion der CLL-assoziierten HLA-DRB- und -DQB1-Allele wurde daher nicht durchgeführt.

Tab. 16: Verteilung ausgewählter HLA-DRB- und -DQB1-Allele. Zahl (n) und phänotypische Frequenz (pf in %) der hinsichtlich des Allels positiv typisierten Probanden.
** = $p_{MV} < 0,05$.

HLA-	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf (%)	n	pf (%)	
DRB1*0401	25	24,75	21	13,38	0,03
DRB1*0701	28	27,72	44	28,03	
DRB1*1301	12	11,88	34	21,66	
DRB1* Homoz.	12	11,88	10	6,37	0,07
DRB 4*0101	26	25,74	51	32,48	
DRB4*0102	0	0,00	1	0,64	
DRB4*0103	30	29,70	21	13,38	
DRB3(52) Homoz.	20	19,80	35	22,29	
DRB3* Homoz.	11	10,89	16	10,19	
DRB4(53) Homoz.	10	9,90	10	6,37	
DRB4* Homoz.	8	7,92	10	6,67	
DRB5(51) Homoz.	3	3,0	2	1,27	
DRB5* Homoz.	3	2,97	2	1,27	
DQB1*0201	34	33,66	45	28,66	0,02
DQB1*0202	4	3,96	21	13,38	
DQB1*0301	32	31,68	63	40,13	
DQB1*0302	28	27,72	25	15,92	
DQB1* Homoz.	18	17,82	12	7,64	

4.4.3. Kopplungsungleichgewichte der HLA-DPB1-Allele sowie CLL-assoziiertes HLA-Allele

In Tabelle 17 sind Kombinationen der HLA-DPB1-Allele aufgeführt, für die in der vorliegenden Studie in mindestens einer der beiden untersuchten Gruppen ein auch nach Korrektur signifikantes Kopplungsungleichgewicht beobachtet wurde. Dies betraf insbesondere die Kombinationen HLA-DRB1*0301:DPB1*0101, -DQB1*0201:DPB1*0101, -B*8:DPB1*0101 und -Cw*07:DPB1*0101. Allerdings fanden sich diese Kombinationen ausschließlich unter Kontrollen signifikant häufiger als theoretisch erwartet. Unter CLL-Patienten lag nur für die Kombination HLA-DRB1*0701:DPB1*1701 eine signifikante Kopplung vor. Bemerkenswert war weiterhin, dass für keine der Kombinationen ein signifikanter Unterschied der phänotypischen Frequenzen zwischen beiden Gruppen bestand, d. h. keine der Kombinationen war positiv oder negativ mit der CLL assoziiert. Interessant war gleichfalls, dass diese Kopplungsungleichgewichte ausschließlich die HLA-DPB1-Allele -*0101 und -*1701 betrafen.

Tab. 17: Zwei-Locus-Allelkombinationen ausgewählter HLA-DPB1-Allele bei Patienten und Kontrollen. Phänotypische Frequenz der Kombination (pf in %), Relativer Δ -Wert (Δ_R), χ^2 -Wert des Kopplungsungleichgewichtes der Kombination (χ^2_{Δ}), Relatives Risiko (RR), p-Wert des Vergleichs der Phänotypfrequenzen (p). * = $p_{MV} < 0,05$ (korrigiert für die Zahl theoretisch möglicher Allelkombinationen ausgehend von der Zahl beobachteter Allele.)

Allelkombination	CLL Patienten (n = 101)				Kontrollen (n = 157)			
	n	pf (%)	Δ_R	χ^2_{Δ}	n	pf (%)	Δ_R	χ^2_{Δ}
B*8:DPB1*0101	4	4,0	0,28	7,93	9	5,7	0,45	26,83*
Cw*07:DPB1*0101	6	5,9	0,08	0,15	15	9,6	0,88	32,67*
Cw*06:DPB1*1701	4	4,0	0,51	7,43	5	3,2	0,63	19,08*
DRB1*0301:DPB1*0101	3	3,0	0,12	1,24	13	8,3	0,76	64,47*
DRB1*0701:DPB1*1701	5	5,0	0,77	21,25*	5	3,2	0,61	14,87
DQB1*0201:DPB1*0101	3	3,0	-0,06	0,15	12	7,6	0,66	40,51*

Die Merkmale HLA-DRB1*0401, -DRB4*0103 und -DQB1*0302 stehen in kaukasoiden Populationen im Haplotyp HLA-DR4:DR53 und im erweiterten Haplotyp HLA-Cw3:B62:DR4:DQ8 im Kopplungsungleichgewicht (Baur et al., 1984; Ikaheimo et al., 1996). Die demonstrierte Assoziation dieser Merkmale mit der CLL war daher Anlass zur Untersuchung einer Krankheitsassoziation von Kombinationen dieser Merkmale. Die in Tabelle 18 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Allelkombinationen HLA-DRB1*0401:DRB4*0103, HLA-DRB1*0401:

DQB1*0302 und HLA-DRB4*0103:DQB1*0302 signifikant häufiger unter CLL-Patienten vorlagen. Die Kombination HLA-DRB1*0401:DQB1*0302 stand in beiden Gruppen in signifikanten Kopplungsungleichgewicht. Dagegen war das beobachtete Kopplungsungleichgewicht für HLA-DRB1*0401:DRB4*0103 und HLA-DRB4*0103:DQB1*0302 CLL-spezifisch, d. h. nur unter CLL-Patienten traten die Allele HLA-DRB1*0401 und HLA-DQB1*0302 signifikant häufiger gemeinsam mit HLA-DRB4*0103 auf, als theoretisch erwartet. 68,0 % bzw. 67,9 % aller HLA-DRB1*0401- bzw. -DQB1*0302-positiven Patienten trugen das Allel HLA-DRB4*0103 gegenüber 28,6 % bzw. 28,0 % der entsprechenden Kontrollen. Für die andere häufige Allelkombination des HLA-DR4:DR53-Haplotypes - HLA-DRB1*0401:DRB4*0101 - wurde nur unter den Kontrollen ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht beobachtet. Damit ergab sich insgesamt eine CLL-spezifische Kopplung der Allele des HLA-DR4:DR53 Haplotypes. Hinsichtlich der Kombinationen CLL-assoziiertes HLA-DR- und -DQ-Allele mit HLA-DPB1*0301 bestand unter CLL-Patienten nur eine signifikant erhöhte Frequenz der Allelkombination HLA-DRB4*0103:DPB1*0301. Weder in der Patienten- noch in der Kontrollgruppe wurde für eine der Kombinationen mit HLA-DPB1*0301 ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht beobachtet. Die Analyse der Kombinationen von CLL-assoziierten Allelen mit HLA-Klasse-I-Merkmalen demonstrierte eine erhöhte Frequenz der Kombinationen HLA-B*62:DRB1*0401, HLA-Cw*03:DRB1*0401 und HLA-B*62:DQB1*0302 in der Gruppe der CLL-Patienten. Ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht fand sich für diese Allelkombinationen nur in der Patientengruppe. Dagegen stand die Kombination HLA-Cw*03:DQB1*0302 in beiden Gruppen in signifikantem Kopplungsungleichgewicht, war aber nicht mit CLL assoziiert. Diese Beobachtungen warfen die Frage nach einer CLL-Assoziation von HLA-B*62 und -Cw*03 auf. Beide Merkmale traten mit gleicher Frequenz unter CLL-Patienten und Kontrollprobanden auf (Tab. 18 und Anlage Tab. 3). Weiterhin stand die Allelkombination HLA-Cw*03:B*62 in beiden Gruppen in signifikantem Kopplungsungleichgewicht, ohne dass eine Assoziation mit der CLL vorlag. Die Resultate der Untersuchung der Zwei-Locus-Allelkombinationen spiegelten sich in den Ergebnissen der Analyse der Drei-, Vier- und Fünf-Locus-Kombinationen wider (Tab. 19). Die Kombinationen HLA-DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302, HLA-Cw*03:B*62:DRB1*0401:DRB4*0103 und HLA-Cw*03:B*62:DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 fanden sich mit erhöhter Frequenz unter CLL-Patienten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Zwei-Locus-Analyse stand auch die Beobachtung, dass sich Patienten- und Kontrollgruppe nur geringfügig in den Frequenzen der HLA-DPB1*0301-betreffenden Kombinationen unterschieden.

Die erhöhte Zahl an HLA-DQB1-Homozygoten unter CLL-Patienten war Anlass zur Untersuchung einer möglichen Assoziation der CLL mit dem gekoppelten Auftreten von HLA-DQB1-

Homozygotie mit anderen CLL-assoziierten HLA-Merkmalen. Dazu wurden die phänotypischen Frequenzen der jeweiligen Kombination in beiden Gruppen verglichen. Für keine der Kombinationen wurde ein signifikanter Frequenzunterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe beobachtet. Nur die Kombination HLA-DQB1-Homozygotie:Cw*07 (12,9 % vs. 2,5 %; RR = 5,65; p = 0,003) fand sich mit erhöhter Frequenz unter CLL-Patienten.

4.5. Verteilung der HLA-Merkmale bei CLL-Patienten in Abhängigkeit vom Geschlecht und Erkrankungsalter

4.5.1. Unterteilung der Patientengruppe nach Alter und Geschlecht

Die in der Gesamtgruppe der Patienten gegenüber den Kontrollen beobachteten Frequenzunterschiede waren Anlass zur Untersuchung einer Abhängigkeit dieser Unterschiede vom Geschlecht und vom Erkrankungsalter der Patienten. Für die Analyse hinsichtlich des Erkrankungsalters wurden die Patienten gemäß ihrem Alter bei Erstdiagnose verschiedenen Gruppen zugeordnet.

Tab. 20: In Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht verglichene Patienten- und Kontrollgruppen. Durchschnittsalter bzw. medianes Alter beziehen sich auf Alter bei Erstdiagnose (Patienten) bzw. bei initialer HLA-Typisierung (Kontrollen).

	n	Durchschnittsalter (± SD; Jahre)	Medianes Alter (Jahre)
Kontrollen			
Gesamt	157	29,2 (± 9,8)	27
Männlich	63	30,7 (± 11,2)	28,5
Weiblich	94	28,2 (± 8,6)	25
Patienten			
Gesamt	101	61,5 (±11,0)	61
Männlich	56	60,2 (± 9,7)	60
Weiblich	45	63,0 (± 12,3)	63
< 61 Jahre (Früh Erkrankte)	50	52,7 (± 6,2)	54
≥ 61 Jahre (Spät Erkrankte)	51	70,0 (± 7,4)	68
< 52 Jahre	20	46,7 (± 4,8)	48,5
> 72 Jahre	18	78,7 (± 5,0)	77
< 61 Jahre, männlich	32	53,8 (± 5,6)	54,5
≥ 61 Jahre, männlich	24	68,8 (± 7,1)	66
< 61 Jahre, weiblich	18	50,8 (± 6,6)	50,5
≥ 61 Jahre, weiblich	27	71,2 (± 7,6)	69

Tab. 18: Zwei-Locus-Kombinationen ausgewählter, CLL-assoziiierter HLA-Merkmale in den Gruppen der CLL-Patienten und Kontrollprobanden. Phänotypische Frequenz der Kombination (pf in %), Relativer Δ -Wert (Δ_R), χ^2 des Kopplungsungleichgewichtes der Kombination (χ^2_{Δ}), Relatives Risiko (RR), p-Wert des Vergleiches der Phänotypfrequenzen (p). * = $p < 0,05$ von χ^2_{Δ} korrigiert für die Zahl theoretisch möglicher Allelkombinationen ausgehend von der Zahl beobachteter Allele; ** = $p_{MV} < 0,05$ nach Korrektur für die Zahl theoretisch möglicher Allelkombinationen.

Allelkombination	CLL-Patienten (n = 101)				Kontrollen (n = 157)				RR	p
	n	pf (%)	Δ_R	χ^2_{Δ}	n	pf (%)	Δ_R	χ^2_{Δ}		
DRB1*0401:DRB4*0103	17	16,8	0,562	50,64*	6	3,8	0,181	10,26	5,09	0,0008
DRB1*0401:DRB4*0101	9	8,9	0,147	4,16	15	9,6	0,585	36,92*		ns
DRB1*0401:DQB1*0302	23	22,8	0,896	140,57*	15	9,6	0,668	115,17*	2,79	0,006
DRB4*0103:DQB1*0302	19	18,8	0,563	58,50*	7	4,5	0,213	11,72	4,97	0,0004**
DRB1*0401:DPB1*0301	5	5,0	0,188	0,14	3	1,9	0,039	0,41		ns
DRB4*0103:DPB1*0301	9	8,9	0,168	3,87	2	1,3	0,363	0,19	7,58	0,008
DQB1*0302:DPB1*0301	5	5,0	0,420	0,82	2	1,3	0,653	0,76		ns
Cw*03:B*62	18	17,8	0,928	94,87*	19	12,1	0,728	91,02*		ns
Cw*03:DRB1*0401	14	13,9	0,382	22,37*	8	5,1	0,175	4,49	3,00	0,03
Cw*03:DQB1*0302	14	13,9	0,295	15,44*	12	7,6	0,312	17,43*		ns
B*62:DRB1*0401	13	12,9	0,593	51,04*	5	3,2	0,104	2,92	4,49	0,006
B*62:DQB1*0302	12	11,9	0,503	31,88*	6	3,8	0,112	3,77	3,39	0,026

Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug 61 Jahre, mit einem Durchschnittsalter von 61,5 Jahren ($\pm 11,0$ Jahre SD). In Abhängigkeit vom medianen Alter bei Erstdiagnose wurde die Verteilung von HLA-Merkmalen in einer Gruppe von früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre, $n = 50$) und in einer Gruppe von spät erkrankten Patienten (≥ 61 Jahre, $n = 51$) untersucht. Da diese Zuordnung nur eine begrenzte Aussage über eine HLA-Assoziation mit einem gegenüber dem Durchschnitt deutlich früheren oder späteren Erkrankungsbeginn erlaubt, wurde zusätzlich die Verteilung von HLA-Merkmalen bei Patienten mit einem Alter bei Erstdiagnose außerhalb der einfachen Standardabweichung des Durchschnittsalters analysiert. Dazu wurden Gruppen von Patienten mit einem Erkrankungsbeginn vor dem 52. Lebensjahr (< 52 Jahre) und nach dem 72. Lebensjahr (> 72 Jahre) verglichen. Durch den Vergleich der weiblichen und männlichen früh und spät erkrankten Patienten wurde die Geschlechtsabhängigkeit der altersspezifischen Unterschiede untersucht. Eine Unterteilung der Kontrollgruppe in Altersgruppen war bei der Altersverteilung dieser Gruppe nicht möglich (Abschnitt 3.1.). In den Gruppen der früh und spät erkrankten Patienten war eine Umkehr der Geschlechtsverteilung auffällig. Verhielten sich die Anteile von Frauen und Männern unter früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre) mit einem Verhältnis von 1 : 1,8 ähnlich wie in der Gesamtgruppe, so fand sich unter spät erkrankten Patienten (≥ 61 Jahre) ein Verhältnis von 1,1 : 1. Die Charakteristika der verglichenen Teilgruppen gibt Tabelle 20 wieder. Durch den mehrfachen Vergleich verschiedener Teilgruppen ergibt sich eine höhere Wahrscheinlichkeit zufällig signifikanter Unterschiede (Tiwari und Terasaki 1985). Im folgenden wurde daher nur auf jene HLA-Merkmale eingegangen, für die bereits ein Frequenzunterschied zwischen den Gesamtgruppen demonstriert wurde oder für die ein signifikanter Unterschied auch nach Korrektur für die Zahl verglichener Teilgruppen bestand ($n = 12$).

4.5.2. HLA-Assoziationen der CLL in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter

In Tabelle 21 sind jene HLA-Merkmale aufgeführt, für die Frequenzunterschiede in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose beobachtet wurden. Die in der Gesamtgruppe der Patienten festgestellte Frequenzerhöhung des Allels HLA-DPB1*0301 spiegelte sich gegenüber den Kontrollen signifikant nur in den Gruppen < 61 Jahre ($RR = 2,44$; $p = 0,05$) und < 52 Jahre ($RR = 3,31$; $p = 0,04$) wieder, deutete sich aber auch unter spät erkrankten (≥ 61 Jahre) Patienten an. Die geschlechtsspezifische Verteilung unter früh und spät erkrankten CLL-Patienten (Abb. 11) verdeutlicht, dass die beobachteten Unterschiede insbesondere auf einer erhöhten HLA-DPB1*0301-Frequenz unter männlichen Patienten der Gruppe < 61 Jahre sowie weiblichen Patienten der Gruppe ≥ 61 Jahre beruhen, ohne dass ein genereller Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten vorlag (Abschnitt 4.5.3.). Abgesehen von einer unter-

schiedlichen Verteilung des Allels HLA-DPB1*1701 unter früh und spät erkrankten Patienten ($p = 0,03$) ergaben sich keine weiteren altersspezifischen Differenzen für HLA-DPB1-Allele.

Tab. 21: Verteilung ausgewählter HLA-Merkmale in Abhängigkeit vom Alter der Patienten bei Erstdiagnose. Zahl (n) und phänotypische Frequenz (pf in %).

HLA-	< 61 Jahre (n = 50)	≥ 61 Jahre (n = 51)	< 52 Jahre (n = 20)	> 72 Jahre (n = 18)	Kontrollen (n = 157)
	n (pf)	n (pf)	n (pf)	n (pf)	n (pf)
B*18	4 (8,0)	9 (17,7)	2 (10,0)	6 (33,3)	12 (7,6)
Cw*06	23 (46,0)	10 (19,6)	12 (60,0)	3 (16,7)	38 (24,2)
DRB1*0401	10 (20,0)	15 (29,4)	3 (15,0)	5 (27,8)	21 (13,4)
DRB4*0103	16 (32,0)	14 (27,5)	6 (30,0)	6 (33,3)	21 (13,4)
DQB1*0302	10 (20,0)	18 (35,3)	3 (15,0)	6 (33,3)	25 (15,9)
DQB1*0202 Homoz.	2 (4,0)	0 (0,0)	2 (10,0)	0 (0,0)	1 (0,6)
DQB1 Homoz.	9 (18,0)	9 (17,7)	5 (25,0)	4 (22,2)	12 (7,6)
DPB1*0301	12 (24,0)	10 (19,6)	6 (30,0)	4 (22,2)	18 (11,5)
DPB1*1701	0 (0,0)	6 (11,8)	0 (0,0)	3 (16,7)	7 (4,5)

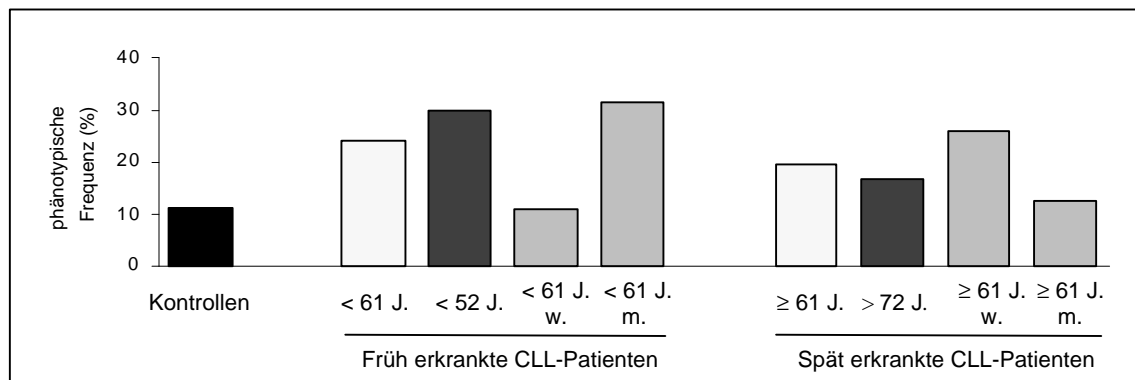


Abb. 11: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-DPB1*0301 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

Die unter allen Patienten beobachtete Erhöhung der Frequenz des Allels HLA-DRB4*0103 fand sich geschlechtsunabhängig signifikant sowohl in der Gruppe < 61 Jahre ($RR = 3,05$; $p = 0,005$) als auch in der Gruppe ≥ 61 Jahre ($RR = 2,45$; $p = 0,03$) wieder (Abb. 12). Dagegen spiegelte sich die Frequenzerhöhung des Allels HLA-DRB1*0401 nur unter den Patienten der Gruppen ≥ 61 Jahre ($RR = 2,70$; $p = 0,02$) und > 72 Jahre wieder, während die Frequenz dieses Allels insbesondere in der Gruppe < 52 Jahre nahezu jener in der Kontrollgruppe entsprach. Eine Analyse der geschlechtsspezifischen HLA-DRB1*0401-Verteilung in den Altersgruppen zeigte je-

doch, dass nur die Verteilung unter früh erkrankten Männern (< 61 Jahre) vom Phänomen der erhöhten HLA-DRB1*0401-Frequenz unter CLL-Patienten abwich (Abb. 13).

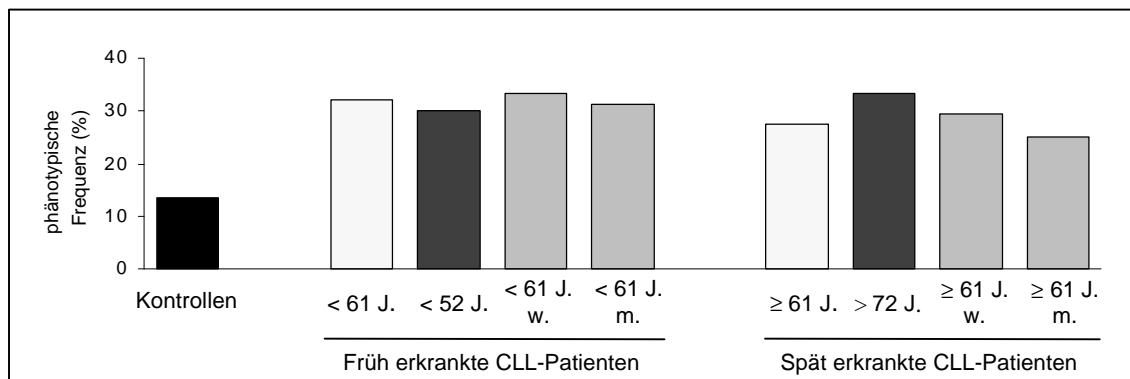


Abb. 12: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-DRB4*0103 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

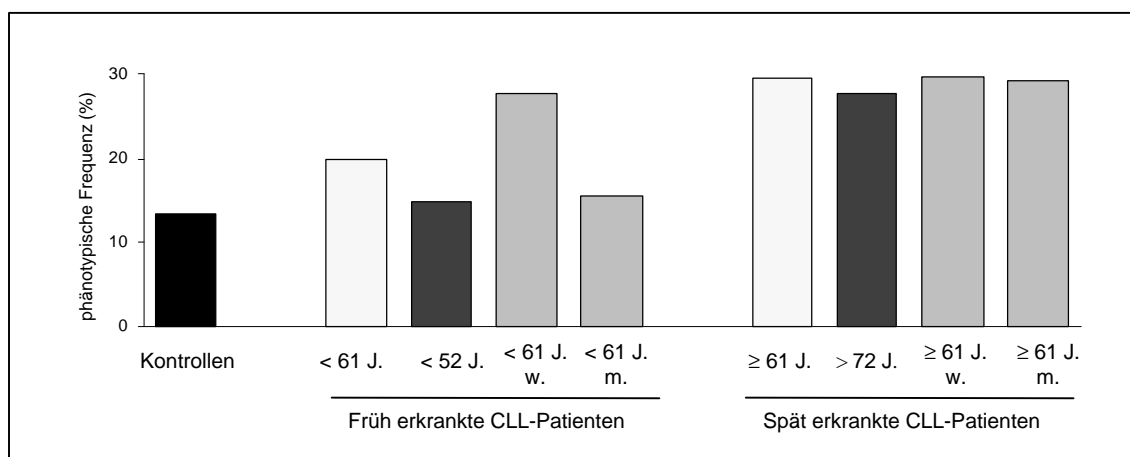


Abb. 13: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-DRB1*0401 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

Ein ähnliches Phänomen lag für das Allel HLA-DQB1*0302 vor. Die Frequenzerhöhung gegenüber den Kontrollen fand sich nur unter Patienten der Gruppe ≥ 61 Jahre ($RR = 2,88$; $p = 0,006$) und der Gruppe > 72 Jahre ($RR = 2,64$; $p = 0,01$), während die Frequenz in den Gruppen < 61 Jahre und < 52 Jahre jener in der Kontrollgruppe entsprach. Jedoch deutete der Vergleich zwischen männlichen spät erkrankten Patienten (≥ 61 Jahre) und männlichen Kontrollen ($41,7\%$ vs. $14,3\%$; $RR = 4,29$; $p = 0,01$) an, dass die Erhöhung der HLA-DQB1*0302-Frequenz unter spät erkrankten Patienten vor allem spät erkrankte Männer betraf (Abb. 14).

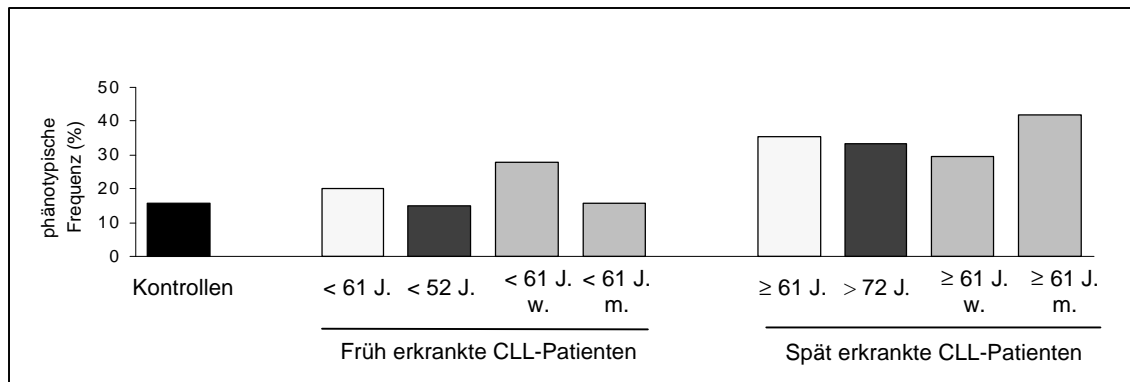


Abb. 14: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-DQB1*0302 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

Die verringerte Frequenz des Allels HLA-DQB1*0202 war gegenüber den Kontrollprobanden nur unter den spät erkrankten Patienten (≥ 61 Jahre) deutlich ($RR = 0,01$; $p = 0,01$). Da die Frequenz unter früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre) jener unter den Kontrollprobanden entsprach und auch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede existierten, war die Frequenzverringering dieses Alleles unter CLL-Patienten spezifisch für spät erkrankte Patienten. Die Frequenz der HLA-DQB1-Homozygoten war altersunabhängig in allen Patientengruppen erhöht. Jedoch erreichte dieser Unterschied nur bei Vergleich der Gruppe < 52 Jahre mit der Kontrollgruppe ($RR = 4,03$; $p = 0,03$) statistische Signifikanz. Allerdings wurden für dieses Merkmal deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet (Abschnitt 4.5.3.). Auffällig war jedoch eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Frequenz der HLA-DQB1*0202-Homozygoten in der Gruppe < 52 Jahre ($RR = 17,3$; $p = 0,03$).

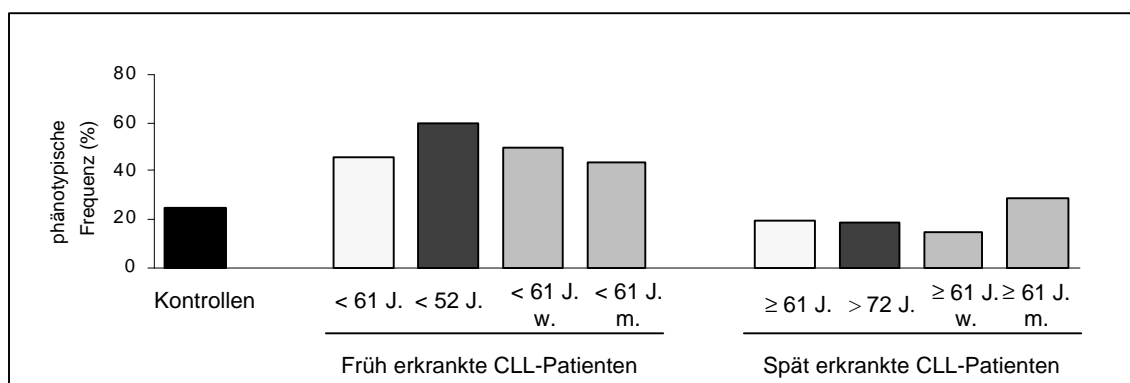


Abb. 15: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-Cw*06 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

Für das Allel HLA-Cw*06 wurde unter früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre) eine sowohl gegenüber den Kontrollen ($RR = 2,67$; $p = 0,006$) als auch gegenüber den spät erkrankten Patien-

ten (≥ 61 Jahre; $p = 0,02$) signifikant erhöhte Frequenz beobachtet. Der Vergleich der Gruppe < 52 Jahre mit der Kontrollen ($RR = 4,70$; $p = 0,002$; $p_{MV} < 0,05$), der auch nach Korrektur für multiple Vergleiche signifikant ausfiel, sowie der Vergleich zwischen den Gruppen < 52 Jahre und > 72 Jahre ($p = 0,04$) bestätigten diese Beobachtung. Der Unterschied in den HLA-Cw*06-Frequenzen zwischen männlichen früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre) und männlichen Kontrollprobanden (43,8 % vs. 14,3 %; $RR = 4,67$; $p = 0,004$) war teilweise auf unterschiedliche Frequenzen unter weiblichen und männlichen Kontrollen zurückzuführen (Abschnitt 4.5.3.). Weiterhin lag bei Patienten der Gruppe > 72 Jahre gegenüber den Kontrollen eine Frequenzerhöhung für das HLA-Merkmal -B*18 vor ($RR = 6,04$; $p = 0,004$).

4.5.3. HLA-Assoziationen der CLL in Abhängigkeit vom Geschlecht

Eine Übersicht der HLA-Merkmale, für die signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom Geschlecht der CLL-Patienten beobachtet wurden, gibt Tabelle 22.

Tab. 22: Verteilung ausgewählter HLA-Merkmale in Abhängigkeit vom Geschlecht der CLL-Patienten und Kontrollen. Zahl (n) und phänotypische Frequenz (pf in %) der hinsichtlich des angegebenen Merkmals positiv typisierten Probanden.

HLA	CLL		Kontrollen	
	Weiblich (n = 45) n (pf)	Männlich (n = 56) n (pf)	Weiblich (n = 94) n (pf)	Männlich (n = 63) n (pf)
Cw*06	12 (26,7)	21 (37,5)	29 (30,9)	9 (14,3)
DRB1 Homoz.	9 (20,0)	3 (5,4)	6 (6,4)	4 (6,3)
DRB1*0401	13 (28,9)	12 (21,4)	12 (12,8)	9 (14,3)
DRB3/4/5 Homoz.	17 (37,8)	5 (8,9)	16 (17,0)	12 (19,0)
DRB3 Homoz.	19 (42,2)	2 (3,6)	7 (7,4)	9 (14,3)
DRB3*0101 Homoz.	6 (13,3)	0 (0,0)	4 (4,3)	5 (7,9)
DRB4 Homoz.	6 (13,3)	2 (3,6)	7 (7,5)	3 (4,8)
DRB4*0103	14 (31,1)	16 (28,6)	15 (16,0)	6 (9,5)
DQB1*0301 Homoz.	4 (8,9)	1 (1,8)	0 (0,0)	3 (4,8)
DQB1* Homoz.	13 (28,9)	5 (8,9)	8 (8,5)	4 (6,3)
DQB1*0202	2 (4,4)	2 (3,6)	15 (16,0)	6 (9,5)
DQB1*0302	13 (28,9)	15 (26,8)	16 (17,0)	9 (14,3)
DPB1*0301	9 (20,0)	13 (23,2)	9 (9,6)	9 (14,3)

Die Frequenzerhöhung des Allels HLA-DPB1*0301 unter CLL-Patienten spiegelte sich nicht-signifikant unter weiblichen und männlichen Patienten wieder (Abb. 15). Es existierten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede für weitere HLA-DPB1-Allele.

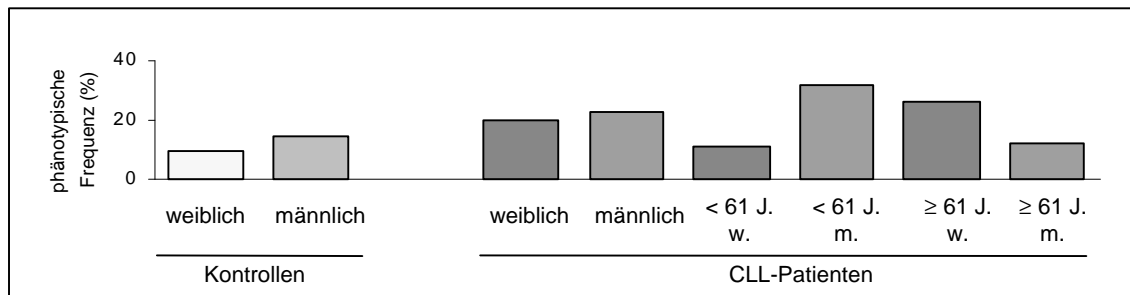


Abb. 15: Geschlechtsspezifische phänotypische Frequenzen des Allels HLA-DPB1*0301 unter CLL-Patienten und Kontrollen.

Die in der Gesamtgruppe der CLL-Patienten erhöhte Frequenz von HLA-DRB4*0103 stellte sich sowohl bei Vergleich der weiblichen (RR = 2,38; $p = 0,07$) als auch der männlichen Patienten (RR = 3,80; $p = 0,02$) gegenüber den Kontrollen gleichen Geschlechtes dar. Dagegen war eine Erhöhung der Frequenz von HLA-DRB1*0401 nur unter weiblichen Patienten gegenüber weiblichen Kontrollen (RR = 2,78; $p = 0,04$) signifikant, während sich die Verteilung unter männlichen Patienten und männlichen Kontrollen kaum unterschied ($p = 0,4$). Das Allel HLA-DQB1*0302 trat sowohl unter weiblichen als auch unter männlichen Patienten gegenüber den Kontrollen mit nicht-signifikant erhöhter Frequenz auf. Die Frequenz von HLA-DQB1*0202 war analog zur Gesamtgruppe unter weiblichen und männlichen Patienten verringert.

Ein interessantes Ergebnis der Analyse geschlechtsspezifischer HLA-Assoziationen der CLL war eine erhöhte Frequenz der Homozygotien von HLA-Klasse-II-Merkmalen unter weiblichen CLL-Patienten. Zum einen wurde eine gegenüber den weiblichen Kontrollen erhöhte Frequenz der Gesamtzahl von HLA-DRB1-Homozygotien unter weiblichen Patienten (RR = 3,67; $p = 0,03$) beobachtet, ohne dass signifikante Unterschiede in der Homozygotiefrequenz einzelner HLA-DRB1-Allele vorlagen. Auffällig war der im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen erhöhte Anteil der Gesamtzahl von Homozygotien für die Merkmale HLA-DRB3/4/5 unter weiblichen CLL-Patienten (RR = 2,81; $p = 0,02$). Diese Frequenzerhöhung unter weiblichen Patienten war im Vergleich zur Gruppe der männlichen Patienten auch nach Korrektur für multiple Vergleiche signifikant ($p = 0,001$; $p_{MV} < 0,05$). Die Ergebnisse der Vergleiche zwischen weiblichen und männlichen früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre; 44,4% vs. 12,5%; $p = 0,02$) als auch zwischen weiblichen und männlichen spät erkrankten Patienten (≥ 61 Jahre; 37,0% vs.

8,3%; $p = 0,04$) belegen eine altersunabhängige Erhöhung der Frequenz von Homozygotien im Bereich der supertypischen HLA-DR-Genloci unter weiblichen CLL-Patienten (Abb. 16).



Abb. 16: Geschlechtsspezifische phänotypische Frequenzen der Gesamtzahl der Homozygotien der HLA-DRB3/4/5-Allele unter CLL-Patienten und Kontrollen.

Dieser Frequenzerhöhung der Gesamtzahl der HLA-DRB3/4/5-Homozygotien unter weiblichen Patienten lagen Unterschiede einzelner Merkmale zugrunde. Unter weiblichen Patienten wurde eine gegenüber den männlichen Patienten erhöhte Frequenz von HLA-DRB3*0101-Homozygotien beobachtet ($p = 0,007$). Dieser Unterschied beruhte auf einer Frequenzerhöhung unter weiblichen spät erkrankten Patienten (≥ 61 Jahre), wie sowohl der Vergleich dieser Gruppe mit den weiblichen Kontrollen (18,5 % vs. 4,3 %; $RR = 5,11$; $p = 0,03$) als auch mit den weiblichen früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre; 18,5 % vs. 5,6 %; $p = 0,4$) zeigte (Abb. 17).

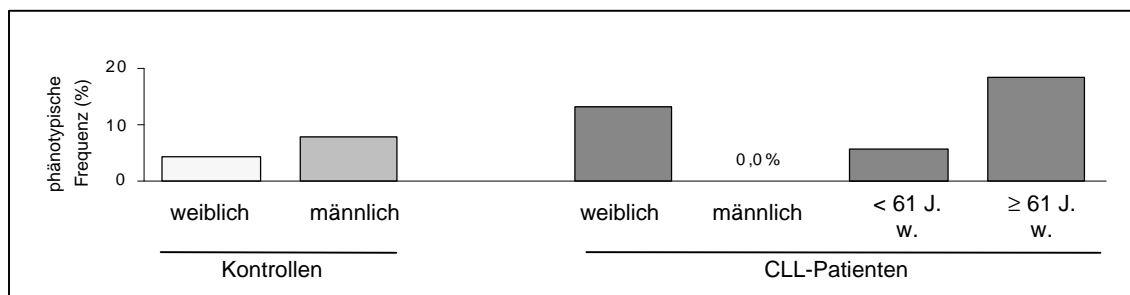


Abb. 17: Geschlechtsabhängige Verteilung der Zahl der HLA-DRB3*0101-Homozygotien unter CLL-Patienten und Kontrollprobanden.

Diese erhöhte Frequenz von HLA-DRB3*0101-Homozygotien spiegelte sich in einer erhöhten Frequenz der Gesamtzahl an HLA-DRB3-Homozygotien unter weiblichen spät erkrankten Patienten (≥ 61 Jahre) gegenüber weiblichen Kontrollen (25,9 % vs. 7,5 %; $RR = 4,35$; $p = 0,02$) und gegenüber männlichen Patienten ($p = 0,01$) wieder. Unter weiblichen früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre) fand sich eine der Kontrollgruppe entsprechende Frequenz (11,1 % vs. 7,5 %). Im Gegensatz zu dieser erhöhten Frequenz von HLA-DRB3-Homozygotien unter spät

erkrankten weiblichen Patienten wurde für die Gesamtzahl der HLA-DRB4-Homozygoten eine erhöhte Frequenz unter weiblichen früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre) gegenüber weiblichen Kontrollen festgestellt (27,8 % vs. 7,5 %; RR = 4,78; p = 0,02). Dieser Unterschied trat nur in dieser Teilgruppe der CLL-Patienten auf, wie deren Vergleich mit männlichen früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre; 27,8 % vs. 3,1 %; p = 0,02) sowie die Verteilung unter weiblichen und männlichen spät erkrankten Patienten (3,7 % bzw. 4,2 %) zeigte (Abb. 18).

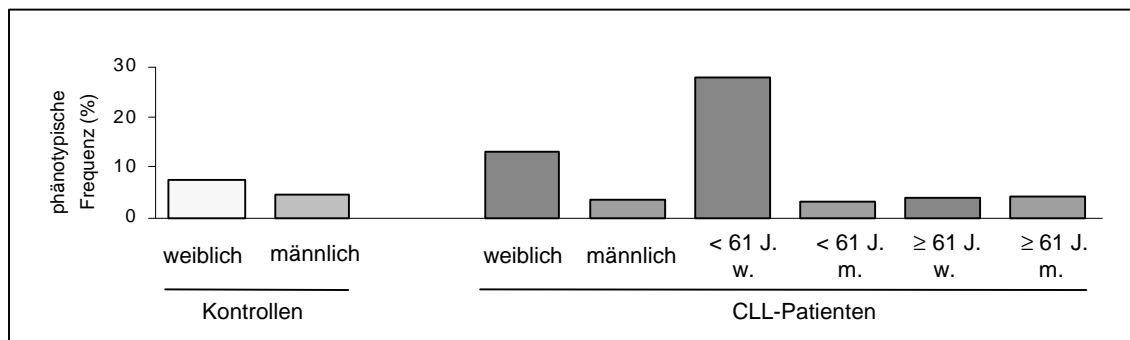


Abb. 18: Geschlechtsabhängige Verteilung der Gesamtzahl der HLA-DRB4-Homozygoten unter CLL-Patienten und Kontrollprobanden.

Ein bemerkenswerter Unterschied ergab sich auch für die Gesamtzahl der HLA-DQB1-Homozygoten. Der Vergleich zwischen der Gruppe der weiblichen Patienten und weiblichen Kontrollen (RR = 4,37; p = 0,004) sowie zwischen weiblichen und männlichen Patienten (p = 0,01) zeigte, dass die in der Gesamtgruppe der Patienten beobachtete Erhöhung der Frequenz der Gesamtzahl von HLA-DQB1-Homozygoten auf weibliche Patienten beschränkt war. Dieses Phänomen war unabhängig vom Alter der Patienten bei Erstdiagnose, wie der Vergleich der weiblichen spät erkrankten Patienten (≥ 61 Jahre; 29,6 % vs. 8,5 %; RR = 4,53; p = 0,009) und der weiblichen früh erkrankten Patienten (< 61 Jahre; 27,8 % vs. 8,5 %; RR = 4,13; p = 0,04) mit den weiblichen Kontrollen belegt (Abb. 19).

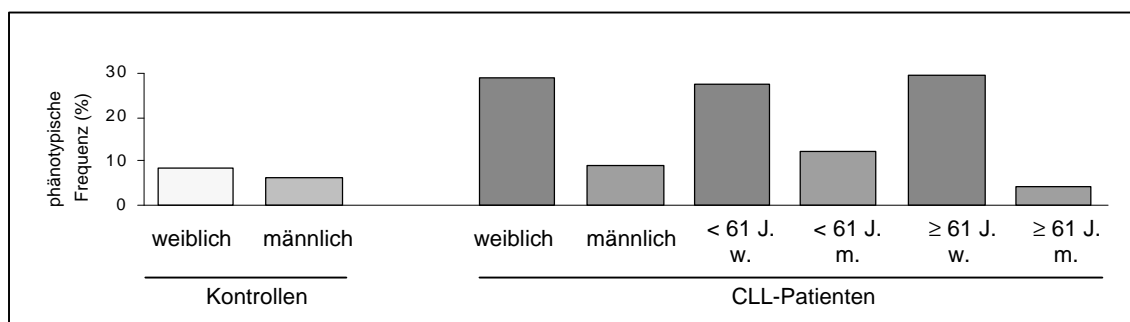


Abb. 19: Geschlechtsabhängige Verteilung der Gesamtzahl der HLA-DQB1-Homozygoten unter CLL-Patienten und Kontrollprobanden.

Gleichzeitig war die Homozygotiefrequenz des Allels HLA-DQB1*0301 sowohl unter weiblichen Patienten (RR = 20,5; $p = 0,01$) als auch unter weiblichen spät erkrankten Patienten (11,1 % vs. 0,0 %; RR = 27,0; $p = 0,01$) gegenüber weiblichen Kontrollen signifikant erhöht. Die Analyse der erwarteten Homozygotiefrequenzen demonstrierte, dass die unter weiblichen ($pf_{\text{erw}} = 7,6\%$ vs. $pf = 8,9\%$) und männlichen ($pf_{\text{erw}} = 4,7\%$ vs. $pf = 1,8\%$) Patienten beobachtete Zahl an HLA-DQB1*0301-Homozygoten weitgehend der Erwartungsfrequenz entsprach. Dagegen lag die beobachtete Frequenz bei weiblichen ($pf_{\text{erw}} = 8,5\%$ vs. $pf = 0,0\%$) und männlichen Kontrollen ($pf_{\text{erw}} = 12,5\%$ vs. $pf = 4,8\%$) unter den erwarteten Werten.

Für das Merkmal HLA-Cw*06 wurde ein Frequenzunterschied zwischen weiblichen und männlichen Kontrollen beobachtet ($p = 0,03$). Dieser trug zu einem signifikanten Unterschied der Frequenzen dieses Merkmals bei Patienten und Kontrollen männlichen Geschlechts bei (RR = 3,6; $p = 0,007$), ohne dass Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Patienten auftraten (Tab. 22).

5. Diskussion

5.1. PCR-SSO-Typisierung der HLA-DPB1-Allele

Zahlreiche neuere Untersuchungen unterstreichen die Relevanz der Typisierung der HLA-DPB1-Allele im Rahmen der Transplantationsmedizin sowie der Untersuchung HLA-assoziiierter Erkrankungen (Nomura et al., 1991; Petersdorf et al., 1993; Sada et al., 1992a). Die Methode der PCR-SSO ist dabei für eine exakte und zeitsparende HLA-DPB1-Typisierung geeignet. Sie ermöglicht die Bestimmung der Basensequenz in genomischer DNA mit der Genauigkeit von bis zu einer Basenfehlpaarung (Fugger et al., 1990; Saiki et al., 1986) und wurde von verschiedenen Autoren für die Sequenzanalyse von β -Globin, HLA-DQA (Saiki et al., 1986), HLA-DR (Angelini et al., 1986) und HLA-Cw (Kennedy et al., 1995) angewandt. Ihr Vorteil besteht darin, dass bei entsprechender Zahl an SSO-Sonden die gesamte Sequenz eines Genabschnittes analysiert werden kann, während sequenzspezifische PCR und RFLP nur Aussagen über die Bereiche der Primer- bzw. Restriktionssequenzen zulassen. Die exakte Typisierung der HLA-DPB1-Allele erfordert die Bestimmung der Nukleotidsequenzen in allen sechs hypervariablen Regionen des zweiten HLA-DPB1-Exons (Bugawan et al., 1988). Zum Zeitpunkt des Beginns der Studie lagen bereits von mehreren Autoren Protokolle zur HLA-DPB1-Typisierung mittels PCR-SSO vor (Bugawan et al., 1990; Bugawan et al., 1988; Howell et al., 1991b; Tiercy et al., 1993). Um eine zuverlässige Typisierung der wachsenden Zahl an HLA-DPB1-Allelen zu ermöglichen, wurden diese Protokolle modifiziert.

Entscheidend für die Typisierungsqualität war die Anpassung der Reaktionsbedingungen der SSO-Hybridisierung. Trotz der Verwendung von TMAC als Hybridisierungslösung mussten für Oligonukleotide gleicher Länge unterschiedliche Waschttemperaturen gewählt werden, um eine Hybridisierung ohne Basenfehlpaarungen zu erreichen. Diese Beobachtung, die auch von anderen Autoren berichtet wurde (Bugawan et al., 1990; Kennedy et al., 1995) deutet darauf hin, dass die Dissoziationstemperatur neben der Länge auch von der spezifischen Sequenz des Oligonukleotids abhängig ist. Wood et al. berichteten, dass zwischen der Oligonukleotidlänge und der Dissoziationstemperatur kein kontinuierlich linearer Zusammenhang besteht (Wood et al., 1985). Für Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 15 Basen liegen die Dissoziationstemperaturen wesentlich höher, als dies bei einer linearen Abhängigkeit zu erwarten wäre. Ursächlich kann dabei die Ausbildung einer bindungsstabilisierenden Tertiärstruktur des Dimers aus Oligonukleotid und DNA-Amplifikat ab einer bestimmten Oligonukleotidlänge vermutet werden. Fugger et al. konnten zeigen, dass die Lage der Basenfehlpaarungen innerhalb des Oligonukleotids die Spezifität der Hybridisierung beeinflusst (Fugger et al., 1990). Dies verdeutlicht, dass die für die Typisierungsqualität der PCR-SSO-Methode kritische Dissoziationstemperatur der SSO-Sonden von der spezifischen Nukleotidsequenz der Sonden abhängt und für jede Sonde empirisch ermittelt werden muss. Im Fall der HLA-DPB1-Typisierung ist dies insbesondere für SSO-Sonden wichtig, die im Bereich der hypervariablen Region B und D hybridisieren. In diesen Regionen unterscheiden sich die Sequenzen meist nur in einem Nukleotid und für einige der für diese Regionen verwendeten Sonden wurden falsch positive Kreuzreaktionen berichtet (Tait et al., 1992). Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten SSO-Sonden wurden daher gegenüber anderen Protokollen teilweise modifiziert und zeigten nach Optimierung der Hybridisierungsbedingungen keine Kreuzreaktionen.

Für die vorliegende Studie wurde das dot-blot-Verfahren gewählt. Dabei werden mehrere Amplifikate auf einer Nylonmembran immobilisiert und anschließend mit einem markierten Oligonukleotid hybridisiert. Gegenüber dem reverse-dot-blot-Verfahren, bei dem die SSO-Sonden auf der Membran immobilisiert sind (Bugawan et al., 1990), erlaubt das dot-blot-Verfahren unterschiedliche Hybridisierungs- und Waschbedingungen für jede Sonde. Dies ermöglicht eine exaktere Einstellung der Hybridisierungsbedingungen. Als Negativ- und Positivkontrolle ist eine parallele Typisierung von DNA bekannten HLA-DPB1-Genotyps erforderlich (Erllich et al., 1991). Das in dieser Arbeit verwendete Panel der DNA B-lymphoblastoider Zelllinien erlaubt sowohl die Kontrolle falsch positiver und falsch negativer Reaktionen für alle verwendeten Sonden als auch Rückschlüsse auf das quantitative Ausmaß falsch positiver Reaktionen (Bugawan et al., 1990).

Während für die eindeutige Typisierung aller bis 1990 bekannten 14 HLA-DPB1-Allele 14 SSO-Sonden notwendig waren (Müller und Eiermann, 1991), erfordert eine vollständige Typisierung aller derzeit bekannten Sequenzen der sechs hypervariablen Regionen 40 Sonden (ASHI Webpage: www.anthonynolan.com/HIG/seq/nuc/text/dpb1.nt.txt; Stand 01.08.1999). Im Fall der Homozygotie können damit alle bis 1999 offiziell beschriebenen 85 HLA-DPB1-Allele eindeutig identifiziert werden. Angesichts der Zahl von ca. 20 HLA-DPB1-Allelen die in der kaukasoiden Bevölkerung mit einer phänotypischen Frequenz von mehr als einem Prozent auftreten, erscheint der hohe Zeit- und Kostenaufwand einer Typisierung mit 40 Sonden nicht sinnvoll. Im Gegensatz zu den von anderen Autoren verwendeten 16 oder 17 Sonden (Bugawan et al., 1990; Tiercy et al., 1993) wurden für die vorliegende Studie 22 Sonden verwendet. Diese erlauben die Typisierung eines hohen Prozentsatzes der jeweils bekannten HLA-DPB1-Allele. Zum Zeitpunkt des Beginns der Studie waren 93 % der damals bekannten 58 HLA-DPB1-Allele mit diesen 22 Sonden eindeutig differenzierbar (Bodmer et al., 1995); 1999 waren ebenfalls 93 % der bis dahin identifizierten 85 Allele eindeutig typisierbar (www.anthonynolan.com/HIG/seq/nuc/text/dpb1.nt.txt; Stand 01.08.1999). Die gegenüber den Studien von Bugawan et al. und Tiercy et al. zusätzlich oder mit modifizierter Sequenz verwendeten Sonden für die Regionen B und F ermöglichten eine genauere Unterscheidung der Allele HLA-DPB1*0202, -DPB1*0501, -DPB1*1501 und -DPB1*1801 und deren heterozygoter Kombinationen. Gegenüber dem Protokoll des 11th IHW wurde auf zusätzliche Sonden im Bereich der Regionen A und D verzichtet. Zum einen konnte die ursprünglich in der Region A beschriebene Sequenz des Allels HLA-DPB1*02011 nicht bestätigt werden (Bodmer et al., 1997) und die Sonde DPB0906 des Referenzprotokolls (Kimura und Sasazuki, 1992) erübrigte sich. Andererseits betreffen die in der vorliegenden Studie nicht typisierten Sequenzen der D-Region seltene Allele, für die keine Referenz-Zelllinie existierte (Kimura et al., 1992) und deren Typisierung aufgrund falsch positiver Kreuzreaktion erschwert ist (Tait et al., 1992). Eine Differenzierung zwischen den HLA-Allelen -DPB1*11011 und -DPB1*11012, -DPB1*20011 und -DPB1*20012, -DPB1*0201 und -DPB1*4101, -DPB1*0501 und -DPB1*3801 sowie zwischen HLA-DPB1*0402, -DPB1*6001 und -DPB1*7701 war mit dem verwendeten SSO-Set nicht möglich. Diese Ungenauigkeiten betreffen jeweils eine Kombination eines häufigen und eines seltenen Allels. In Anlehnung an andere Studien scheint es gerechtfertigt, in einem solchen Fall das Vorliegen des in der kaukasoiden Bevölkerung häufiger auftretenden Allels (HLA-DPB1*0201, -DPB1*0501 und -DPB1*0402) anzunehmen bzw. auf eine Subtypisierung der Merkmale HLA-DPB1*1101 und -DPB1*2001 zu verzichten (Tiercy et al., 1993).

Ein Problem aller derzeit angewandten HLA-DPB1-Typisierungsmethoden ist die eindeutige Differenzierung bestimmter heterozygoter Allelkombinationen. Die PCR-SSO bestimmt ausge-

wählte Sequenzen des polymorphen zweiten HLA-DPB1-Exons, erlaubt jedoch keine Aussage, ob sich diese Sequenzen auf dem gleichen Chromosom befinden. Selbst bei einer Typisierung aller bekannten Sequenzen mittels 40 SSO-Sonden ist eine Differenzierung zwischen bestimmten Allelkombinationen, wie z. B. zwischen HLA-DPB1*0401/DPB1*0901 und HLA-DPB1*3301/DPB1*3501 nicht möglich (eigene Untersuchungen). Eine Erweiterung des verwendeten Sets von 22 SSO-Sonden erschien daher nicht sinnvoll. Darüber hinaus wurde in dieser Studie für kaukasoiden Probanden empirisch gezeigt, dass dieses Problem zumeist die Differenzierung zwischen einer Kombination häufiger Allele und einer Kombination seltener Allele betrifft. Somit ist auch hier eine Typisierung für die jeweils in der kaukasoiden Bevölkerung häufigeren Allele gerechtfertigt. Diese eingeschränkte Aussagekraft der Typisierung ist nicht auf die Methode der PCR-SSO beschränkt. Eine seit 1997 erhältliche kommerzielle PCR-SSP-Methode zur HLA-DPB1-Typisierung erlaubte eine Identifizierung aller bis dahin bekannten 67 HLA-DPB1-Allele mittels 48 Primer-Paaren (Dynal DPB1-SSP, Dynal, Oslo, Norwegen). Jedoch sind fünf Prozent der heterozygoten HLA-DPB1-Kombinationen nicht zu differenzieren. Auch bei der Verwendung eines erweiterten Sets von 95 Primer-Paaren ist mit der PCR-SSP-Methode eine Unterscheidung verschiedener heterozygoter Allelkombinationen nicht möglich (Gilchrist et al., 1998). Dieses Problem resultiert aus der 'patchwork' Struktur des zweiten HLA-DPB1-Exons und kann weder mit der PCR-SSO noch mittels der PCR-SSP gelöst werden. Nur eine komplette Sequenzierung des zweiten HLA-DPB1-Exons oder eine zeit- und kosten-aufwendige Kombination von gruppenspezifischer PCR und SSO-Hybridisierung (Fernandez-Vina et al., 1991; Rani et al., 1995) bietet eine Möglichkeit der eindeutigen Typisierung aller heterozygoten HLA-DPB1-Allelkombinationen. Von den in dieser Studie typisierten 363 DNA-Proben gelang nur in einem Fall keine sofortige Typisierung. Erst der Vergleich mit neu identifizierten HLA-DPB1-Sequenzen ergab das Vorliegen des erst seit kurzem beschriebenen, seltenen Allels HLA-DPB1*5901. Damit wird deutlich, dass die Methode der PCR-SSO im Gegensatz zur PCR-SSP die Bestimmung der Sequenzen der hypervariablen Regionen auch von bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntem HLA-DPB1-Allelen ermöglicht.

Ein anderer Ansatz der HLA-DPB1-Typisierung beruht auf der Beobachtung, dass die Aminosäure-Positionen 55 - 87 des HLA-DP β - Moleküls für die Interaktion mit dem TCR entscheidend sind (Cesbron et al., 1993; Diaz et al., 1998; Naruse et al., 1995). Diese Aminosäuren werden durch die dritte, vierte, fünfte und sechste hypervariable Region (C, D, E, F) des zweiten HLA-DPB1-Exons kodiert (Bugawan et al., 1990; Kelly und Trowsdale, 1985). Für das Risiko einer Transplantatabstoßung oder einer Graft-versus-host-disease scheinen demzufolge die HLA-DP β -Aminosäure-Sequenzen 55 - 87 von Spender und Empfänger entscheidend zu sein (Cesbron et al., 1993). Eine vollständige Typisierung dieser Sequenzen wäre mit einer PCR-SSP

mit nur 24 Primer-Paaren möglich und daher auch für die Typisierung im Rahmen der Nierentransplantation geeignet (eigene Untersuchungen). Eine Differenzierung der relevanten HLA-DP β -Epitop-Strukturen erlaubt auch die Methode der Monoklonalen-Antikörper-Spezifischen-Immobilisierung-Lymphozytärer-Antigene (MAILA) (Mueller-Eckhardt et al., 1990). Beide Methoden liefern allerdings keine ausreichende Aussage über das vorliegende HLA-DPB1-Allel und sind somit ungeeignet für die Untersuchung einer Assoziation zwischen HLA-DPB1-Allelen und Erkrankungssuszeptibilität.

Die in dieser Studie verwendete PCR-SSO-Methode erlaubt eine zuverlässige Typisierung der Mehrzahl der HLA-DPB1-Allele und ihrer heterozygoten Allelkombinationen in der kaukasoiden Bevölkerung. Nur wenige seltene Allele und Allelkombinationen konnten in der vorgelegten Studie nicht eindeutig differenziert werden. Die spezifischen Hybridisierungsbedingungen der Sonden stellen den wesentlichen kritischen Parameter dieser Methode dar.

5.2. Verteilung der HLA-DPB1-Allele in der Bevölkerung Sachsen-Anhalts

Die beobachtete Verteilung der HLA-DPB1-Allele unter kaukasoiden Probanden aus der mitteleuropäischen Region von Sachsen-Anhalt bestätigen die von verschiedenen Autoren demonstrierte Verteilung in kaukasoiden Populationen. HLA-DPB1*0401 stellt mit einer phänotypischen Frequenz von 60 - 70 % das mit Abstand häufigste HLA-DPB1-Allel in kaukasoiden Bevölkerungen dar. Vier weitere Allele (HLA-DPB1*0101, -DPB1*0201, -DPB1*0301 und -DPB1*0402) finden sich bei jeweils 10 - 20 % aller kaukasoiden Probanden. Alle anderen HLA-DPB1-Allele treten mit einer Frequenz von weniger als 10 % auf. Damit unterscheidet sich die HLA-DPB1-Verteilung in kaukasoiden Populationen deutlich von der Verteilung in anderen ethnischen Gruppen (Tait et al., 1992). In der mongoloiden Bevölkerung Japans und Nord-Chinas ist das Allel HLA-DPB1*0501 mit einer phänotypischen Frequenz von 60 % das häufigste Allel (Gao et al., 1991b), während in der negroiden Bevölkerung der USA, Brasiliens, Nigerias und Liberias HLA-DPB1*0101 mit einer Frequenz von 50 - 60 % das am häufigsten auftretende Allel darstellt (Fernandez-Vina et al., 1991; May et al., 1998; Moraes et al., 1993). In diesen Bevölkerungen findet sich das Allel HLA-DPB1*0401 nur mit einer phänotypischen Frequenz von maximal 15 %. Dieses Phänomen eines populationspezifischen Polymorphismus deutet darauf hin, dass die Vererbung der HLA-DPB1-Allele einem Selektionsdruck unterliegt. Entsprechend der immunologischen Funktion der HLA-Moleküle ist dabei insbesondere die Fähigkeit zur Präsentation spezifischer Antigene als Selektionsmerkmal zu vermuten. Dies wird durch die Beobachtungen einer HLA-DP-restringierten T-Zell-Aktivierung durch virale (Celis et al., 1990) und bakterielle (Hermann et al., 1992) Antigene unterstützt. Die Tatsache, dass in

den untersuchten Populationen 90 % aller bekannten HLA-DPB1-Allele mit sehr geringen Frequenzen oder gar nicht auftreten, ist mit der Hypothese einer fortwährenden Entstehung neuer Allele vereinbar (Bodmer, 1972). Ein möglicher Mechanismus der Generierung neuer HLA-DPB1-Allele besteht im Austausch von Gensegmenten der hypervariablen Regionen während der Keimzellreifung (Kuhner und Peterson, 1992; Ohta, 1991).

Für HLA-Klasse-II-Merkmale wurden in Bevölkerungen gleicher ethnischer Abstammung unterschiedliche Frequenzen in Abhängigkeit von der geographischen Herkunft der Probanden beobachtet (Baur et al., 1984; Sanchez-Velasco et al., 1999; Shaw et al., 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass die Verteilung der HLA-DPB1-Allele auch in kaukasoiden Populationen regionale Unterschiede aufweist. Die beobachtete phänotypische Frequenz der HLA-DPB1-Allele in der kaukasoiden Bevölkerung Sachsen-Anhalts entspricht weitgehend der Verteilung unter kaukasoiden Probanden in der Bevölkerung Nord-Irlands (Savage et al., 1992), Nord-Amerikas (Cerna et al., 1992), Frankreichs (al-Daccak et al., 1991; Perdriger et al., 1996), Spaniens (Yelamos et al., 1994) und Deutschlands (Mella et al., 1995). Dagegen findet sich z. B. in der Bevölkerung Sachsen-Anhalts für das Allel HLA-DPB1*0402 eine gegenüber der kaukasoiden Bevölkerung Tschechiens (Cerna et al., 1992) deutlich niedrigere phänotypische Frequenz (23 % vs. 38 %). Alle anderen HLA-DPB1-Allele zeigen unter Probanden aus Sachsen-Anhalt und Tschechien eine jeweils nahezu identische Frequenz. Gegenüber kaukasoiden Probanden franko-kanadischer Herkunft ist in der Bevölkerung Sachsen-Anhalts insbesondere eine höhere phänotypische Frequenz des Allels HLA-DPB1*0201 (27,4 % vs. 7,7 %) festzustellen (Howell et al., 1991a). Im Vergleich mit einer kaukasoiden Kontrollgruppe aus Norditalien (Mantovani et al., 1992) treten in der Bevölkerung Sachsen-Anhalts die Allele HLA-DPB1*0101 (10,2 % vs. 5,5 %) und -DPB1*0401 (68,8 % vs. 50,0 %) mit höherer phänotypischer Frequenz, das Allel HLA-DPB1*0301 (11,5 % vs. 25,0 %) dagegen mit niedrigerer Frequenz auf. Differenzen in der Verteilung mehrerer HLA-DPB1-Allele bestehen auch zwischen der Bevölkerung Sachsen-Anhalts und einer von Baisch und Capra untersuchten Gruppe kaukasoider nordamerikanischer Probanden (Baisch und Capra, 1993). Diese Unterschiede zwischen Gruppen gesunder kaukasoider Probanden unterschiedlicher geographischer Herkunft könnten auf den Einfluss regionaler Umweltfaktoren in der Evolution des HLA-DPB1-Polymorphismus hindeuten. Dagegen sind aus Sicht des Autors die Unterschiede zwischen den HLA-DPB1-Allelfrequenzen der mitteldeutschen Kontrollgruppe und den in anderen Studien typisierten deutschen kaukasoiden Probanden als Folge unterschiedlicher Auswahlkriterien der Probanden zu bewerten. Gegenüber den Untersuchungen von Eiermann et al. (Eiermann et al., 1991), Ferencik und Grosse-Wilde (Ferencik und Grosse-Wilde, 1998) sowie von Rihs et al. (Rihs et al., 1996) fand sich für das Allel HLA-DPB1*0301 in der Bevölkerung

Sachsen-Anhalts eine deutlich geringere phänotypische Frequenz, während für alle weiteren Allele jeweils eine ähnliche Verteilung in den erwähnten Untersuchungen beobachtet wurde. Im Vergleich zu einer Studie von Seidl et al. (Seidl et al., 1997) waren zusätzlich Unterschiede in der Verteilung der Allele HLA-DPB1*0101 und -DPB1*0201 auffällig. Als Erklärung dieser Differenzen kommen zunächst regionale Unterschiede in der HLA-DPB1-Verteilung in Betracht. Während bei Rihs et al. und Seidl et al. Angaben zur Herkunft der Kontrollprobanden fehlen, untersuchten Ferencik und Grosse-Wilde sowie Eiermann et al. Probanden aus einer westdeutschen bzw. südwestdeutschen Region. Für die Studie von Mella et al. (Mella et al., 1995), deren Ergebnisse vollständig mit der unter Probanden aus Sachsen-Anhalt beobachteten Verteilung übereinstimmen, liegen keine Angaben zur Herkunft der Probanden vor. Es kann daher keine endgültige Aussage über eine regional unterschiedliche HLA-DPB1-Allelverteilung in der deutschen Bevölkerung getroffen werden. Auffällig waren dagegen die unterschiedlichen Kriterien für die Auswahl der Kontrollprobanden in den verglichenen Untersuchungen. Während für die Kontrollgruppe aus Sachsen-Anhalt nichtverwandte Probanden zufällig rekrutiert wurden, erfolgte in den zum Vergleich herangezogenen Studien eine Typisierung von Blut- (Ferencik und Grosse-Wilde, 1998; Rihs et al., 1996; Seidl et al., 1997) bzw. Thrombozytenspendern (Eiermann et al., 1991) oder Nierenspendern (Ferencik und Grosse-Wilde, 1998). Aufgrund der Selektion von Blut- und Organspendern nach medizinischen Gesichtspunkten entsprechen diese Gruppen nicht den Kriterien einer Normalverteilung. Interessanterweise findet sich auch im Vergleich mit einer Studie unter britischen Knochenmark- und Thrombozytenspendern bzw. Nierenspendern (Howell et al., 1993) eine gegenüber der Kontrollgruppe aus Mitteldeutschland deutlich erhöhte Frequenz des Allels HLA-DPB1*0301 (11,5 % vs. 20,0 %). Inwieweit sich damit ein mit HLA-DPB1*0301 assoziiertes Selektionsmerkmal manifestiert, bleibt ungeklärt. Allerdings wird deutlich, dass im Rahmen von Untersuchungen zur Krankheitsassoziation von HLA-DPB1-Allelen eine Typisierung zufällig ausgewählter, gesunder Kontrollprobanden mit gegenüber den Patienten gleicher geographischer Herkunft und ethnischer Abstammung notwendig ist. Erst der Vergleich und die Gesamtanalyse mehrerer Studien wird eine Aussage über mögliche regionale Unterschiede der HLA-DPB1-Allelverteilung in der deutschen kaukasoiden Bevölkerung erlauben. Die weiterhin beobachteten Frequenzunterschiede zwischen Kontrollprobanden und gesunden IgA-Mangel-Probanden stellen den ersten Bericht über eine Assoziation von IgA-Mangel mit HLA-DPB1 dar (Schönermarck, 1998).

Im Rahmen der Untersuchung einer Assoziation zwischen HLA-Merkmalen und der CLL erfolgte in der Gruppe gesunder Kontrollen aus Sachsen-Anhalt eine Analyse der Kombinationen von Allelen verschiedener HLA-Gene mittels der Formeln der Haplotyp-Analyse. Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen wurde nur für wenige Kombinationen zwischen

HLA-DPB1 und Allelen anderer Klasse-I- und -II-Merkmale eine signifikante Kopplung beobachtet (Baisch und Capra, 1993; Howell et al., 1993). Die Kopplungen mit der kleinsten Irrtumswahrscheinlichkeit innerhalb der MHC-Klasse-II-Region bestanden für die Kombinationen HLA-DRB1*0301:DPB1*0101 und HLA-DQB1*0201:DPB1*0101. Für die Kombination HLA-DRB1*0301:DPB1*0101 wurde bereits ein Kopplungsungleichgewicht unter kaukasoiden Probanden beschrieben (Howell et al., 1993; Tait et al., 1992). Vor dem Hintergrund der bekannten Kopplung zwischen HLA-DR3 und HLA-DQ2 lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf eine Kopplung von HLA-DPB1*0101 mit HLA-DR- und -DQ-Allelen innerhalb eines erweiterten Haplotypes HLA-DRB1*03:DQB1*02:DPB1*0101 schließen. Die Kopplungen zwischen HLA-DPB1-Allelen und HLA-Klasse-I-Merkmalen waren nur gering ausgeprägt. Das Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA-DPB1*0101 und HLA-B*8 sowie -Cw*07 ist durch den innerhalb der kaukasoiden Population häufigen, erweiterten Haplotyp HLA-B8:Cw7:DR3:DQ2 zu erklären (Ikaheimo et al., 1996). Dagegen ist die beobachtete Kopplung des Allels HLA-DPB1*1701 mit den Merkmalen HLA-Cw*06 und HLA-DRB1*0701 schwierig zu interpretieren. Allerdings kann in Anlehnung an Untersuchungen unter nicht-kaukasoiden Probanden (Bugawan et al., 1994; Trachtenberg et al., 1995) eine spezifische Kopplung für die Bevölkerung Mitteldeutschlands vermutet werden. Insgesamt wird damit die Existenz eines Kopplungsungleichgewichtes zwischen den HLA-DP- und HLA-DR- sowie -DQ-Merkmalen bestätigt. Diese Kopplungsungleichgewichte sind schwächer als die in der kaukasoiden Bevölkerung zwischen HLA-DRB1 und -DQB1 beobachteten Kopplungen (Tait et al., 1992). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für die Allele der im MHC zwischen den HLA-DR- und -DP-Genen befindlichen TAP1- und TAP2-Loci kein Kopplungsungleichgewicht existiert (Djilali-Saiah et al., 1996). Dieses Phänomen eines fehlenden Kopplungsungleichgewichtes innerhalb eines begrenzten Chromosomenabschnittes bei gleichzeitigem Kopplungsungleichgewicht zwischen den diesen Abschnitt flankierenden Genen ist einzigartig für den MHC und lässt eine im Bereich der TAP-Gene befindliche Zone hoher Rekombinations- bzw. Gen-Konversionsrate vermuten (Klitz et al., 1995). Die Ergebnisse der Arbeit unterstützen somit die Hypothese einer hohen genetischen Variabilität des MHC.

Die Frequenzen der HLA-DPB1-Allele in der kaukasoiden Bevölkerung Sachsen-Anhalts entsprechen der typischen kaukasoiden Verteilung. Sowohl der Vergleich mit anderen Populationen als auch die Analyse der Kombinationen von HLA-DPB1-Allelen mit anderen HLA-Merkmalen unterstützen die Hypothese, dass eine genetische Variabilität sowie eine natürliche Selektion die Populationsgenetik des MHC bestimmen. Dabei wird deutlich, dass für die Untersuchung der Krankheitsassoziationen von HLA-DPB1 die Typisierung einer Kontrollgruppe mit gegenüber den Patienten gleicher ethnischer und geographischer Herkunft notwendig ist.

5.3. HLA-Assoziation der CLL

Die vorgelegten Resultate unterstreichen die Bedeutung der DNA-Typisierung für die Untersuchung von HLA-Krankheitsassoziationen. Mittels serologischer Methoden war unter den untersuchten Patienten keine HLA-Assoziation der CLL nachweisbar, während anhand der DNA-Typisierung für mehrere HLA-Allele eine Assoziation demonstriert wurde. Frühere serologische Untersuchungen ergaben verschiedene HLA-Assoziationen der CLL, ohne dass ein eindeutiger Zusammenhang bestätigt werden konnte (Cuttner et al., 1994; Delmas-Marsalet et al., 1974; Dyer et al., 1986; Jones und Whittaker, 1991; Kilpatrick et al., 1984; Linet et al., 1988; Nunez-Roldan et al., 1982; Richter et al., 1973). Keine der beschriebenen Assoziationen konnte durch die vorliegende Studie bestätigt werden. Dagegen wurden Unterschiede in der Verteilung der HLA-Merkmale unter CLL-Patienten und gesunden Probanden aus Sachsen-Anhalt insbesondere für Allele der HLA-Klasse-II-Gene beobachtet. Die unter CLL-Patienten erhöhte Frequenz des Allels HLA-DRB4*0103 war bei Vergleich der Gesamtgruppen der einzige auch nach Korrektur signifikante Unterschied. Gleichzeitig bestand ein deutlicher, allerdings nach Korrektur nicht signifikanter Frequenzunterschied für HLA-DRB1*0401. Dies kann in Anlehnung an frühere Beobachtungen durch Dorak et al. als positive Assoziation der CLL mit dem Haplotyp HLA-DR4:DR53 interpretiert werden (Dorak et al., 1996). Diese Annahme wird durch das CLL-spezifische Kopplungsungleichgewicht der Kombination HLA-DRB1*0401:DRB4*0103 unterstützt, die möglicherweise auch der Beobachtung von Dorak et al. zugrunde lag.

Für die Allelkombination HLA-DRB1*0401:DQB1*0302 wurde sowohl eine positive Assoziation mit der CLL als auch ein gegenüber den Kontrollen stärkeres Kopplungsungleichgewicht unter CLL-Patienten beobachtet. Diese Allele sind Bestandteil des Haplotyps HLA-DR4:DQ8, für den eine Kopplung unter kaukasoiden Probanden beschrieben ist (Baur et al., 1984; Ikaheimo et al., 1996). Ausgehend von der positiven Assoziation der CLL mit der Allelkombination HLA-DRB1*0401:DRB4*0103 führt dies zu der Schlußfolgerung, dass die beobachtete CLL-Assoziation von HLA-DQB1*0302 das Resultat einer positiven Assoziation der CLL mit dem erweiterten Haplotyp HLA-DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 ist. Eine Assoziation dieses Haplotyps sowohl mit Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (IDDM) als auch mit Rheumatoider Arthritis (RA) wurde berichtet (Taneja et al., 1996; Yasunaga et al., 1996). Der Haplotyp HLA-DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 ist Bestandteil des kaukasoiden Haplotypes HLA-Cw3:B62:DR4:DQ8 (Ikaheimo et al., 1996). Es wurde jedoch in dieser Studie keine Assoziation der CLL mit den Merkmalen HLA-Cw*03 und -B*62 beobachtet. Die erhöhte Frequenz der Allelkombination HLA-Cw*03:B*62:DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 unter CLL-Patienten ist daher auf ein Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA-Klasse-I- und

-II-Merkmalen innerhalb des Haplotypes HLA-Cw3:B62:DR4:DQ8 zurückzuführen. Auch für diesen Haplotyp wurde eine positive Assoziation mit IDDM und spezifischen Formen der RA berichtet (Ollier et al., 1984; Tienari et al., 1992). Die für die ALL, AML und CML beschriebene Assoziation mit HLA-Cw3 (Bortin et al., 1987; De Moor et al., 1988) konnte in der vorliegenden Untersuchung für die CLL nicht bestätigt werden. Allerdings erfolgte in den früheren Studien keine DNA-Typisierung und Haplotypanalyse. Eine Assoziation dieser Leukämieformen mit HLA-Cw3-gekoppelten Klasse-II-Allelen des Haplotyps HLA-Cw*03:B*62:DR4:DR52:DQ8 blieb dadurch möglicherweise unentdeckt.

Auffällig war die Assoziation der CLL mit HLA-Merkmalen und Haplotypen, für die auch eine Assoziation mit Autoimmunerkrankungen besteht. In diesem Zusammenhang ist die erhöhte Rate an lymphoproliferativen Erkrankungen und Leukämien unter RA-Patienten bemerkenswert (Cibere et al., 1997; Prior, 1985). Bei keinem der untersuchten CLL-Patienten war eine Erkrankung an IDDM, RA oder eine zytotoxische Behandlung im Rahmen einer Autoimmunerkrankung bekannt. Eine Überschneidung dieser HLA-assoziierten Erkrankungen oder eine Ätiologie der CLL infolge Medikamenten-induzierter Immunsuppression ist daher unwahrscheinlich. Es kann geschlussfolgert werden, dass für die CLL, IDDM und RA eine Assoziation mit identischen HLA-DRB- und -DQB1-Allelen des HLA-Cw3:B62:DR4:DR53:DQ8-Haplotyps besteht. Dies lässt vermuten, dass ähnliche Mechanismen an der Pathogenese dieser unterschiedlichen Krankheiten beteiligt sind. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit der bekannt hohen Rate an Autoimmunphänomenen der CLL-Erkrankung (Dighiero et al., 1991).

Eine gegenüber der Kontrollgruppe im Sinne einer negativen Assoziation verringerte Frequenz wurde unter CLL-Patienten nur für das Allel HLA-DQB1*0202 beobachtet. Da dieser Unterschied nach Korrektur seine Signifikanz verlor, ist zu vermuten, dass die untersuchten MHC-Gene keinen protektiven Einfluss in der Pathogenese der CLL besitzen. Dieses Ergebnis belegt zugleich die Qualität der Typisierungsergebnisse, da bei einem systematischen Fehler eine gleichmäßige Streuung der positiven und negativen Assoziationen zu erwarten gewesen wäre.

In einer serologischen Untersuchung beschrieben Pawelec et al. (Pawelec et al., 1989) eine verringerte Frequenz des Merkmals HLA-DPw1 und eine erhöhte Frequenz der PLT-Spezifität HLA-DPw-blank unter CLL-Patienten. Dies kann für die in dieser Arbeit untersuchte Patientengruppe nicht bestätigt werden. Die nach Korrektur nicht signifikante Frequenzerhöhung des Allels HLA-DPB1*0301 war der einzige Unterschied in der Verteilung der erstmals in einer Gruppe von CLL-Patienten typisierten HLA-DPB1-Allele. Angesichts der bereits diskutierten hohen Varianz der Frequenz des Allels HLA-DPB1*0301 in kaukasoiden Bevölkerungen ist

eine Interpretation dieses Ergebnisses schwierig. Für den Morbus Hodgkin konnte eine schwache positive Assoziation mit HLA-DPB1*0301 in mehreren Studien belegt werden (Bateman und Howell, 1999; Klitz et al., 1994; Oza et al., 1994). Analog zur HLA-Assoziation des M. Hodgkin erhöht HLA-DPB1*0301 das Risiko einer CLL-Erkrankung um den Faktor Zwei. Für HLA-DPB1*0301 wurde darüber hinaus eine positive Assoziation mit seronegativer RA (Gao et al., 1991a), IDDM bei Patienten aus Mexiko (Erlich et al., 1996), Zöliakie (Bugawan et al., 1989) sowie mit Primärer biliärer Zirrhose (Mella et al., 1995) beschrieben. Analog zu den HLA-DR- und -DQ-Assoziationen scheinen somit für CLL und Autoimmunerkrankheiten Assoziationen mit identischen HLA-DPB1-Allelen zu bestehen. Zahlreiche Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass die relativ schwachen Assoziationen dieser Autoimmunerkrankungen mit HLA-DPB1*0301 auf Krankheitssubtypen beschränkt sind oder nur in bestimmten Populationen vorliegen. So wurde z. B. von Perdringer et al. eine Assoziation von HLA-DPB1*0401 mit ausschließlich seropositiver RA berichtet (Perdringer et al., 1992). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchung von Erlich et al. unter mexikanischen Patienten fanden Yamagata et al. keine Assoziation von HLA-DPB1-Allelen mit IDDM in einer Gruppe japanischer Patienten (Yamagata et al., 1991). Darüber hinaus existierte in der vorliegenden Studie für keine der Kombinationen zwischen HLA-DPB1*0301 einerseits und den weiteren CLL-assoziierten Allelen andererseits ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das mit HLA-DPB1*0301 verbundene erhöhte Erkrankungsrisiko für CLL unabhängig von den anderen CLL-assoziierten Allelen vorliegt. Abschließend ist festzustellen, dass sich die CLL hinsichtlich ihrer HLA-Assoziation von der mit HLA-A11 (Orgad et al., 1988), -B40 (Cameron et al., 1990), und -DPB1*0201 (Taylor et al., 1995) assoziierten Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) unterscheidet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der unterschiedlichen Pathologie und Ätiologie dieser beiden lymphoproliferativen Erkrankungen.

Für keines der CLL-assoziierten Merkmale wurde eine phänotypische Frequenz von 100 % unter CLL-Patienten beobachtet. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese HLA-Merkmale keinen notwendigen Faktor in der Pathogenese der CLL darstellen, sondern die Erkrankungssuszeptibilität erhöhen. Dabei sind mehrere pathogenetische Mechanismen vorstellbar. Zum einen ist eine HLA-assoziierte infektiöse Pathogenese möglich, wie sie z. B. im Falle der Ankylosierenden Spondylitis aufgrund einer Sequenzhomologie zwischen *Klebsiella-pneumoniae*-Proteinen und dem assoziierten HLA-Merkmal B*27 vermutet wird (MacLean, 1992). Es wurde demonstriert, dass HLA-Moleküle Viren als Rezeptor für eine Infektion der Zelle dienen können (Helenius et al., 1978). Allerdings ist eine viral induzierte maligne Transformation nur für murine und bovine Leukämie-Modelle (van Eijk et al., 1992; Zijlstra und Melief, 1986) nachgewiesen, während für die humane CLL bisher keine virale Pathogenese belegt ist (Faguét, 1994).

Eine andere Erklärung zur HLA-Assoziation von Tumorerkrankungen basiert auf der Beobachtung, dass maligne Zellen eine reduzierte Expression von MHC-Molekülen aufweisen (Finke et al., 1999; Vegh et al., 1993). Dazzi et al. konnten zeigen, dass CLL-B-Lymphozyten eine reduzierte Fähigkeit zur Antigenpräsentation besitzen, die allerdings nicht mit der HLA-Klasse-II-Expressionsdichte korreliert (Dazzi et al., 1995). Eine mögliche Erklärung besteht in dem gegenüber normalen B-Lymphozyten erhöhten Anteil der p35-Form der Invarianten Kette in CLL-Lymphozyten. Diese scheint mit den α - und β -Ketten der MHC-Moleküle stabile Trimere zu bilden und so eine Peptidpräsentation zu behindern (Veenstra et al., 1996). Ungeklärt ist allerdings, ob diese Anti-Tumor-Anergie der CLL an spezifische HLA-Allele gekoppelt ist, wie dies z. B. für die spezifisch mit HLA-B*07 assoziierte, reduzierte Präsentation von Tumorantigenen bei Zervixkarzinomen bekannt ist (Ellis et al., 1995). Neuere Untersuchungen zeigen, dass HLA-Klasse-I-Moleküle als inhibitorische Liganden für Natural-Killer-Lymphozyten fungieren und eine durch diese induzierte Zellyse verhindern (Colonna et al., 1993). Eine ähnliche Funktion wurde für die von Lymphom-Zelllinien exprimierte HLA-Klasse-II-Moleküle nachgewiesen (Lobo und Patel, 1994). Allerdings ist auch für diesen HLA-assozierten Mechanismus der Tumorphogenese ein allelspezifischer Zusammenhang nicht belegt.

Die dargestellten pathogenetischen Mechanismen der HLA-Krankheitsassoziationen sind an das exprimierte HLA-Molekül gebunden und müssen daher mit den Strukturmerkmalen der HLA-Moleküle in Zusammenhang stehen. So ist z. B. für den IDDM eine Abhängigkeit der HLA-assozierten Suszeptibilität von der elektrischen Ladung der Aminosäureposition 57 der HLA-DQ β -Kette belegt (Horn et al., 1988). Aus der Aminosäuresequenz der HLA-DRB- und -DQB-Allele lässt sich eine Assoziation der CLL sowohl mit der spezifischen Besetzung der Aminosäureposition 67 und 70 - 71 der HLA-DR β 1-Kette als auch mit der Aminosäureposition 57 der HLA-DQ β 1-Kette vermuten. Diese Aminosäurepositionen liegen im Bereich der Peptidbindenden-Grube und sind daher entscheidend für die Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Eine Relevanz der Peptidpräsentation und T-Zell-Aktivierung für die CLL-Pathogenese ist daher denkbar. Dagegen besteht im Fall des CLL-assozierten HLA-DRB4*0103-Allels kein offensichtlicher Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Die Allele HLA-DRB4*0101 und -DRB4*0103 unterscheiden sich nur in der Sequenz der Aminosäureposition 135 im Bereich der β 2-Domäne, die nicht an der Bildung der Peptidbindenden-Grube beteiligt ist. Inwiefern diese Aminosäureposition die Interaktion mit dem Korezeptor CD4 bestimmt, ist ungeklärt. Einschränkend ist festzuhalten, dass die für die Typisierung der HLA-DRB- und -DQB1-Merkmale verwendete PCR-SSP keine definitive Aussage über die HLA-DR β - und -DQ β -Sequenzen außerhalb der Primeregionen erlaubt. Dagegen wurde bei der PCR-SSO-Typisierung der HLA-DPB1-Allele eine unter CLL-Patienten erhöhte Frequenz von Allelen

gefunden, die an Position 69 für die basische Aminosäure Lysin anstatt der neutralen Aminosäure Glycin kodieren und zugleich an Position 65 ein für Isoleucin kodierendes Codon aufweisen. Díaz et al. konnten zeigen, dass der Position 69 der HLA-DP β 1-Kette eine entscheidende Bedeutung bei der Peptidpräsentation und der Aktivierung von T-Zellen zukommt (Díaz et al., 1998). Dies lässt auf eine Rolle der HLA-DP-restringierten T-Zell-Aktivierung in der Pathogenese der CLL als auch der mit HLA-DPB1*0301 assoziierten Autoimmunkrankheiten schließen. Dabei ist auch eine infektiöse Genese, wie sie im Falle der Assoziation von HLA-DPB1*0201 mit juveniler common-ALL vermutet wird, denkbar (Taylor et al., 1995).

Eine prinzipiell andere Hypothese zur Erklärung der HLA-Assoziation von Krankheiten basiert auf der Kopplung von HLA-Allelen mit anderen, noch nicht identifizierten, pathogenetisch relevanten Genen. Dabei ist insbesondere ein Kopplungsungleichgewicht mit den LMP-, TAP-, HLA-DM- und MHC-Klasse-III-Genen interessant. So wurde bereits eine Assoziation des polymorphen LMP2-Gens mit bestimmten Formen der RA demonstriert (Pryhuber et al., 1996). Einen Ansatz zur Erklärung des pathogenetischen Hintergrundes des beobachteten Zusammenhangs zwischen CLL und MHC-Allelen bietet die beschriebene Assoziation der CLL mit dem Allel TNF1 des polymorphen MHC-Klasse-III-Merkmals TNF- α (Demeter et al., 1997). Einerseits sind haplotypische Kopplungen zwischen HLA-Merkmalen und TNF-Allelen bekannt (Wilson et al., 1993). Andererseits ist für CLL-Lymphozyten eine autokrine Sekretion von TNF- α mit nachfolgender Stimulation der malignen klonalen Proliferation nachgewiesen (Hoffbrand et al., 1993). Somit wäre eine mit bestimmten HLA-Allelen assoziierte Expression spezifischer TNF- α -Allele denkbar, die eine maligne klonale Proliferation begünstigen.

Neben einer direkten Beteiligung an der Pathogenese der CLL ist auch eine Assoziation von HLA-Merkmalen mit Unterschieden in der Ausprägung und Progression der CLL-Erkrankung in Betracht zu ziehen. Sowohl das Geschlecht als auch das Alter der Patienten stehen in Zusammenhang mit der Prognose der CLL-Erkrankung (Catovsky et al., 1989). Männliche Patienten sowie früh erkrankte Patienten besitzen ein höheres Risiko, an den Folgen der CLL zu versterben. Die beobachteten Assoziationen zwischen HLA und CLL in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter der Patienten bei Erstdiagnose lassen darauf schließen, dass der HLA-Typ des Patienten im Zusammenhang mit der Prognose der Krankheit steht. Auffällig war, dass die Assoziation mit HLA-DRB4*0103 sich in allen Patientengruppen unabhängig vom Geschlecht und Alter bei Erstdiagnose widerspiegelte. Dies ist auch als ein Hinweis zu werten, dass die beobachtete Assoziation mit dem Haplotyp HLA-DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 insbesondere durch das HLA-Allel DRB4*0103 geprägt wird. Inwiefern die fehlende Assoziation für HLA-DRB1*0401 und -DQB1*0302 unter früh erkrankten männlichen Patienten im Zusam-

menhang mit der schlechteren Prognose dieser Patienten steht, bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenso ist die ausschließlich unter spät erkrankten Patienten verringerte Frequenz von HLA-DQB1*0201 schwierig zu interpretieren. Allerdings wird mit dem Auftreten der Frequenzunterschiede für HLA-DQB1*0201 und -DQB1*0302 in unterschiedlichen Patientengruppen deutlich, dass es sich bei den für diese Allele in der Gesamtgruppe beobachteten Differenzen nicht um kompensatorische Unterschiede infolge von Typisierungsfehlern handelte. Interessant ist die positive Assoziation der Merkmale HLA-Cw*06 und -B*18 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der Patienten. Es kann einerseits vermutet werden, dass die in früheren Studien unter kaukasoiden Patienten beschriebene positive Assoziation der CLL mit den Antigenen HLA-Cw6 (Linnet et al., 1988) und -B18 (Richter et al., 1973) durch einen hohen Anteil von früh bzw. spät erkrankten Patienten in der jeweiligen Studie resultierte. Andererseits war zum Zeitpunkt der Studie von Richter et al. eine Typisierung von HLA-Cw6 nur unzureichend möglich. Angesichts der bekannten Kopplung zwischen HLA-B18 und -Cw6 (Ikäheimo et al. 1996) bleibt es daher offen, inwiefern den Ergebnissen von Richter et al. möglicherweise eine Frequenzerhöhung von HLA-Cw6 zugrunde lag. Die Aussagefähigkeit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse hinsichtlich des Erkrankungsalters der Patienten ist jedoch eingeschränkt, da die Kontrollgruppe nicht die Altersstruktur der gesunden Bevölkerung widerspiegelte. Dies ist von Bedeutung, da über Assoziationen zwischen HLA-Merkmalen und der menschlichen Lebenserwartung berichtet wurde (Dorak et al., 1994b).

Auffällig war der auch nach Korrektur signifikant höhere Anteil an HLA-DRB3/4/5- und -DQB1-Homozygotien unter weiblichen CLL-Patienten. Diese Beobachtung erinnert an die von Dorak et al. berichtete Frequenzerhöhung von HLA-DR53-Homozygotien bei an Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) erkrankten Patienten und bei an juveniler common-ALL erkrankten männlichen Patienten (Dorak et al., 1994a; Dorak et al., 1995). Die Hypothese einer Assoziation von MHC-Klasse-II-Homozygotie mit erhöhtem CLL-Risiko wird durch weitere Beobachtungen gestützt. Der erhöhte Anteil von CD5⁺ B-Lymphozyten bei H-2^Z-homozygoten New-Zealand-Mäusen deutet auf einen Zusammenhang zwischen MHC-Homozygotie und dem Risiko der klonalen Proliferation von CD5⁺ Lymphozyten hin (Okamoto et al., 1993). Weiterhin wurde über eine erhöhte Frequenz von viral induzierten B-Zell-Lymphomen bei H-2 homozygoten Mäusen berichtet (Lilly et al., 1964; Vasmel et al., 1988). Ausgehend vom murinen Modell könnte für die CLL eine virale Infektion oder deren unzureichende immunologische Abwehr bei infolge einer HLA-Homozygotie vermindertem Spektrum der Antigenpräsentation pathogenetisch relevant sein. Andererseits kann ebenfalls ein Kopplungsungleichgewicht von HLA-Allelen mit benachbarten, für die Prognose der CLL relevanten rezessiven MHC-Genen vorliegen. So wurde für Non-Hodgkin Lymphome, zu denen auch die CLL gezählt wird, gezeigt, dass

eine enge Assoziation der Prognose der Erkrankung sowohl mit der TNF- α -Expression als auch mit dem Allel-Polymorphismus des TNF- α -Gens besteht (Salles et al., 1996; Warzocha et al., 1998). Weiterhin ist auch ein Zusammenhang zwischen HLA-assozierten, geschlechtsabhängigen Hormonspiegeln und der Pathogenese von Leukämien zu berücksichtigen. So wurde eine Assoziation von HLA-Cw3 mit erhöhten Transcortinwerten bei Patienten mit lymphatischen Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen berichtet (De Moor et al., 1988).

Diese Überlegungen verdeutlichen die Komplexität der nur unvollständig verstandenen Pathogenese der CLL. Aus Sicht des Autors stellen die CLL-assozierten HLA-Merkmale keinen für die Erkrankung notwendigen pathogenetischen Faktor dar, sondern prägen auf bisher nicht verstandene Weise das Erkrankungsrisiko sowie den Krankheitsverlauf. Die zahlreichen und zumeist schwachen HLA-Assoziationen der CLL sowie die Analogien mit der HLA-Assoziation von Autoimmunerkrankungen stimmen mit der Hypothese überein, dass bei der Pathogenese der CLL eine initiale Antigen-vermittelte Proliferation von B-Lymphozyten vorliegt, die nach einem mehrstufigen Mutationsprozess in einer malignen, monoklonalen Transformation resultiert (Gale et al., 1994). Gleichzeitig unterstützen die vorgelegten Ergebnisse auch die These, dass es sich bei der CLL um eine heterogene Erkrankung handeln könnte (Schroeder und Dighiero, 1994).

Zusammenfassend wird deutlich, dass:

- 1.) Die für alle Patienten beobachtete positive Assoziation der CLL mit HLA-DRB4*0103 und die CLL-spezifischen Kopplungen von Allelen des HLA-DR4:DR53:DQ8-Haplotypes auf eine Beteiligung der HLA-Merkmale an der Pathogenese der CLL hindeuten.
- 2.) Die für weibliche Patienten festgestellte positive Assoziation von HLA-DRB3/4/5- und HLA-DQB1-Homozygotie auf einen Zusammenhang zwischen MHC-Genen und geschlechtsspezifischem Erkrankungsrisiko hinweist.
- 3.) Die Assoziation von HLA-DPB1*0301 eine von den HLA-DR- und -DQ-Merkmalen unabhängigen Suszeptibilitätsfaktor in der zentromeren Region des MHC vermuten lässt.
- 4.) Die Assoziationen von CLL und Autoimmunerkrankungen mit identischen HLA-Merkmalen auf eine Immunpathogenese der CLL schließen lassen.

6. Zusammenfassung

Für verschiedene Krankheiten gilt ein Zusammenhang zwischen HLA-Merkmalen und Erkrankungsrisiko als gesichert. Die Entwicklung und Aktivierung spezifischer zellulärer und humoraler Effektormechanismen der erworbenen Immunität ist von der selektiven Präsentation antige-

ner Peptide durch die heterodimeren HLA-Moleküle abhängig. Gleichzeitig sind die im MHC lokalisierten Gene der HLA-Merkmale durch einen hohen Polymorphismus charakterisiert, dessen Verteilung populationspezifische Unterschiede aufweist. Die Bestimmung der Frequenzen der HLA-Merkmale in verschiedenen Bevölkerungsgruppen ist daher Voraussetzung für die Untersuchung einer möglichen Immunpathogenese HLA-assoziiierter Erkrankungen. Die Typisierung des HLA-DP-Merkmals, dessen Polymorphismus durch die Multiallelie des HLA-DPB1-Gens bestimmt wird, ist mit serologischen Methoden nur unzureichend möglich. Zu Beginn der vorliegenden Studie lagen nur wenige Daten zur HLA-DPB1-Verteilung in verschiedenen Bevölkerungsgruppen sowie zu HLA-DPB1-Krankheitsassoziationen vor.

Die CLL ist eine maligne Erkrankung, die durch eine monoklonale Proliferation von B-Lymphozyten gekennzeichnet ist. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung sind bisher nur wenig verstanden. Für die CLL wurde eine Assoziation mit verschiedenen, serologisch typisierten HLA-Merkmalen beschrieben, ohne dass eine definitive Assoziation gesichert ist. Daten zur HLA-DPB1-Verteilung bei CLL-Patienten liegen bisher nicht vor.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ausgehend von Referenzprotokollen eine Methode der HLA-DPB1-Typisierung basierend auf dem Prinzip der PCR-SSO entworfen und optimiert. Als kritisch für die Typisierung erwies sich die Temperatur des spezifischen TMAC-Waschschrittes sowie die Digoxigenin-Markierung der SSO-Sonden. Sechs neu entwickelte Sonden wurden erfolgreich getestet und für die Routinetypisierung verwandt. Das verwendete Set von 22 SSO-Sonden erlaubte die Differenzierung von 93 % der bekannten HLA-DPB1-Allele und wurde erfolgreich für die Typisierung von Referenz-DNA eingesetzt. Es wurde demonstriert, dass die Methode der PCR-SSO eine zuverlässige HLA-DPB1-Typisierung ermöglicht.

Mit der entwickelten PCR-SSO-Methode wurden die HLA-DPB1-Allele von 157 gesunden kaukasoiden Probanden aus Sachsen-Anhalt typisiert. Auch bei Berücksichtigung der zwischenzeitlich neu beschriebenen HLA-DPB1-Allele erlaubte die angewandte Methode bei allen Probanden eine eindeutige Typisierung. Die beobachtete HLA-DPB1-Frequenzverteilung entsprach der für kaukasoiden Populationen typischen Verteilung. Das häufigste Allel HLA-DPB1*0401 trat mit einer phänotypischen Frequenz von ca. 68 % auf; die Allele HLA-DPB1*0101, -DPB1*0201, -DPB1*0301 und -DPB1*0402 fanden sich mit einer Frequenz von jeweils 10 - 30 %, während alle anderen Allele mit Frequenzen < 10 % beobachtet wurden. Die im Vergleich zu anderen Untersuchungen beobachtete Varianz der Frequenzen verschiedener HLA-DPB1-Allele in kaukasoiden Populationen kann einerseits mit Unterschieden in Abhängigkeit von der geographischen Herkunft der Probanden erklärt werden. Andererseits wurde

deutlich, dass für die Untersuchung der Krankheitsassoziationen von HLA-DPB1 die Typisierung von gesunden und zufällig ausgewählten Kontrollprobanden notwendig ist. Die Ergebnisse bestätigen gleichzeitig, dass sich die typische kaukasoide HLA-DPB1-Allelverteilung von der Verteilung in Populationen anderer Abstammung unterscheidet. Damit wird deutlich, dass die Vererbung des HLA-DP-Merkmals durch eine genetische Variabilität und Selektion charakterisiert ist, wie sie für die anderen HLA-Merkmale vermutet wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Frequenzen der HLA-DPB1-Allele und weiterer HLA-Merkmale in einer Gruppe von 101 CLL-Patienten bestimmt und mit der Verteilung in der Kontrollgruppe verglichen. Dabei wurde eine erhöhte Frequenz des Allels HLA-DPB1*0301 festgestellt, während sich die Frequenzen der weiteren HLA-DPB1-Allele nicht von der Normalverteilung unterschieden. Auffällig war ein unter CLL-Patienten erhöhter Anteil der Allele, die an Position 65 und 69 der HLA-DPB1-Kette für die Aminosäuren Isoleucin bzw. Lysin und an Position 55 - 57 für die Sequenz AspGluAsp kodieren. Keiner dieser Unterschiede behielt seine Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche bei.

Es wurden zwischen CLL-Patienten und Kontrollen keine Unterschiede in der Verteilung der serologisch bestimmten HLA-A-, -B- und -DR-Antigene sowie in der Verteilung der in niedrigauflösender molekulargenetischer Typisierung bestimmten HLA-A-, -B- und -Cw-Merkmale beobachtet. Dagegen war unter CLL-Patienten die Frequenz der molekulargenetisch bestimmten Allele HLA-DRB4*0103, -DRB1*0401 und -DQB1*0302 erhöht und die des Allels HLA-DQB1*0202 verringert. Gleichzeitig war der Anteil der Gesamtzahl von Homozygoten der HLA-DQB1-Allele unter CLL-Patienten erhöht. Die Erhöhung der Frequenz des Allels HLA-DRB4*0103 war unabhängig vom Vorliegen des Merkmals HLA-DRB4 (DR53) und behielt ihre Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche bei. Dieser Unterschied stellte sich unabhängig vom Geschlecht und vom Alter der Patienten bei Erstdiagnose dar. Für die Allele HLA-DRB1*0401 und -DQB1*0302 fand sich die Frequenzerhöhung in allen Patientengruppen mit Ausnahme der Gruppe der männlichen Patienten mit einem Erkrankungsalter < 61 Jahren. Die erhöhte Frequenz der HLA-DQB1-Homozygoten betraf nur weibliche Patienten. Die Frequenz des Allels HLA-DQB1*0202 war nur unter Patienten mit einem Erkrankungsalter ≥ 61 Jahre verringert.

Weiterhin wurde das Kopplungsungleichgewicht ausgewählter Allelkombinationen untersucht. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen wurden für HLA-DPB1-Allele unter kaukasoide Probanden nur wenige und relativ schwache Kopplungen mit anderen HLA-Merkmalen beobachtet. Die bekannte Kopplung von HLA-DPB1*0101 mit HLA-DRB1*0301 konnte in

dieser Studie als Kopplung von HLA-DPB1*0101 mit Merkmalen des erweiterten Haplotyps HLA-B8:Cw7:DR3:DQ2 bestätigt werden. Allerdings fand sich diese Kopplung ausschließlich in der Kontrollgruppe, während unter CLL-Patienten für HLA-DPB1-Allele nur ein Kopplungsungleichgewicht für die Kombination HLA-DRB1*0701:DPB1*1701 bestand. Die Analyse der Kombinationen von CLL-assoziierten HLA-Allelen mit anderen HLA-Merkmalen ergab eine positive Assoziation der CLL mit den Allelkombinationen HLA-DRB4*0103:DQB1*0302 und HLA-DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 sowie der erweiterten Kombination HLA-Cw*03:B*62:DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302. Es wurde dabei ein CLL-spezifisches, auch nach Korrektur für multiple Vergleiche signifikantes Kopplungsungleichgewicht für die Kombinationen HLA-DRB1*0401:DRB4*0103 und HLA-DRB4*0103:DQB1*0302 festgestellt. Es bestanden keine Kopplungsungleichgewichte für Kombinationen des CLL-assoziierten Allels HLA-DPB1*0301 mit anderen HLA-Merkmalen.

Der Vergleich der Verteilung der HLA-Merkmale hinsichtlich des Alters bei Erstdiagnose und des Geschlechtes der Patienten ergab eine erhöhte Frequenz des Merkmals HLA-Cw*06 unter Patienten mit einem Erkrankungsalter < 61 Jahre sowie des Merkmals HLA-B*18 bei Patienten mit einem Erkrankungsalter > 72 Jahre. Unter weiblichen Patienten fand sich eine erhöhte Frequenz der Gesamtzahl der Homozygotien der Merkmale HLA-DRB1/3/4/5 sowie der HLA-DQB1-Homozygotien.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die HLA-Merkmale einen Faktor der komplexen Pathogenese der CLL darstellen. Dabei ist interessant, dass für die CLL eine positive Assoziation mit Allelen des HLA-DR4:DR53:DQ8 Haplotyps besteht, für den gleichzeitig eine Assoziation mit Autoimmunerkrankungen als gesichert gilt. Die Kopplungsanalyse der erstmals in einer Gruppe von CLL-Patienten typisierten HLA-DPB1-Allele lässt vermuten, dass die Assoziation der CLL mit HLA-DPB1*0301 unabhängig von der Assoziation mit HLA-DR- und -DQ-Merkmalen ist. Die denkbaren zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen bestehen sowohl in einer HLA-abhängigen infektiösen Ätiologie, als auch in einer herabgesetzten HLA-abhängigen Anti-Tumoraktivität. Andererseits ist eine Kopplung zwischen HLA-Allelen und anderen, pathogenetisch relevanten Genen möglich. Die beobachteten alters- und geschlechtsspezifischen HLA-Assoziationen unterstützen die Hypothese, dass die HLA-Merkmale für die Pathogenese der CLL nicht entscheidend sind, jedoch das Risiko der malignen Lymphozytenproliferation sowie die Prognose der Erkrankung beeinflussen. Insbesondere das mit einer Homozygotie im HLA-DR- und -DQ-Bereich assoziierte erhöhte Erkrankungsrisiko unter weiblichen Patienten bestätigt frühere Untersuchungen, in denen ein mit MHC-Homozygotie assoziiertes Risiko monoklonaler Lymphozytenproliferation beschrieben wurde.

7. Literaturverzeichnis

- 1 al-Daccak R, Wang FQ, Theophile D, Lethielleux P, Colombani J, Loiseau P: Gene polymorphism of HLA-DPB1 and DPA1 loci in caucasoid population: frequencies and DPB1-DPA1 associations. *Hum Immunol* 31 (1991) 277-285
- 2 Amiel JL: Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In: Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi RM (Hrsg): *Histocompatibility Testing 1967*. Munksgaard, Copenhagen, 1967, S. 79-81
- 3 Angelini G, de Preval C, Gorski J, Mach B: High-resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 4489-4493
- 4 Arp EW, Jr., Wolf PH, Checkoway H: Lymphocytic leukemia and exposures to benzene and other solvents in the rubber industry. *J Occup Med* 25 (1983) 598-602
- 5 Bach F, Hirschorn K: Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility test in vitro. *Science* 143 (1964) 813-814
- 6 Baisch JM, Capra JD: Linkage disequilibrium within the HLA complex does not extend into HLA- DP. *Scand J Immunol* 37 (1993) 499-503
- 7 Bateman AC, Howell WM: Human leukocyte antigens and cancer: is it in our genes? *J Pathol* 188 (1999) 231-236
- 8 Baur MP, Danilovs JA: Population analysis of HLA-A, B, C, DR and other genetic markers. In: Terasaki PJ (Hrsg): *Histocompatibility Testing 1980*. Munksgaard, Copenhagen, 1980, S. 955-993
- 9 Baur MP, Neugebauer M, Albert ED: Reference tables of two-locus haplotype frequencies for all MHC marker loci. In: Albert ED, Baur MP, Mayr WR (Hrsg): *Histocompatibility Testing 1984*. Springer, Berlin, New York, Tokyo (usw.), 1984, S. 677
- 10 Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, Erlich HA, Klitz W: Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol* 148 (1992) 249-258
- 11 Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48 (1981) 198-206
- 12 Bizzozero OJ, Johnson KG, Ciocco A, Kawasaki S, Toyoda S: Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-1964. *Ann Intern Med* 55 (1967) 522-530

- 13 Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329 (1987a) 512-518
- 14 Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329 (1987b) 506-512
- 15 Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* 49 (1997) 297-321
- 16 Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR: Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* 46 (1995) 1-18
- 17 Bodmer WF: Evolutionary significance of the HL-A system. *Nature* 237 (1972) 139-145
- 18 Bodmer WF: HLA: what's in a name? A commentary on HLA nomenclature development over the years. *Tissue Antigens* 49 (1997) 293-296
- 19 Bortin MM, D'Amaro J, Bach FH, Rimm AA, van Rood JJ: HLA associations with leukemia. *Blood* 70 (1987) 227-232
- 20 Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97 (1968) 77-89
- 21 Brooks CF, Moore M: Differential MHC class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells. *Immunology* 63 (1988) 303-311
- 22 Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364 (1993) 33-39
- 23 Bugawan TL, Angelini G, Larrick J, Auricchio S, Ferrara GB, Erlich HA: A combination of a particular HLA-DP beta allele and an HLA-DQ heterodimer confers susceptibility to coeliac disease. *Nature* 339 (1989) 470-473
- 24 Bugawan TL, Begovich AB, Erlich HA: Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes. *Immunogenet* 32 (1990) 231-241
- 25 Bugawan TL, Chang JD, Klitz W, Erlich HA: PCR/oligonucleotide probe typing of HLA class II alleles in a Filipino population reveals an unusual distribution of HLA haplotypes. *Am J Hum Genet* 54 (1994) 331-340

- 26 Bugawan TL, Horn GT, Long CM, Mickelson E, Hansen JA, Ferrara GB, Angelini G, Erlich HA: Analysis of HLA-DP allelic sequence polymorphism using the in vitro enzymatic DNA amplification of DP-alpha and DP-beta loci. *J Immunol* 141 (1988) 4024-4030
- 27 Cameron ES, Labastide WB, Wilson V, Charles W, Holder Y, Reid HF: Immunophenotypic and HLA studies in childhood acute lymphoblastic leukemia in Trinidad, West Indies. *Leukemia* 4 (1990) 615-619
- 28 Campbell RD, Trowsdale J: Map of the human MHC. *Immunol Today* 14 (1993) 349-352
- 29 Catovsky D, Fooks J, Richards S: Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol* 72 (1989) 141-149
- 30 Celis E, Larson J, Otvos L, Jr., Wunner WH: Identification of a rabies virus T cell epitope on the basis of its similarity with a hepatitis B surface antigen peptide presented to T cells by the same MHC molecule (HLA-DPw4). *J Immunol* 145 (1990) 305-310
- 31 Cerna M, Fernandez-Vina M, Ivaskova E, Stastny P: Comparison of HLA class II alleles in Gypsy and Czech populations by DNA typing with oligonucleotide probes. *Tissue Antigens* 39 (1992) 111-116
- 32 Cesbron A, Moreau P, Cheneau ML, Cury S, Milpied N, Muller JY, Harousseau JL, Bignon JD: Crucial role of the third and fourth hypervariable regions of HLA-DPB1 allelic sequences in primary mixed-lymphocyte reaction: application in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 25 (1993) 1232-1233
- 33 Chien A, Edgar DB, Trela JM: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127 (1976) 1550-1557
- 34 Cibere J, Sibley J, Haga M: Rheumatoid arthritis and the risk of malignancy. *Arthritis Rheum* 40 (1997) 1580-1586
- 35 Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL: HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 12000-12004
- 36 Cresswell P: Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 259-293
- 37 Cresswell P, Androlewicz MJ, Ortmann B: Assembly and transport of class I MHC-peptide complexes. *Ciba Found Symp* 187 (1994) 150-162
- 38 Cuttner J, Skerrett D, Rosina O, Troy KM, Wallenstein S, Spivack M: Increased incidence of HLA antigen B35 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 18 (1994) 565-567
- 39 Dausset J: Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 4 (1954) 190-198

- 40 Dausset J: Iso-leuco-anticorps. *Acta Haemat* 20 (1958) 156-158
- 41 Davis MM, Bjorkman PJ: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334 (1988) 395-402
- 42 Dazzi F, D'Andrea E, Biasi G, De Silvestro G, Gaidano G, Schena M, Tison T, Vianello F, Girolami A, Caligaris-Cappio F: Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin Immunol Immunopathol* 75 (1995) 26-32
- 43 De Moor P, Boogaerts M, Louwagie A: More familial leukaemia in ALL patients with both unexplained high transcortin levels and an HLA antigen Cw3. *Br J Haematol* 69 (1988) 225-227
- 44 Delmas-Marsalet Y, Hors J, Colombani J, Dausset J: Study of HL-A genotypes in a case of familial chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Tissue Antigens* 4 (1974) 441-445
- 45 Demeter J, Porzolt F, Ramisch S, Schmidt D, Schmid M, Messer G: Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 97 (1997) 107-112
- 46 Diaz G, Catalfamo M, Coiras MT, Alvarez AM, Jaraquemada D, Nombela C, Sanchez-Perez M, Arroyo J: HLA-DPbeta residue 69 plays a crucial role in allorecognition. *Tissue Antigens* 52 (1998) 27-36
- 47 Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL: B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* 78 (1991) 1901-1914
- 48 Djilali-Saiah I, Benini V, Daniel S, Assan R, Bach JF, Caillat-Zucman S: Linkage disequilibrium between HLA class II (DR, DQ, DP) and antigen processing (LMP, TAP, DM) genes of the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens* 48 (1996) 87-92
- 49 Dorak MT, Chalmers EA, Gaffney D, Wilson DW, Galbraith I, Henderson N, Worwood M, Mills KI, Burnett AK: Human major histocompatibility complex contains several leukemia susceptibility genes. *Leuk Lymphoma* 12 (1994a) 211-222
- 50 Dorak MT, Machulla HK, Hentschel M, Mills KI, Langner J, Burnett AK: Influence of the major histocompatibility complex on age at onset of chronic lymphoid leukaemia. *Int J Cancer* 65 (1996) 134-139
- 51 Dorak MT, Mills KI, Gaffney D, Wilson DW, Galbraith I, Henderson N, Burnett AK: Homozygous MHC genotypes and longevity. *Hum Hered* 44 (1994b) 271-278
- 52 Dorak MT, Owen G, Galbraith I, Henderson N, Webb D, Mills KI, Darke C, Burnett AK: Nature of HLA-associated predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 9 (1995) 875-878
- 53 Dyer PA, Ridway JC, Flanagan NG: HLA-A,B and DR antigens in chronic lymphocytic leukaemia. *Dis Markers* 4 (1986) 231-237

- 54 Eiermann TH, Fakler J, Muller CR, Ballas M, Goldmann SF: HLA-DPB1 oligonucleotide typing of a southwest German Caucasian population. *Tissue Antigens* 38 (1991) 193-198
- 55 Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, et al.: The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med* 1 (1995) 464-470
- 56 Engelhard VH: Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 181-207
- 57 Erlich H, Bugawan T, Begovich AB, Scharf S, Griffith R, Saiki R, Higuchi R, Walsh PS: HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. *Eur J Immunogenet* 18 (1991) 33-55
- 58 Erlich HA, Rotter JI, Chang JD, Shaw SJ, Raffel LJ, Klitz W, Bugawan TL, Zeidler A: Association of HLA-DPB1*0301 with IDDM in Mexican-Americans. *Diabetes* 45 (1996) 610-614
- 59 Faguet GB: Chronic lymphocytic leukemia: an updated review. *J Clin Oncol* 12 (1994) 1974-1990
- 60 Ferencik S, Grosse-Wilde H: Caucasian German Normal. In: Terasaki P, Gjertson DW (Hrsg): *HLA 1997*. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 1998, S. 222
- 61 Fernandez-Vina M, Moraes ME, Stastny P: DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. III. Typing for 24 alleles of HLA-DP. *Hum Immunol* 30 (1991) 60-68
- 62 Finke J, Ferrone S, Frey A, Mufson A, Ochoa A: Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today* 20 (1999) 158-160
- 63 Fling SP, Arp B, Pious D: HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368 (1994) 554-558
- 64 Fugger L, Morling N, Ryder LP, Odum N, Svejgaard A: Technical aspects of typing for HLA-DP alleles using allele-specific DNA in vitro amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. Detection of single base mismatches. *J Immunol Methods* 129 (1990) 175-185
- 65 Gale RP, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Keating M, Montserrat E, Rai K: Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. *International Workshop on chronic Lymphocytic Leukemia*. *Leukemia* 8 (1994) 1610-1614
- 66 Gao X, Fernandez-Vina M, Olsen NJ, Pincus T, Stastny P: HLA-DPB1*0301 is a major risk factor for rheumatoid factor-negative adult rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34 (1991a) 1310-1312

- 67 Gao XJ, Sun YP, An JB, Fernandez-Vina M, Qou JN, Lin L, Stastny P: DNA typing for HLA-DR, and -DP alleles in a Chinese population using the polymerase chain reaction (PCR) and oligonucleotide probes. *Tissue Antigens* 38 (1991b) 24-30
- 68 Germain RN: MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76 (1994) 287-299
- 69 Gilchrist FC, Bunce M, Lympany PA, Welsh KI, du Bois RM: Comprehensive HLA-DP typing using polymerase chain reaction with sequence-specific primers and 95 sequence-specific primer mixes. *Tissue Antigens* 51 (1998) 51-61
- 70 Giles RC, DeMars R, Chang CC, Capra JD: Allelic polymorphism and transassociation of molecules encoded by the HLA-DQ subregion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 1776-1780
- 71 Glimcher LH, Kara CJ: Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol* 10 (1992) 13-49
- 72 Gorer PA: The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br J Exp Path* 17 (1936) 42-50
- 73 Gunz FW, Gunz JP, Veale AM, Chapman CJ, Houston IB: Familial leukaemia: a study of 909 families. *Scand J Haematol* 15 (1975) 117-131
- 74 Gunz FW, Gunz JP, Vincent PC, Bergin M, Johnson FL, Bashir H, Kirk RL: Thirteen cases of leukemia in a family. *J Natl Cancer Inst* 60 (1978) 1243-1250
- 75 Guo HC, Jardetzky TS, Garrett TP, Lane WS, Strominger JL, Wiley DC: Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 360 (1992) 364-366
- 76 Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC: *bcl-2* gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82 (1993) 1820-1828
- 77 Helenius A, Morein B, Fries E, Simons K, Robinson P, Schirrmacher V, Terhorst C, Strominger JL: Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1978) 3846-3850
- 78 Hermann E, Mayet WJ, Thomssen H, Sieper J, Poralla T, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B: HLA-DP restricted Chlamydia trachomatis specific synovial fluid T cell clones in Chlamydia induced Reiter's disease. *J Rheumatol* 19 (1992) 1243-1246
- 79 Hoffbrand AV, Panayiotidis P, Reittie J, Ganeshaguru K: Autocrine and paracrine growth loops in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 30 (1993) 306-317
- 80 Horn GT, Bugawan TL, Long CM, Erlich HA: Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: relationship to serology and to insulin-dependent diabetes susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 6012-6016

- 81 Howell WM, Evans PR, Devereux SA, Sage DA, Smith JL, Haegert DG: Absence of strong HLA-DR/DQ-DP linkage disequilibrium in the British and French Canadian Caucoid populations. *Eur J Immunogenet* 20 (1993) 363-371
- 82 Howell WM, Sage DA, Evans PR, Smith JL, Francis GS, Haegert DG: No association between susceptibility to multiple sclerosis and HLA- DPB1 alleles in the French Canadian population. *Tissue Antigens* 37 (1991a) 156-160
- 83 Howell WM, Sage DA, Haegert DG, Evans PR, Smith JL: PCR-SSO typing for HLA-DPB alleles. *Eur J Immunogenet* 18 (1991b) 81-95
- 84 Ikaheimo I, Silvennoinen-Kassinen S, Tiilikainen A: HLA five-locus haplotypes in Finns. *Eur J Immunogenet* 23 (1996) 321-328
- 85 Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T: Estimation of allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg): *HLA 1991*. Vol. 1. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1992, S. 76-79
- 86 Innis M, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, London, Boston (usw.), 1990
- 87 International-Workshop-on-Chronic-Lymphocytic-Leukemia: Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Ann Intern Med* 110 (1989) 236-238
- 88 Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ: Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 369 (1994) 750-752
- 89 Janeway CA, Hogquist KA, Bevan MJ: The T-cell receptor as a multicompetent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* 10 (1992) 645-674
- 90 Jones HP, Whittaker JA: Chronic lymphatic leukaemia: an investigation of HLA antigen frequencies and white cell differential counts in patients, relatives and controls. *Leuk Res* 15 (1991) 543-549
- 91 Kappes D, Strominger JL: Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem* 57 (1988) 991-1028
- 92 Kelly A, Trowsdale J: Complete nucleotide sequence of a functional HLA-DP beta gene and the region between the DP beta 1 and DP alpha 1 genes: comparison of the 5' ends of HLA class II genes. *Nucleic Acids Res* 13 (1985) 1607-1621
- 93 Kennedy LJ, Poulton KV, Dyer PA, Ollier WE, Thomson W: Definition of HLA-C alleles using sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). *Tissue Antigens* 46 (1995) 187-195
- 94 Kilpatrick DC, Dewar AE, Stockdill G, Maginnis M, Jordan A, Neill GW, Gelsthorpe K, Yap PL: Histocompatibility antigen frequencies in patients with chronic lymphocytic

- leukaemia: possible identification of a subgroup with relatively benign disease. *Scand J Haematol* 33 (1984) 391-396
- 95 Kimura A, Dong RP, Harada H, Sasazuki T: DNA typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg): HLA 1991. Vol. 1. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1992, S. 419-425
- 96 Kimura A, Sasazuki T: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA typing technique. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg): HLA 1991. Vol. 1. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1992, S. 397-419
- 97 Kipps TJ: The CD5 B cell. *Adv Immunol* 47 (1989) 117-185
- 98 Kipps TJ: Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ (Hrsg): Hematology. McGraw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco (usw.), 1995, S. 1017-1039
- 99 Klein J: Natural History of the Major Histocompatibility Complex. Wiley and Sons, New York, 1986
- 100 Klitz W, Aldrich CL, Fildes N, Horning SJ, Begovich AB: Localization of predisposition to Hodgkin disease in the HLA class II region. *Am J Hum Genet* 54 (1994) 497-505
- 101 Klitz W, Stephens JC, Grote M, Carrington M: Discordant patterns of linkage disequilibrium of the peptide-transporter loci within the HLA class II region. *Am J Hum Genet* 57 (1995) 1436-1444
- 102 Kuhner MK, Peterson MJ: Genetic exchange in the evolution of the human MHC class II loci. *Tissue Antigens* 39 (1992) 209-215
- 103 Lechler R: HLA and Disease. Academic Press, London, Boston, San Diego (usw.), 1994
- 104 Lilly F, Boyse EA, Old LJ: Genetic basis of susceptibility to viral leukemogenesis. *Lancet* (1964) 1207-1209
- 105 Linet MS, Bias WB, Dorgan JF, McCaffrey LD, Humphrey RL: HLA antigens in chronic lymphocytic leukemia. *Tissue Antigens* 31 (1988) 71-78
- 106 Linet MS, Cartwright RA: Chronic lymphocytic leukemia: epidemiology and etiologic findings. *Nouv Rev Fr Hematol* 30 (1988) 353-357
- 107 Lobo PI, Patel HC: A novel role for MHC class II antigens: evidence implicating a protective effect on tumour cells against cytotoxicity by NK and LAK cells. *Immunology* 83 (1994) 240-244
- 108 MacLean L: HLA-B27 subtypes: implications for the spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 51 (1992) 929-931

- 109 Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC: The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70 (1992) 1035-1048
- 110 Mantovani V, Corazza GR, Frisoni M, Zaniboni MG, Bragliani M, Valentini RA, Barboni P, Lambertini A, Gasbarrini G: HLA-DP polymorphism in northern Italian celiac patients. *Tissue Antigens* 40 (1992) 182-186
- 111 Marsh SG, Bodmer JG: HLA class II region nucleotide sequences, 1995. *Tissue Antigens* 46 (1995) 258-280
- 112 Mattiuz PL, Ihde D, Piazza A, Cepellini R, Bodmer WF: New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HLA system. In: Terasaki PI (Hrsg): *Histocompatibility Testing 1970*. Munksgaard, Copenhagen, 1970, S. 193-205
- 113 Mawas C, Charmot D, Sivy M, Mercier P, North ML, Hauptmann G: A weak human MLCR locus mapping at the right of a crossing-over between HLA-D, Bf and GLO. *J Immunogenet* 5 (1978) 383-395
- 114 May J, Mockenhaupt FP, Loliger CC, Ademowo GO, Falusi AG, Jenisch S, Dippmann K, Schnittger L, Kreamsner PG, Bienzle U, Meyer CG: HLA DPA1/DPB1 genotype and haplotype frequencies, and linkage disequilibria in Nigeria, Liberia, and Gabon. *Tissue Antigens* 52 (1998) 199-207
- 115 Mella JG, Roschmann E, Maier KP, Volk BA: Association of primary biliary cirrhosis with the allele HLA-DPB1*0301 in a German population. *Hepatology* 21 (1995) 398-402
- 116 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 1215
- 117 Mittal KK: The HLA polymorphism and susceptibility to disease. *Vox Sang* 73 (1976) 161-173
- 118 Monaco JJ: A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol Today* 13 (1992) 173-179
- 119 Moraes ME, Fernandez-Vina M, Salatiel I, Tsai S, Moraes JR, Stastny P: HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. *Tissue Antigens* 41 (1993) 238-242
- 120 Mueller-Eckhardt G, Kiefel V, Tlusty A, Scholten J, Schmidt A, Mueller-Eckhardt C: Incidence and specificity of HLA-DP antibodies in pregnancy sera. *Hum Immunol* 29 (1990) 166-174
- 121 Müller CR, Eiermann TH: How many probes are needed for HLA-DPB1 typing with sequence-specific oligonucleotide probes? A theoretical approach using computer simulation. *Hum Immunol* 30 (1991) 22-26

- 122 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 (1986) 263-273
- 123 Mytilineos J, Deufel A, Opelz G: Clinical relevance of HLA-DPB locus matching for cadaver kidney retransplants: a report of the Collaborative Transplant Study. *Transplantation* 63 (1997) 1351-1354
- 124 Naruse TK, Nose Y, Kagiya M, Liao G, Nabeya N, Kimura M, Isshiki G, Inoko H: Cloned primed lymphocyte test cells recognize the fourth, fifth, and sixth hypervariable regions at amino acid positions 65-87 of the DPB1 molecule. *Hum Immunol* 42 (1995) 123-130
- 125 Neefjes JJ, Momburg F: Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 5 (1993) 27-34
- 126 Noble JA, Cavalli AS, Erlich HA: DPB1*5901a: a novel HLA-DPB1 allele from a Caucasian family with insulin-dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 47 (1996) 159-162
- 127 Nomura N, Ota M, Kato S, Inoko H, Tsuji K: Severe acute graft-versus-host disease by HLA-DPB1 disparity in recombinant family of bone marrow transplantation between serologically HLA-identical siblings: an application of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. *Hum Immunol* 32 (1991) 261-268
- 128 Nunez-Roldan A, Szer I, Toguchi T, Cuttner J, Winchester R: Association of certain Ia allotypes with the occurrence of chronic lymphocytic leukemia. Recognition by a monoclonal anti-Ia reagent of a susceptibility determinant not in the DR series. *J Exp Med* 156 (1982) 1872-1877
- 129 Ohta T: Role of diversifying selection and gene conversion in evolution of major histocompatibility complex loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 6716-6720
- 130 Okada K, Prentice HL, Boss JM, Levy DJ, Kappes D, Spies T, Raghupathy R, Mengler RA, Auffray C, Strominger JL: SB subregion of the human major histocompatibility complex: gene organization, allelic polymorphism and expression in transformed cells. *EMBO J* 4 (1985) 739-748
- 131 Okamoto H, Nishimura H, Shinozaki A, Zhang D, Hirose S, Shirai T: H-2z homozygous New Zealand mice as a model for B-cell chronic lymphocytic leukemia: elevated bcl-2 expression in CD5 B cells at premalignant and malignant stages. *Jpn J Cancer Res* 84 (1993) 1273-1278
- 132 Ollier W, Venables PJ, Mumford PA, Maini RN, Awad J, Jaraquemada D, D'Amaro J, Festenstein H: HLA antigen associations with extra-articular rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 24 (1984) 279-291

- 133 Orgad S, Cohen IJ, Neumann Y, Vogel R, Kende G, Ramot B, Zaizov R, Gazit E: HLA-A11 is associated with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia* 2 (1988) 79S-87S
- 134 Oza AM, Tonks S, Lim J, Fleetwood MA, Lister TA, Bodmer JG: A clinical and epidemiological study of human leukocyte antigen-DPB alleles in Hodgkin's disease. *Cancer Res* 54 (1994) 5101-5105
- 135 Parham P, Lawlor DA, Lomen CE, Ennis PD: Diversity and diversification of HLA-A,B,C alleles. *J Immunol* 142 (1989) 3937-3950
- 136 Pawelec G, Rehbein A, Schaudt K, Busch FW: Frequencies of HLA-DP alleles in the four major types of leukaemia. *Tissue Antigens* 34 (1989) 138-140
- 137 Perdriger A, Guggenbuhl P, Chales G, Le Dantec P, Yaouanq J, Genetet B, Pawlotsky Y, Semana G: The role of HLA-DR-DR and HLA-DR-DP interactions in genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 46 (1996) 42-48
- 138 Perdriger A, Semana G, Quillivic F, Chales G, Chardevel F, Legrand E, Meadeb J, Fauchet R, Pawlotsky Y: DPB1 polymorphism in rheumatoid arthritis: evidence of an association with allele DPB1 0401. *Tissue Antigens* 39 (1992) 14-18
- 139 Petersdorf EW, Smith AG, Mickelson EM, Longton GM, Anasetti C, Choo SY, Martin PJ, Hansen JA: The role of HLA-DPB1 disparity in the development of acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 81 (1993) 1923-1932
- 140 Prior P: Cancer and rheumatoid arthritis: epidemiologic considerations. *Am J Med* 78 (1985) 15-21
- 141 Pryhuber KG, Murray KJ, Donnelly P, Passo MH, Maksymowych WP, Glass DN, Giannini EH, Colbert RA: Polymorphism in the LMP2 gene influences disease susceptibility and severity in HLA-B27 associated juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23 (1996) 747-752
- 142 Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46 (1975) 219-234
- 143 Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O: Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11 (1993) 213-244
- 144 Rani R, Fernandez-Vina MA, Zhang S, Stastny P: HLA-DPB1 alleles in a population from north India and description of a new variant (DPB1*5601). *Tissue Antigens* 45 (1995) 264-269
- 145 Richter KV, Fischer G, Menzel GR, Langfeld M, Aigte H, Ruckwarth G, Freier G: HL-A Antigene und Disposition für hämatologische Erkrankungen. *Haematologia* 7 (1973) 203-209

- 146 Rihs HP, Conrad K, Mehlhorn J, May-Taube K, Welticke B, Frank KH, Baur X: Molecular analysis of HLA-DPB1 alleles in idiopathic systemic sclerosis patients and uranium miners with systemic sclerosis. *Int Arch Allergy Immunol* 109 (1996) 216-222
- 147 Rozman C, Montserrat E: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 333 (1995) 1052-1057
- 148 Sada M, Hashimoto M, Ichikawa Y, Kaneshige T, Nakamura S, Suzuki S, Uchida K, Fukunishi T, Amemiya H: Importance of HLA-DRB1 genotyping in cadaveric renal transplantation. *Transplant Proc* 24 (1992a) 2443-2444
- 149 Sada M, Suzuki S, Amemiya H, Kaneshige T, Nakamura S, Uchida K: Cadaveric renal transplantation and HLA-DPB1 genotype compatibility. *Transplant Proc* 24 (1992b) 1314-1317
- 150 Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324 (1986) 163-166
- 151 Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA: Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 6230-6234
- 152 Salazar M, Yunis I, Alosco SM, Chopek M, Yunis EJ: HLA-DPB1 allele mismatches between unrelated HLA-A,B,C,DR (generic) DQA1-identical unrelated individuals with unreactive MLC. *Tissue Antigens* 39 (1992) 203-208
- 153 Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, Barbier Y, Doche C, Warzocha K, Gutowski MC, Rieux C, Coiffier B: Elevated circulating levels of TNF alpha and its p55 soluble receptor are associated with an adverse prognosis in lymphoma patients. *Br J Haematol* 93 (1996) 352-359
- 154 Sanchez-Velasco P, Escribano de Diego J, Paz-Miguel JE, Ocejo-Vinyals G, Leyva-Cobian F: HLA-DR, DQ nucleotide sequence polymorphisms in the Pasiegos (Pas valleys, Northern Spain) and comparison of the allelic and haplotypic frequencies with those of other European populations. *Tissue Antigens* 53 (1999) 65-73
- 155 Savage DA, Middleton D, Trainor F, Taylor A, McKenna PG, Darke C: Frequency of HLA-DPB1 alleles, including a novel DPB1 sequence, in the Northern Ireland population. *Hum Immunol* 33 (1992) 235-242
- 156 Schönermarck U: IgA-Mangel und HLA-Assoziationen. Medizinische Fakultät. Martin-Luther-Universität, Halle, Dissertation, 1998
- 157 Schroeder HW, Jr., Dighiero G: The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 15 (1994) 288-294

- 158 Schwartz RH: Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71 (1992) 1065-1068
- 159 Seidl C, Koch U, Brunner G, Buhleier T, Frank R, Moller B, Markert E, Koller-Wagner G, Seifried E, Kaltwasser JP: HLA-DR/DQ/DP interactions in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet* 24 (1997) 365-376
- 160 Shaw CK, Chen LL, Lee A, Lee TD: Distribution of HLA gene and haplotype frequencies in Taiwan: a comparative study among Min-nan, Hakka, Aborigines and Mainland Chinese. *Tissue Antigens* 53 (1999) 51-64
- 161 Shaw S, Johnson AH, Shearer GM: Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogenic proliferative and cytotoxic responses. *J Exp Med* 152 (1980) 565-580
- 162 Stephens HA, Vaughan RW, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS: Southern blot analysis of HLA-DP gene polymorphisms in Caucasoid rheumatoid arthritis (RA) patients and controls. *Immunogenet* 30 (1989) 149-155
- 163 Tait BD, Bodmer JG, Erlich HA, Ferrara GB, Albert E, Begovich A, Kimura A, Varney MD, Klitz W: DNA typing: DPA and DPB analysis. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg): HLA 1991. Vol. 1. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1992, S. 485-496
- 164 Taneja V, Giphart MJ, Verduijn W, Naipal A, Malaviya AN, Mehra NK: Polymorphism of HLA-DRB, -DQA1, and -DQB1 in rheumatoid arthritis in Asian Indians: association with DRB1*0405 and DRB1*1001. *Hum Immunol* 46 (1996) 35-41
- 165 Taylor GM, Robinson MD, Binchy A, Birch JM, Stevens RF, Jones PM, Carr T, Dearden S, Gokhale DA: Preliminary evidence of an association between HLA-DPB1*0201 and childhood common acute lymphoblastic leukaemia supports an infectious aetiology. *Leukemia* 9 (1995) 440-443
- 166 Terasaki PI, McClelland JD: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204 (1964) 998-1000
- 167 Tienari PJ, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Peltonen L: HLA haplotypes in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: molecular analysis of the HLA-DQ locus. The DIME Study Group. *Diabetologia* 35 (1992) 254-260
- 168 Tiercy J-M, Grundschober C, Jeannet M, Mach B: A comprehensive HLA-DRB, -DQB and -DPB oligotyping procedure by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes. In: Hui KM, Bidwell JL (Hrsg): Handbook of HLA Typing Techniques. CRC Press, Boca Raton, 1993, S. 117-147
- 169 Tiwari JL, Terasaki PI: HLA and Disease Associations. Springer, New York, Berlin, Heidelberg (usw.), 1985

- 170 Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L: A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240 (1988) 1003-1009
- 171 Trachtenberg EA, Erlich HA, Rickards O, DeStefano GF, Klitz W: HLA class II linkage disequilibrium and haplotype evolution in the Cayapa Indians of Ecuador. *Am J Hum Genet* 57 (1995) 415-424
- 172 van Eijk MJ, Stewart-Haynes JA, Beever JE, Fernando RL, Lewin HA: Development of persistent lymphocytosis in cattle is closely associated with DRB2. *Immunogenet* 37 (1992) 64-68
- 173 Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, Bratlie A, Lea T, Ugelstad J, Thorsby E: HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation - a fast and reliable technique. *Tissue Antigens* 28 (1986) 301-312
- 174 Vasmel WL, Zijlstra M, Radaszkiewicz T, Leupers CJ, de Goede RE, Melief CJ: Major histocompatibility complex class II-regulated immunity to murine leukemia virus protects against early T- but not late B-cell lymphomas. *J Virol* 62 (1988) 3156-3166
- 175 Veenstra H, Jacobs P, Dowdle EB: Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol* 171 (1996) 68-73
- 176 Vegh Z, Wang P, Vanky F, Klein E: Selectively down-regulated expression of major histocompatibility complex class I alleles in human solid tumors. *Cancer Res* 53 (1993) 2416-2420
- 177 Wang CY, Good RA, Ammirati P, Dymbort G, Evans RL: Identification of a p69,71 complex expressed on human T cells sharing determinants with B-type chronic lymphatic leukemic cells. *J Exp Med* 151 (1980) 1539-1544
- 178 Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G: Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence Non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 91 (1998) 3574-3581
- 179 Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW: An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 177 (1993) 557-560
- 180 Winchester R, Toguchi T, Szer I, Burmester G, Lo Galbo P, Cuttner J, Capra JD, Nunez-Roldan A: Association of susceptibility to certain hematopoietic malignancies with the presence of Ia allodeterminants distinct from the DR series; utility of monoclonal antibody reagents. *Immunol Rev* 70 (1983) 155-166

- 181 Wood WI, Gitschier J, Lasky LA, Lawn RM: Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 1585-1588
- 182 Yamagata K, Hanafusa T, Nakajima H, Sada M, Amemiya H, Tomita K, Miyagawa J, Noguchi T, Tanaka T, Kono N: HLA-DP and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese. *Tissue Antigens* 38 (1991) 107-110
- 183 Yasuda N: Estimation of haplotype frequency and linkage disequilibrium parameter in the HLA system. *Tissue Antigens* 12 (1978) 315-322
- 184 Yasunaga S, Kimura A, Hamaguchi K, Ronningen KS, Sasazuki T: Different contribution of HLA-DR and -DQ genes in susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Tissue Antigens* 47 (1996) 37-48
- 185 Yelamos J, Garcia-Lozano JR, Moreno I, Romero M, Garcia A, Sanchez B: Frequency of HLA-DPB1 alleles in a Spanish population: their contribution to rheumatoid arthritis susceptibility. *Eur J Immunogenet* 21 (1994) 91-98
- 186 Zijlstra M, Melief CJ: Virology, genetics and immunology of murine lymphomagenesis. *Biochim Biophys Acta* 865 (1986) 197-231
- 187 Zinkernagel RM, Callahan GN, Klein J, Dennert G: Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus. *Nature* 271 (1978) 251-253
- 188 Zinkernagel RM, Doherty PC: H-2 compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. *J Exp Med* 141 (1975) 1427-1436

8. Anlage

Tab. 1: Verteilung der HLA-A- und -B-Antigene.

HLA	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf %	n	pf %	
-A					
1	25	24,8	50	31,9	
2	60	59,4	76	48,4	
3	28	27,7	40	25,5	
9	26	25,7	37	23,6	
10	13	12,9	26	16,6	
11	9	8,9	13	8,3	
19	23	22,8	32	20,4	
28	4	4,0	18	11,5	0,06
-B					
5	9	8,9	19	12,1	
7	30	29,7	33	21,0	
8	18	17,8	34	21,7	
12	13	12,9	28	17,8	
13	13	12,9	15	9,6	
14	7	6,9	8	5,1	
15	19	18,8	27	17,2	
16	6	5,9	21	13,4	0,09
17	13	12,9	15	9,6	
18	13	12,9	12	7,6	
21	7	6,9	6	3,8	
22	4	4,0	8	5,1	
27	10	9,9	12	7,6	
35	10	9,9	29	18,5	0,09
37	6	5,9	9	5,7	
40	16	15,8	20	12,7	
41	3	3,0	1	0,6	
47	0	0,0	2	1,3	
53	0	0,0	1	0,6	
w4	58	57,4	99	63,1	
w6	89	88,1	134	85,4	

Tab. 2: Verteilung der HLA-DR-Antigene.

HLA	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf %	n	pf %	
-DR					
1	19	18,8	31	19,8	
2	27	26,7	34	21,7	
3	21	20,8	39	24,8	
4	30	29,7	36	22,9	
5	25	24,8	45	28,7	
6	29	28,7	53	33,8	
7	28	27,7	44	28,0	
8	5	5,0	15	9,6	
9	2	2,0	1	0,6	
10	3	3,0	1	0,6	
51	27	26,7	35	22,3	
52	61	60,4	111	70,7	
53	54	53,5	73	46,5	

Tab. 3: Verteilung der molekulargenetisch typisierten HLA-A- und -Cw-Merkmale

HLA	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p	
	n	pf %	n	pf %		
-A					0,06	
*01	25	24,8	50	31,9		
*02	60	59,4	76	48,4		
*03	28	27,7	40	25,5		
*23	6	5,9	4	4,5		
*24	20	19,8	30	19,1		
*25	5	5,0	9	5,7		
*26	7	6,9	17	10,8		
*11	9	8,9	13	8,3		
*29	8	7,9	8	5,1		
*30	3	3,0	7	4,5		
*31	4	4,0	6	3,8		
*32	3	3,0	9	5,7		
*33	5	5,0	2	1,3		
*34	1	1,0	0	0,0		
*28	4	4,0	18	11,5		
Homoz	14	13,9	22	14,0		
-Cw						0,09
*01	7	6,9	8	5,1		
*02	13	12,9	13	8,3		
*03	31	30,7	40	25,5		
*04	15	14,9	35	22,3		
*05	6	5,9	14	8,9		
*06	33	32,7	38	24,2		
*07	57	56,4	78	49,7		
*08	7	6,9	8	5,1		
*12	7	6,9	16	10,2		
*13	1	1,0	1	0,6		
*14	1	1,0	3	1,9		
*15	2	2,0	8	5,1		
*16	8	7,9	8	5,1		
*17	1	1,0	1	0,6		
Homoz	11	10,9	29	18,5		

Tab. 4: Verteilung der molekulargenetisch typisierten HLA-B-Merkmale.

HLA	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf %	n	pf %	
-B					0,01
*51	9	8,9	18	11,5	
*52	0	0,0	1	0,5	
*07	30	29,7	33	21,0	
*08	18	17,8	34	21,7	
*44	12	11,9	25	15,9	
*45	1	1,0	3	1,9	
*13	13	12,9	15	9,6	
*14	7	6,9	8	5,1	
*62	19	18,8	24	15,3	
*63	0	0,0	2	1,3	
*38	2	2,0	12	7,6	
*39	4	4,0	9	5,7	
*57	12	11,9	12	7,6	
*58	1	1,0	3	1,9	
*18	13	12,9	12	7,6	
*49	4	4,0	3	1,9	
*50	3	3,0	3	1,9	
*55	0	0,0	5	3,2	
*56	4	4,0	3	1,9	
*27	10	9,9	12	7,6	
*35	10	9,9	29	18,5	
*37	6	5,9	9	5,7	
*60	10	9,9	15	9,6	
*61	6	5,9	5	3,2	
*41	3	3,0	1	0,6	
*47	0	0,0	2	1,3	
*53	0	0,0	1	0,6	
*75	0	0,0	1	0,6	
Homoz	5	5,0	14	8,9	

Tab. 5: Verteilung der HLA-DRB1-Allele

HLA-DRB1	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf %	n	pf %	
*0101	17	16,8	27	17,2	0,03
*0102	2	2,0	2	1,3	
*0103	0	0,0	2	1,3	
*0301	21	20,8	39	24,8	
*0401	25	24,8	21	13,4	
*0402	0	0,0	2	1,3	
*0403	1	1,0	3	1,9	
*0404	3	3,0	5	3,2	
*0405	1	1,0	1	0,6	
*0408	0	0,0	4	2,6	
*0701	28	27,7	44	28,0	
*0801	5	5,0	14	8,9	
*0804	0	0,0	1	0,6	
*0901	2	2,0	1	0,6	
*1001	3	3,0	1	0,6	
*1101	14	13,9	25	15,9	
*1102	1	1,0	1	0,6	
*1103	0	0,0	2	1,3	
*1104	4	4,0	9	5,7	
*1106	0	0,0	1	0,6	
*1107	0	0,0	1	0,6	
*1201	6	5,9	7	4,5	
*1202	1	1,0	0	0,0	
*1301	12	11,9	34	21,5	0,07
*1302	8	7,9	11	7,0	
*1303	5	5,0	5	3,2	
*1308	2	2,0	1	0,6	
*1401	2	2,0	5	3,2	
*1407	0	0,0	1	0,6	
*1501	24	23,8	27	17,2	
*1502	1	1,0	1	0,6	
*1601	2	2,0	6	3,8	
Homoz.	12	11,9	10	6,4	

Tab. 6: Verteilung der HLA-DRB3/4/5-Allele

HLA-DRB	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf %	n	pf %	
3*0101	27	26,7	48	30,6	0,003
3*0201	1	1,0	2	1,3	
3*0202	33	32,7	69	44,0	
3*0301	9	8,9	11	7,0	
3* Homoz	11	10,9	16	10,2	
4*0101	26	25,7	51	32,5	
4*0102	0	0,0	1	0,6	
4*0103	30	29,7	21	13,4	
4* Homoz	8	7,9	10	6,7	
5*0101	24	23,8	28	17,8	
5*0102	1	1,0	1	0,6	
5*0202	2	2,0	5	3,2	
5*0203	0	0,0	1	0,6	
5* Homoz	3	3,0	2	1,3	

Tab. 7: Verteilung der HLA-DQB1-Allele.

HLA-DQB1	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf %	n	pf %	
*0201	34	33,7	45	28,7	0,02
*0202	4	4,0	21	13,4	
*0301	32	31,7	63	40,1	0,03
*0302	28	27,7	25	15,9	
*0303	11	10,9	13	8,3	
*0304	0	0,0	2	1,3	
*0402	3	3,0	14	8,9	
*0501	19	18,8	33	21,0	
*0502	2	2,0	7	4,5	
*0503	2	2,0	5	3,9	
*0504	1	1,0	0	0,0	
*0601	3	3,0	1	0,6	
*0602	20	19,8	27	17,2	
*0603	16	15,8	34	21,7	
*0604	9	8,9	12	7,6	
Homoz	18	17,8	12	7,6	0,02

9. Thesen

1. Die HLA-Merkmale sind durch einen hohen Polymorphismus charakterisiert, dessen Verteilung populationsspezifische Unterschiede aufweist. Die Bestimmung der HLA-Frequenzen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen ist Voraussetzung für die Untersuchung einer möglichen Immunpathogenese HLA-assoziiierter Erkrankungen.
2. Eine Typisierung des HLA-DP-Merkmales, dessen Polymorphismus durch die Kombination von polymorphen Sequenzen der sechs hypervariablen Regionen des zweiten Exons des HLA-DPB1-Gens bestimmt wird, ist mit serologischen Methoden nur unzureichend möglich. Zu Beginn der vorliegenden Studie lagen nur wenige Daten zur HLA-DPB1-Verteilung in der deutschen Bevölkerung und zu HLA-DPB1-Krankheitsassoziationen vor.
3. Die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) ist eine maligne Erkrankung, die durch eine klonale Proliferation von Lymphozyten gekennzeichnet ist. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung sind bisher nur wenig verstanden. Für die CLL wurde eine Assoziation mit verschiedenen, serologisch typisierten HLA-Merkmalen beschrieben, ohne dass eine definitive Assoziation als gesichert gilt. Daten zur HLA-DPB1-Verteilung bei CLL-Patienten liegen bisher nicht vor.
4. Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Methode der HLA-DPB1-Typisierung auf der Basis der PCR-SSO. Das zweite Ziel der Studie bestand in der Bestimmung der HLA-DPB1-Verteilung mittels dieser Methode in einer Gruppe von 157 kaukasoiden Kontrollprobanden aus dem mitteldeutschen Bundesland Sachsen-Anhalt und in einer Gruppe von 101 kaukasoiden CLL-Patienten aus Sachsen-Anhalt. Darüber hinaus sollte die Verteilung weiterer, mittels serologischer und molekulargenetischer Methoden typisierter HLA-Merkmale und deren Allelkombinationen in beiden Gruppen verglichen werden.
5. Als kritisch für die HLA-DPB1-Typisierungsqualität erwies sich die Temperatur des spezifischen Waschschrilles sowie die Digoxigenin-Markierung der SSO-Sonden. Das für die endgültige Typisierung verwendete Set von 22 SSO-Sonden enthielt sechs neu entwickelte SSO-Sonden und erlaubte auch bei Berücksichtigung der zwischenzeitlich neu beschriebenen HLA-DPB1-Allele bei allen Probanden eine eindeutige Typisierung.

6. Die unter den kaukasoiden Kontrollprobanden aus Sachsen-Anhalt beobachtete HLA-DPB1-Frequenzverteilung entsprach weitgehend der für kaukasoiden Populationen typischen Verteilung. Der Vergleich mit anderen Populationen unterstützte die Annahme, dass die Vererbung des HLA-DPB1-Merkmales durch eine genetische Variabilität und Selektion charakterisiert ist.
7. Für die erstmalig bei CLL-Patienten untersuchten HLA-DPB1-Allele war eine erhöhte Frequenz von HLA-DPB1*0301 und der für dieses Allel typischen Sequenzen der Aminosäurepositionen 8 - 12, 55 - 57 und 65 - 69 der HLA-DPB1-Kette auffällig. Keiner dieser Unterschiede behielt jedoch seine Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche bei.
8. Die Frequenz der Allele HLA-DRB4*0103, -DRB1*0401 und -DQB1*0302 sowie die Frequenz der HLA-DQB1-Homozygoten war unter CLL-Patienten erhöht, während für das Allel HLA-DQB1*0202 eine verringerte Frequenz beobachtet wurde. Der Unterschied für HLA-DRB4*0103 behielt seine Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche bei und war sowohl unabhängig vom Vorliegen des supertypischen Merkmales HLA-DRB4 (DR53) als auch unabhängig vom Geschlecht und Alter bei Erstdiagnose der Patienten. Damit besteht für die CLL eine positive Assoziation mit Allelen des Haplotypes HLA-DR4:DR53:DQ8, für den auch zahlreiche Assoziationen mit Autoimmunerkrankungen nachgewiesen sind.
9. Die Ergebnisse der Kopplungsanalyse bestätigten das schwache Kopplungsungleichgewicht zwischen den Allelen des HLA-DPB1-Gens und den benachbarten HLA-Klasse-II-Genen. Nur für das Allel HLA-DPB1*0101 wurde unter Kontrollprobanden eine signifikante Kopplung mit Merkmalen des erweiterten Haplotypes HLA-B8:Cw7:DR3:DQ2 beobachtet. Dagegen bestand unter CLL-Patienten ein Kopplungsungleichgewicht für die Kombination HLA-DRB1*0701:DPB1*1701.
10. Für die Allelkombinationen HLA-DRB4*0103:DQB1*0302 und HLA-DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 sowie für die erweiterte Kombination HLA-Cw*03:B*62:DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 fand sich eine positive Assoziation mit der CLL. Dies resultierte in einem CLL-spezifischen, auch nach Korrektur für multiple Vergleiche signifikanten Kopplungsungleichgewicht für die Kombinationen HLA-DRB1*0401:DRB4*0103 und HLA-DRB4*0103:DQB1*0302. Es bestanden keine Kopplungsungleichgewichte für Kombinationen des CLL-assoziierten Allels HLA-DPB1*0301 mit anderen HLA-Merkmalen. Diese Resultate unterstützen die Annahme einer Assoziation der CLL

mit Allelen des erweiterten Haplotyps HLA-Cw3:B62:DR4:DR53:DQ8 sowie einer von diesem Haplotyp unabhängigen Assoziation mit HLA-DPB1*0301.

11. Eine in früheren Untersuchungen beschriebene Assoziation der CLL mit HLA-Klasse-I-Antigenen konnte sowohl durch die serologische als auch durch die niedrigauflösende molekulargenetische Typisierung der HLA-A-, -B- und -Cw-Merkmale in dieser Studie nicht bestätigt werden. Allerdings fand sich eine erhöhte Frequenz des Merkmals HLA-Cw*06 unter früh erkrankten Patienten sowie des Merkmals HLA-B*18 unter Patienten mit einem Alter > 72 Jahre bei Erstdiagnose. Dies deutet auf einen Einfluss der HLA-Merkmale auf den Verlauf der Erkrankung hin.
12. Unter weiblichen Patienten wurde eine erhöhte Frequenz von Homozygotien der Merkmale HLA-DRB1/3/4/5- sowie von HLA-DQB1-Homozygotien festgestellt. Damit werden frühere Untersuchungen bestätigt, in denen ein mit MHC-Homozygotie assoziiertes Risiko monoklonaler Lymphozytenproliferation beschrieben wurde.
13. Die beobachteten HLA-Assoziationen lassen vermuten, dass die HLA-Merkmale für die komplexe Pathogenese der CLL nicht entscheidend sind, jedoch das Risiko der malignen Lymphozytenproliferation wie auch den Krankheitsverlauf prägen. Dabei sind die Parallelen zu HLA-Assoziationen von Autoimmunkrankheiten auffällig. Die möglichen pathogenetischen Mechanismen bestehen sowohl in einer HLA-abhängigen infektiösen Ätiologie und in einer herabgesetzten, HLA-restringierten Anti-Tumoraktivität als auch in einer Kopplung zwischen Genen der HLA-Merkmale und anderen, pathogenetisch relevanten Genen.

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Lutz Peter Müller
Geburtsdatum	04.10.1970
Geburtsort	Bleicherode
Familienstand	ledig

Schulbildung

1977 - 1987	Polytechnische Oberschule in Halle
1987 - 1989	Erweiterte Oberschule mit erweitertem Sprachunterricht in Halle
1989	Abitur

Wehr- und Zivildienst

1989 - 1990	Wehrdienst
1990 - 1991	Zivildienst in der Sonderschule für Körperbehinderte, Halle

Studium

1991 – 1998	Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle
08/1993	Stipendiat des DAAD, Language Centre, University of Bristol, GB
1994 - 1998	Stipendiat der Konrad-Adenauer-Stiftung
1996 - 1997	Studienaufenthalt, Molecular Genetics Program, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA
11/1998	3. Staatsexamen und Teilapprobation als Arzt

Forschungstätigkeit und Beruf

12/1994	Laborpraktikum, Dept. of Haematology, University of Wales, College of Medicine, GB
01/1999 – 07/1999	Research Fellow, Section on Infectious Diseases, Dept. of Medicine, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA
seit 09/1999	Arzt im Praktikum an der Klinik f. Innere Medizin IV, Hämatologie/Onkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Lutz Peter Müller, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Ich versichere weiterhin, dass ich erstmalig den Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens beim Dekan des wissenschaftlichen Rates der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg stelle. Ich habe zu keinem Zeitpunkt diese Arbeit, noch eine Arbeit zu einem anderen Thema an einer anderen Universität zur Promotion eingereicht.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgender Form veröffentlicht:

Müller L, Machulla HKG, Langner J: Establishing a method for HLA-DPB1 typing and analysing the DPB1 distribution in a local German population. Abstract book, 7th European Students Conference of the Charité, Berlin, Oktober 1996

Müller L, Machulla HKG, Langner J: DPB1 alleles of an East German group. Eur J Immunogenet 24 (1997) S12

Machulla HKG, Schönermarck U, Müller L, Schaaf A, Langner, J: HLA-DRB1/3/4/5, DQB1, DPB1 alleles (high resolution) of healthy IgA-D Germans. Eur J Immunogenet 24 (1997) S68

Langner J, Machulla HKG, Müller L, Schönermarck U, Kunze G, Kujat G, Rohrberg R, Wagner S: DPB1 alleles in a group of German patients with chronic lymphoid leukemia (CLL). Immunol Let 56 (1997) S325

Machulla HKG, Müller L, Schönermarck U, Dorak MT, Kloss C, Schaaf A, Kujat G, Langner J: The frequencies of HLA-A, B, DRB1, DRB3/4/5, DQB1, DPB1 alleles in a group of German CLL patients. Eur J Immunogenet 25 (1998) S56

Müller L, Schaaf A, Kujat G, Kunze G, Langner J, Machulla HKG: Gender and HLA in German patients with chronic lymphocytic leukemia. Hum Immunol 60 (1999) S62

Machulla HKG, Müller L, Schaaf A, Kujat G, Kunze G, Langner J. HLA type and onset age in patients with chronic lymphocytic leukemia. Hum Immunol 60 (1999) S63

Halle, 07.11.2000

Danksagung

Ich möchte all denen danken, deren Unterstützung die Durchführung und Vollendung dieser Arbeit ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. med. habil. J. Langner für die freundliche Vergabe des Themas und die Betreuung meiner Arbeit, zugleich aber auch für seine Hilfe bei der Vorbereitung und Realisierung meiner Forschungstätigkeit in Winston-Salem,

Bei Herrn Dr. rer. nat. H. K. G. Machulla für die stete Unterstützung, seine kritischen Ratschläge und das fortwährende Anspornen während der gesamten Zeit meiner Arbeit, vor allem aber in den schwierigen Phasen der Bearbeitung,

der Leitenden MTLA des Interdisziplinären HLA-Labors Frau A. Schaaf sowie Frau C. Kloss und Frau J. Krüger für ihre geduldige Hilfe beim Erlernen der Labormethoden und für die Unterstützung bei allen technischen Problemen,

Frau C. Walcker für Ihren steten Zuspruch, für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Fragen und bei der Korrekturdurchsicht meiner Dissertationsschrift,

Meinen Kommilitonen M. Weiwad und U. Schönermark für ihre Zusammenarbeit mit mir.

Herrn Dr. G. Kujat aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin IV der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Herrn Dr. S. Wagner aus der Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses Stendal und Herrn PD Dr. R. Rohrberg für die Mitarbeit bei der Suche nach CLL-Patienten.

Besonderen Dank schulde ich allen Probanden, deren bereitwillige Mitarbeit diese Studie erst ermöglichte.

Ich danke Frau S. Neuhaus sowie meinen Eltern und Großeltern für ihre Unterstützung und das Verständnis für alle mit dieser Arbeit für sie und mich verbundenen Einschränkungen.