

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Burkert

Assoziation von glialen Hirntumoren mit dem HLA-System

Untersuchungen des Einflusses des HLA-Komplexes als genetischer Hintergrund bei
Erkrankungen an glialen Hirntumoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frank Steinborn
geboren am 20. Februar 1974 in Havelberg

verteidigt am 09.07.2001

Gutachter:	PD Dr. Rainov	Halle
	Prof. Dr. Langner	Halle
	Prof. Dr. Körholz	Leipzig

Kurzreferat und bibliographische Beschreibung:

Die Expression der humanen Leukozytenantigene (HLA) spielt eine essentielle Rolle im Rahmen der Immunantwort gegen infektiöse Agenzien und maligne Zellen. Assoziationen einzelner HLA-Antigene oder HLA-Haplotypen mit verschiedenen Krankheiten sind bereits untersucht und Korrelationen zwischen HLA-Markern und Krebserkrankungen, wie z.B. Karzinomen der Cervix oder des Nasopharynx, beschrieben worden. In der vorliegenden Studie wurden die HLA-Antigenfrequenzen von 65 erwachsenen kaukasischen Patienten mit diagnostiziertem niedriggradigem, anaplastischem oder malignem Gliom (WHO Grade II-IV) mit denen von 157 asymptomatischen Kontrollindividuen (Gelegenheitsblutspendern) aus derselben Population verglichen. Es wurden standardisierte serologische (NIH) und molekularbiologische (PCR-SSP) Techniken für die HLA-Typisierung angewandt.

Unsere Resultate lassen eine positive Assoziation zwischen einzelnen HLA-Markern und dem Vorliegen symptomatischer zerebraler gliomatöser Erkrankungen vermuten. Verglichen mit der Kontrollpopulation, hatten HLA-A*25-positive Patienten ein 3.0fach erhöhtes Risiko ($p=0.04$), HLA-B*27-positive Patienten ein 2.7fach ($p=0.03$) und HLA-DRB1*15-positive Patienten ein 2.2fach erhöhtes Risiko ($p=0.03$), an einer gliomatösen Neoplasie zu erkranken. Demgegenüber war HLA-DRB1*07 mit einem 0.4fach verminderten Risiko einer Gliomerkrankung assoziiert.

Das Vorkommen einiger HLA-Antigenkombinationen und *geschätzter* Haplotypen bei den Gliompatienten unterschied sich ebenfalls von dem der Kontrollprobanden. So war HLA-DRB1*15:DRB5*(51) in Kombination mit dem Auftreten von HLA-DRB1*11 mit einem 13.4fach erhöhten Risiko ($p=0.01$) und die Expression von HLA-Cw*06:DRB1*07 mit einem 0.2fach verminderten Risiko ($p=0.03$), an einem Gliom zu erkranken, verbunden.

Folglich werden - im Vergleich zu den asymptomatischen Individuen - einzelne HLA-Antigene und ihre Kombinationen und *geschätzten* Haplotypen signifikant häufiger oder seltener von Personen, die während ihres Erwachsenenlebens ein Gliom ausbilden, exprimiert.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielstellung	1
2.	Theoretische Grundlagen	3
2.1.	Gliale Tumoren	3
2.2.	Das HLA-System	6
2.3.	HLA und Gliome - Immunologische Aspekte	15
3.	Material und Methoden	20
3.1.	Patienten und Kontrollgruppe	20
3.2.	Serologische Untersuchung der HLA-Klasse I-Antigene	21
3.2.1.	Methodik der Typisierung der HLA-Antigene	21
3.2.2.	Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut	21
3.2.3.	Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale	23
3.3.	Molekularbiologische Untersuchung der HLA-Antigene	26
3.3.1.	Prinzip der molekularbiologischen HLA-Typisierung	26
3.3.2.	Die DNA-Isolierung	27
3.3.3.	PCR-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)	29
3.3.4.	Nachweis der Amplifikate mittels Gelelektrophorese	30
3.3.5.	Differenzierungsgrad der HLA-Typisierung	31
3.4.	Statistische Methoden	32
4.	Ergebnisse	34
5.	Tabellen	37
6.	Diskussion	43
7.	Zusammenfassung	49
8.	Literaturverzeichnis	51
9.	Anlagen	62
9.1.	Chemikalien	62
9.2.	Auswertungsbögen/ Worksheets	64
10.	Thesen	68

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. de(s)oxyribonucleic acid)
EGF	Epidermal Growth Factor (dt. Epidermaler Wachstumsfaktor)
HLA	humanes Leukozytenantigen
i.allg.	im allgemeinen
kD	Kilodalton
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
MLCT	Mikrolymphozytotoxizitätstest
NIH	National Institutes of Health
n.s.	nicht signifikant
n.v.	nicht verfügbar
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat buffered saline
PCR-SSO	Polymerase-Kettenreaktion - Sequenzspezifische Oligonukleotide
PCR-SSP	Polymerase-Kettenreaktion - Sequenzspezifische Primer
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RR	relatives Risiko
s.(u.)	siehe (unten)
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. T-cell receptor)
TGF	Transforming Growth Factor (dt. Transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	Tumor Necrosis Factor (dt. Tumornekrosefaktor)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung und Zielstellung

Gliale Hirntumoren (low-grade [niedriggradige] Astrozytome, WHO Grad II; anaplastische Astrozytome oder Oligodendrogliome, WHO Grad III; maligne Gliome, WHO Grad IV) sind sehr schwer zu behandelnde, invasive Neoplasien. Trotz fortwährender Verbesserung therapeutischer Konzepte konnte in den letzten Jahrzehnten nur ein relativ geringer klinischer Fortschritt erreicht werden (95). Niedriggradige Gliome zeigen im Laufe der Zeit sehr häufig eine Progression zu höhergradigen Neoplasien und führen letztendlich zum Tod des betroffenen Patienten. Anaplastische und maligne Gliome haben ein schnelleres und vielfältigeres Wachstumsmuster. Die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit einem malignen Gliom, dem Glioblastoma multiforme (GBM), beträgt lediglich 10 Monate (51). Die Entwicklung von Gliomen ist sehr variabel und schwer vorherzusagen, eine langfristige Heilung nicht möglich. Die Diagnose dieser primären Hirntumoren wird zumeist in einem späten Stadium der Erkrankung gestellt, nachdem der Tumor in einer klinisch asymptomatischen frühen Phase bereits Teile des ZNS unerkannt infiltrieren konnte (43). Oft erst zu diesem Zeitpunkt treten neurologische Symptome wie Krampfanfälle, Kopfschmerzen (auf Grund erhöhten intrakraniellen Druckes) oder psychische Alterationen (hirnorganisches Psychosyndrom) auf.

Die Notwendigkeit, verlässliche Faktoren für eine Risikoabschätzung und prognostische Aussagen zu eruieren, wurde deutlich. Viele Autoren haben versucht, entsprechende Parameter zu finden, die auf eine besondere Anfälligkeit für gliomatöses Wachstum bzw. Veranlagung für molekular-immunologische Phänomene hinweisen, die Anlaß zum Verdacht auf ein symptomatisches intrazerebrales Gliom geben (13, 61, 82).

Humane Leukozytenantigene (HLA, engl. human leukocyte antigens) sind auf der Zelloberfläche exprimierte Moleküle, die den T-Lymphozyten antigene Peptide präsentieren und die Immunantwort gegen entzündliche und maligne Prozesse modulieren, wobei bekannt ist, daß der HLA-Polymorphismus Krankheitsentstehung und -verlauf beeinflusst (7). Seit erstmalig eine Korrelation zwischen HLA und Krankheit demonstriert werden konnte (rezensiert in 64 und 101), wurden zunehmend Untersuchungen zum Einfluß einzelner HLA-Marker oder Haplotypen des HLA-Systems auf das Risiko der Krankheitsentstehung

durchgeführt (21, 49, 111). Einige starke Korrelationen zwischen HLA und chronischen Krankheiten, wie z.B. HLA-B27 und Spondylitis ankylosans, HLA-DRB1*03 und HLA-DRB1*04 bei Diabetes mellitus oder HLA-DRB1*04 und HLA-DRB1*01 bei rheumatoider Arthritis, wurden beschrieben (rezensiert in 7 und 64). Im Falle der Spondylitis ankylosans konnte bei mehr als 90% der Patienten eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von HLA-B27 und der Krankheit gefunden werden (93). Des Weiteren wurden positive und negative Assoziationen zwischen verschiedenen HLA-DR- und -DQ-Antigenen oder -Haplotypen beschrieben (28, 89, 103).

Im Falle glialer Tumoren gab es nur wenige frühere Studien, die eine mögliche Assoziation zerebraler Gliome mit dem HLA-System untersuchten (36, 76, 102), jedoch wurden dabei lediglich serologische Typisierungstechniken angewandt. Die vorliegende prospektive Studie hatte zum Ziel, deutsche Patienten kaukasischer Abstammung aus Sachsen-Anhalt mit niedriggradigem, anaplastischem und malignem Gliom (WHO Grade II-IV) bezüglich ihrer HLA-Merkmale zu typisieren und mit einer asymptomatischen Kontrollgruppe aus derselben Population im Hinblick auf Assoziationen zwischen HLA und Krankheit zu vergleichen. Zusätzlich zur serologischen Typisierung unter Einsatz eines Antiserumsets wurden die HLA-Merkmale mittels niedrig-auflösender (low resolution) PCR bestimmt.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Gliale Tumoren

Die Neuroglia des Zentralnervensystems

Wichtiger Bestandteil des menschlichen Nervensystems ist die Neuroglia. Gliazellen sind kleiner als Neurone und kommen ungefähr fünfzigmal häufiger vor. Die zwei Haupttypen der Gliazellen sind die Astrozyten und die Oligodendrozyten, die auch als Makroglia zusammengefaßt werden.

Astrozyten sind „sternartige“ Zellen mit vielen Fortsätzen, über die Kontakte mit Neuronen und auch Kapillaren aufgenommen werden. Sie sind die größten Gliazellen. Es werden fibröse Astrozyten, die vor allem in Gebieten mit vielen Axonen (weiße Substanz) vorkommen, von protoplasmatischen Astrozyten unterschieden. Protoplasmatische Astrozyten, die kürzere, aber dickere Fortsätze ausbilden, sind v.a. in Gebieten mit Nervenzellkörpern und Synapsen zu finden (graue Substanz).

Oligodendrozyten sind kleinere Gliazellen mit weniger Fortsätzen, die für die Bildung der Myelinscheiden myelinisierter Axone verantwortlich sind. Dabei bildet ein Oligodendrozyt Myelin für mehrere zentrale Axone. Im peripheren Nervensystem entsprechen die Schwann-Zellen den Oligodendrozyten des ZNS.

Weitere Gliazellen des ZNS sind die Ependymzellen, die den Zentralkanal des Gehirns und des Rückenmarks auskleiden, die Mikroglia, die bei pathophysiologischen Prozessen mobilisiert werden und der Entfernung zerstörten Gewebes dienen (Phagozytose), und - in umschriebenen Gebieten - die Zellen des Plexus choroideus sowie die Pituizyten der Neurohypophyse. (2, 90)

Funktion der Neuroglia

Die Gliazellen tragen zur Strukturbildung bei; sie geben Nervenzellen Halt, trennen Gruppen von Neuronen und bedecken mit ihren Fortsätzen außerdem Kapillaren im ZNS. Durch die Myelinisierung von Axonen ermöglichen sie eine schnellere Impulsleitung. Sie puffern extrazelluläre Ionen, wie z.B. die bei Nervenzellaktivität freigegebenen K^+ -Ionen. Diese werden von den Gliazellen aufgenommen und dann teilweise in Kapillaren abgegeben. Mittels spezieller Transportsysteme werden viele Transmitter, die in den Extrazellulärraum abgegeben wurden, wiederaufgenommen. Einige Gliazellen sind für das Wachstum

und die Entwicklung der Lage von Neuronen verantwortlich. Die Regeneration von Neuronen kann von Gliazellen gefördert oder verhindert werden. Beispielsweise kann durch die Proliferation von Gliazellen im ZNS die Regeneration von Nervenzellen nach einer Zerstörung gehemmt werden. Des Weiteren liefern Gliazellen im Rahmen ihrer Ernährungsfunktion auch metabolische Substrate an Nervenzellen. (2)

Gliome

Die überwiegende Mehrheit der hirneigenen Tumoren entsteht aus dem Hirnparenchym, hauptsächlich den verschiedenen Formen der Glia. Die Inzidenz beträgt 5-7 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (61). Hierbei sind die von der Astroglia (Astrozyten) abgeleiteten Astrozytome führend, seltener die von der Oligodendroglia (Oligodendrozyten) ausgehenden Oligodendrogliome. Prinzipiell können diese Gliome überall im Großhirn auftreten, jedoch sind hauptsächlich die Großhirnhemisphären, seltener die Basalganglien oder der Hirnstamm betroffen. Als Sonderfall ist das pilozytische Astrozytom des juvenilen Lebensalters hauptsächlich infratentoriell lokalisiert. Erste Allgemeinsymptome sind Krampfanfälle, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie, meist von der Tumorlokalisation abhängig, Gangunsicherheit, Sehstörungen und Lähmungserscheinungen bis hin zu Wesensänderungen. Fast immer führen Hirntumoren, v.a. bei Progression, zu einer Steigerung des intrakraniellen Druckes und somit zu direkter Wirkung auf die Funktionszentren. Durch Verlegung der Liquorpassage kann ein akut lebensbedrohlicher Hydrocephalus entstehen. Astrozytome werden histologisch nach der WHO-Klassifikation in vier Grade eingeteilt (61). Zur Graduierung werden Parameter, wie Zelldichte, Pleomorphie, Mitosehäufigkeit, Gefäßproliferation und Häufigkeit von spontanen Nekrosen, herangezogen. (113)

Benigne und semibenigne Astrozytome (Grad I und II WHO)

Das Astrozytom Grad I WHO ist ausschließlich das pilozytische Astrozytom. Zu den Astrozytomen Grad II WHO, den sogenannten differenzierten, gehören das fibrilläre, das protoplasmatische und das gemistozytische Astrozytom. Diese langsam wachsenden Tumoren können manchmal scharf begrenzt sein und dabei anatomische Grenzen wie Sulci oder Fissuren respektieren. Im Hirnstamm ist eine diffuse, infiltrative und somit kaum behandelbare Wuchsform nahezu die Regel. Rezidive, mit denen selbst nach vollständiger Entfernung noch nach 7-10 Jahren zu rechnen ist, sind bei Grad I in 80%, bei Grad II-Tumoren in 60% der Fälle höhergradig, oft anaplastisch (Grad III WHO) oder sogar zum Glioblastom (Grad IV WHO) entdifferenziert. (113)

Höhergradige Astrozytome, Gliome Grad III und IV WHO

Das anaplastische Astrozytom (Grad III WHO) und das Glioblastom (Grad IV WHO) sind rasch wachsende Tumoren. Sie gehen meist mit einem perifokalen Ödem einher, was oft zu einer erheblichen Massenverschiebung führt. Eine rasche Besserung der entsprechenden klinischen Symptomatik lässt sich nahezu immer mit hochdosierter Gabe von Glukokortikoiden erreichen. Trotz der häufig gut abgegrenzten Erscheinung im Computer- oder Kernspintomogramm wachsen maligne Gliome immer diffus infiltrierend. Die Tumorzellen zeigen eine hohe Migrationstendenz aus dem Tumorareal heraus. Selbst bei postoperativ durchgeführten tumorfreien Randbiopsien kommt es innerhalb weniger Monate bis zu einem Jahr zu einem Rezidiv. Die mittlere Überlebenszeit korreliert mit dem histologischen Grading, der Radikalität des chirurgischen Vorgehens, dem Alter des Patienten und dem erreichten Karnofsky-Index, mit dem die Lebensqualität erfaßt wird. (113)

2.2. Das HLA-System

Die Entdeckung der Haupthistokompatibilitätsantigene, die als sogenannte starke Transplantationsantigene eine Transplantatabstoßung herbeiführen können, hatte ihren Ursprung in tierexperimentellen Untersuchungen zur Gewebeübertragung bei Mäusen (46, 97). Diese starken Transplantationsantigene werden durch Gene innerhalb des

Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. **major histocompatibility complex**, MHC) kodiert. In den 50er Jahren folgte die Beschreibung des ersten menschlichen Leukozytenantigens Mac (später HL-A2 genannt, s. Abb. 1) durch Dausset (34, 35), van Rood (108) und Payne (78). Seitdem hat die Untersuchung des MHC, der ausschließlich bei Vertebraten nachgewiesen werden konnte, tiefere Einblicke in die Abläufe immunologischer Abwehrmechanismen und die Pathogenese verschiedener

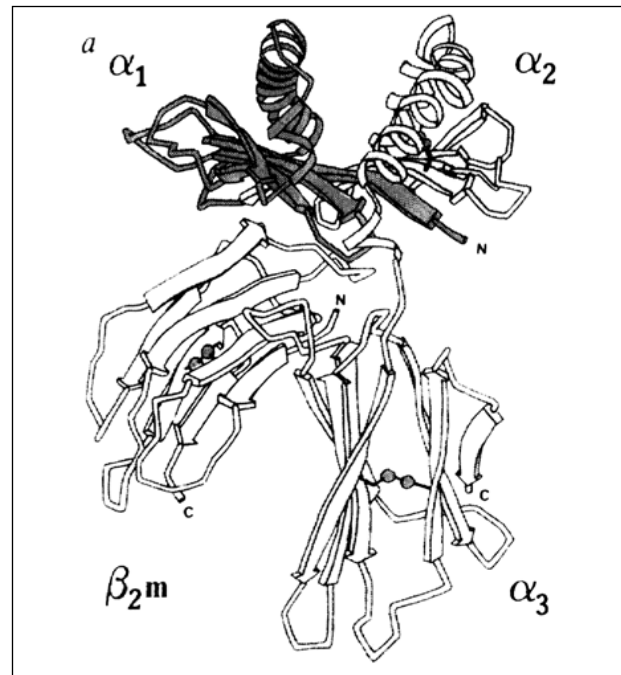


Abb. 1: Schematische Darstellung des HLA-A2-Moleküls gemäß kristallographischer Untersuchungen. Mit α_1 , α_2 und α_3 sind die einzelnen Domänen des HLA-A2-Moleküls bezeichnet. Das β_2m -Mikroglobulin ist durch β_2m gekennzeichnet. (15)

Autoimmunerkrankungen gegeben sowie auch Fortschritte auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin ermöglicht. Durch ihre Funktion der Antigenpräsentation nehmen die MHC-Moleküle eine zentrale Rolle in der Erkennung und Unterscheidung von ‚Selbst‘ und ‚Nicht(Mehr)Selbst‘ (48, 79) sowie der Aktivierung spezifischer Abwehrmechanismen ein, indem sie neben nicht immunologischen Funktionen sowohl die Prägung des Immunsystems beeinflussen als auch entscheidend an der Auseinandersetzung mit Proteinantigenen fremder (allogener) oder körpereigener (autologer) Herkunft beteiligt sind. Für die Auslösung einer antigenspezifischen Immunantwort ist die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen notwendig. Diese erkennen Proteinantigene jedoch fast ausschließlich

nur, wenn sie durch antigenpräsentierende Zellen prozessiert und als Proteinfragmente (Peptide) gebunden an MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche dargeboten werden. Dieses als MHC-Restriktion bezeichnete Phänomen der Antigenerkennung wird durch einen ternären Komplex vermittelt, der aus dem MHC-Molekül, dem daran gebundenen Antigen und dem antigenerkennenden T-Lymphozyten-Rezeptor besteht. Dabei sind unterschiedliche MHC-Moleküle in der Lage, eine bestimmte Anzahl differenter Peptide zu binden, und bestimmen damit das Repertoire an Antigenen, welches den T-Lymphozyten angeboten wird (Abb. 2). Es findet also noch vor der Erkennung durch den TCR eine Determinantenselektion statt (4, 22, 47, 94).

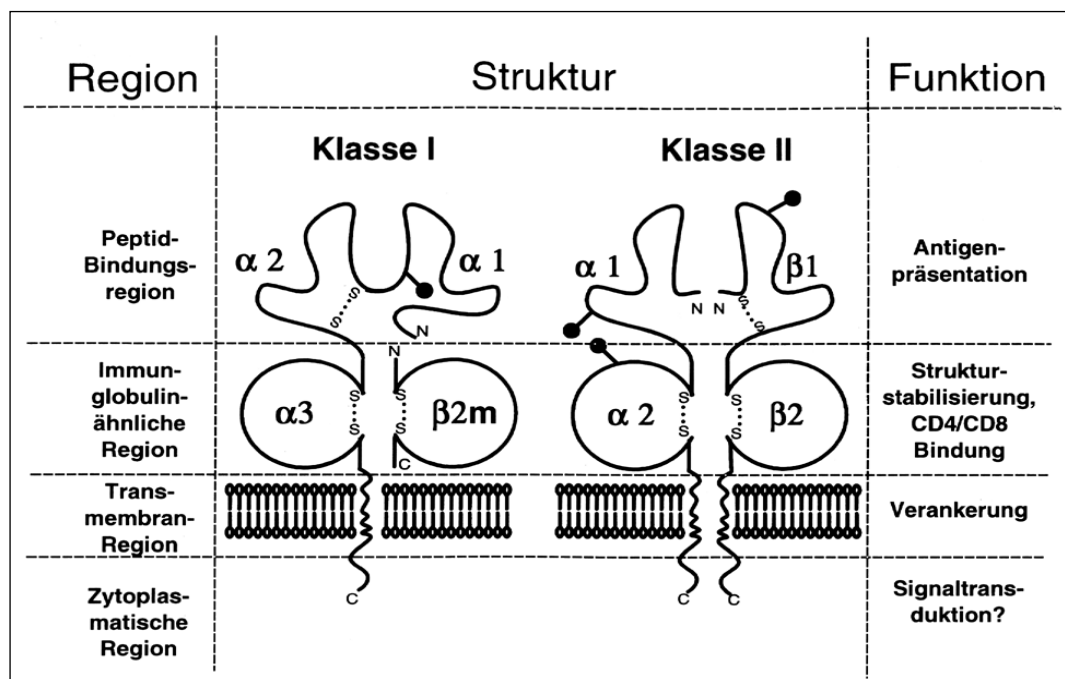


Abb. 2: Struktur und Funktion von MHC-Klasse I- und Klasse II-Molekülen (112)

Der menschliche HLA-Genkomplex

Der MHC des Menschen wird als HLA-Komplex bezeichnet (engl. **human leucocyte antigen**). Dieser ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.1-6p21.3) lokalisiert und umfaßt einen Bereich von ca. 3.500 Kilobasenpaaren. Innerhalb dieses Komplexes liegen die HLA-Genloci im engeren Sinne (HLA-Klasse I und -Klasse II) sowie die Loci einer heterogenen Gruppe von Genen, die historisch als Klasse III bezeichnet wird (s. Abb. 3). Diese umfaßt Gene, die sowohl Proteine mit Funktionen im Rahmen der immunologischen Abwehr (u.a. Gene für die Komplementfaktoren C2, C4A und C4B, den Properdinfaktor Bf, die Tumornekrosefaktoren TNF α und TNF β , die Hitzeschockproteine HSP70-1 und -2) als auch Proteine ohne direkten Einfluß auf immunologische Phänomene (z.B. Steroid-21-hydroxylase CYP21A und CYP21B, Valyl-tRNA-Synthetase) kodieren sowie zahlreiche andere Gene, deren Genprodukte teilweise noch unbekannt sind.

Die Gene der HLA-Klasse II-Moleküle liegen zentromerwärts. Ihnen schließt sich die Klasse III-Region und telomerwärts die Region der HLA-Klasse I-Gene an.

Die HLA-Klasse I-Region umfaßt neben den Genloci für die α -Ketten der klassischen HLA-Klasse I-Merkmale HLA-A, -B und -C noch andere Genorte, von denen einige Pseudogene darstellen (112), die nicht exprimiert werden, wie z.B. HLA-H und -J. Andere wiederum kodieren für funktionell aktive Produkte (81), die nur in wenigen Geweben nachweisbar sind (z.B. HLA-E, -F und -G).

Innerhalb der HLA-Klasse II-Region können verschiedene Subregionen unterschieden werden. Neben den Subregionen für die antigenpräsentierenden HLA-

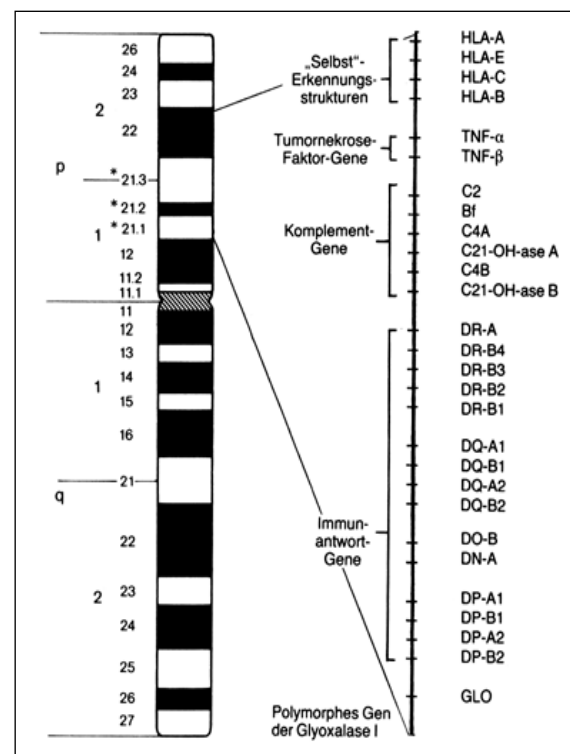


Abb. 3: Die HLA-Kopplungsgruppe mit Marker-Genorten auf Chromosom 6 (73)

Merkmale HLA-DR, -DQ und -DP, die jeweils ein bzw. mehrere α - sowie β -Kettengene umfassen, liegen hier auch zahlreiche andere Gene, deren Genprodukte u.a. an der Assoziation von Peptid und MHC-Molekül (z.B. HLA-DM) oder der Antigenprozessierung beteiligt sind. Zu letzteren gehören die Genorte für Transporterproteine (TAP1 und TAP2, engl. transporter associated with antigen processing) sowie Proteasomgene (LMP2 und LMP7, engl. large multifunctional protease) (81).

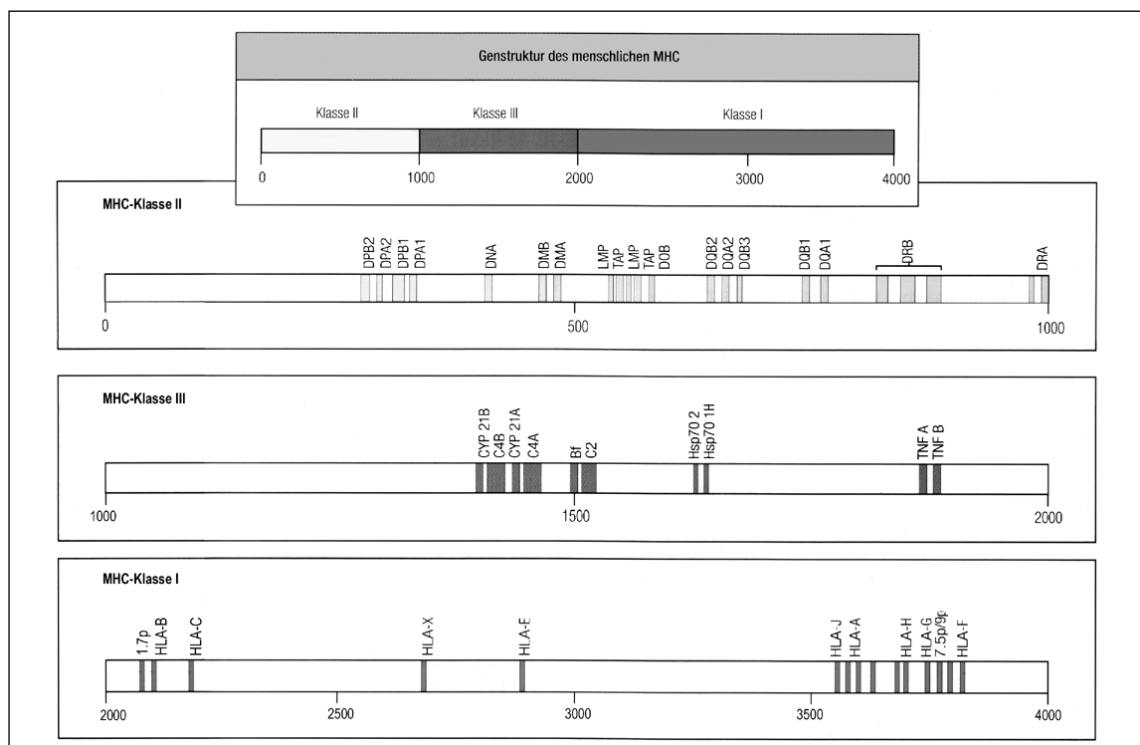


Abb. 4: Karte der menschlichen MHC-Region (54)

Aufbau und Funktion der HLA-Klasse I- und Klasse II-Moleküle

HLA-Klasse I- und Klasse II-Moleküle unterscheiden sich trotz ihrer gemeinsamen Zugehörigkeit zur Immunglobulinsuperfamilie und großer äußerer Ähnlichkeit sowohl hinsichtlich ihres Aufbaus als auch ihrer Gewebeverteilung und Funktion.

HLA-Klasse I-Moleküle sind Heterodimere. Sie bestehen aus einer schweren polymorphen α -Kette (einem posttranslational glykosylierten transmembranären Protein von 45 kD), die mit einer leichten, extrazellulär liegenden nichtpolymor-

phen Kette mit einem Molekulargewicht von 11.5 kD, dem β 2-Mikroglobulin, nichtkovalent gekoppelt ist. Der Genort für das β 2-Mikroglobulin liegt außerhalb des MHC auf Chromosom 15. Der extrazelluläre Teil der α -Kette besitzt drei Domänen (α 1, α 2, α 3), die durch drei Exons kodiert werden. Während sich die Aminosäuresequenz der der Zellmembran nahe gelegenen α 3-Domäne relativ konstant darstellt, weisen die α 1- und α 2-Domänen hypervariable Regionen auf, die für den Polymorphismus der Klasse I-Antigene verantwortlich und am Aufbau des HLA-Paratops (Bindungsstelle für antigene Peptide) beteiligt sind (Abb. 2). (15, 16, 105, Übersicht in 112)

HLA-Klasse II-Moleküle sind ebenfalls posttranslational glykosylierte transmembranäre Proteine. Die von ihnen gebildeten Dimere bestehen aus zwei - vom MHC-Komplex kodierten - nichtkovalent gebundenen Polypeptidketten, die α - und β -Kette genannt werden. Sie weisen ein Molekulargewicht von ca. 28 kD bzw. 33 kD auf und besitzen jeweils zwei extrazellulär gelegene Domänen. Sowohl an der α - als auch an der β -Kette weisen die äußeren N-terminalen Domänen (α 1 und β 1) hypervariable Abschnitte auf, die wie bei Klasse I-Molekülen für den Polymorphismus und die Bildung des Paratops verantwortlich sind. Die der Zellmembran nahen Domänen (α 2 bzw. β 2) zeigen dagegen nur eine geringe Variabilität (Abb. 2). (19, 105, Übersicht in 112)

Die unterschiedliche Gewebeverteilung der Klasse I- und Klasse II-Moleküle deutet auf eine unterschiedliche Funktion hin. Klasse I-Moleküle (HLA-A, -B, -C) werden - in allerdings unterschiedlichem Ausmaß - auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert (Ausnahmen bilden z.B. die Trophoblasten der Plazenta, Spermien und neuronale Zellen im Gehirn). Dagegen weisen Klasse II-Moleküle eine eingeschränkte Gewebeverteilung auf. Sie sind hauptsächlich auf B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten zu finden. (32, 33, 42)

Andere antigenpräsentierende Zellen, zu denen u.a. Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems, dendritische Zellen, Langerhanszellen der Haut sowie einige Epithel- und Endothelzellen zählen, können durch externe Stimuli in der Expression von HLA-Klasse II-Molekülen moduliert werden (24, 31, 112).

Klasse I-Moleküle präsentieren Peptide mit einer Länge von 8-13 Aminosäuren an $CD8^+$ ($CD8$ -positive) suppressorische bzw. zytotoxische T-Lymphozyten.

Diese Peptide stammen von zytoplasmatischen Proteinen der Zellen, zu denen Selbstpeptide und intrazellulär synthetisierte Fremdproteine (z.B. virale Genprodukte) gehören, und werden im Golgi-Apparat an die MHC-Moleküle gebunden.

Klasse II-Moleküle dagegen präsentieren den CD4⁺-T-Helfer- bzw. -Inducer-Lymphozyten Peptide mit einer Länge von 13-25 Aminosäuren. Die präsentierten Peptide sind durch den Abbau von phagozytisch aufgenommenen Proteinen in Phagolysosomen entstanden und werden nach der Fusion mit Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums an die MHC-Moleküle gebunden. (54)

Die differente Antigenpräsentation über MHC-Moleküle verschiedener Klassen führt somit zu unterschiedlichen Effektormechanismen - einerseits der Klasse I-restringierten Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten, andererseits der Klasse II-restringierten Aktivierung von T-Helfer-Lymphozyten. (56)

HLA-Polymorphismus und Kopplungsungleichgewicht

Zu der außerordentlichen Variabilität des MHC trägt neben der kodominanten Vererbung und Expression sowie dem Vorhandensein jeweils mehrerer Genloci für Klasse I- und -II-Merkmale vor allem ein ausgeprägter genetischer Polymorphismus (multiple Allelie) bei. Dabei beschränkt sich die Variabilität zwischen den einzelnen Allelen im wesentlichen auf die hypervariablen Regionen, während die DNA- und Proteinsequenzen aller Genorte im übrigen eine eher ausgeprägte Homologie aufweisen. Der oben aufgeführte allelische Polymorphismus bleibt - im Gegensatz zur Immungenetik der Immunglobuline, die ihre Variabilität und somit die Antigenpezifität im wesentlichen durch somatische DNA-Rekombinationsvorgänge und somatische Mutationen beibehalten - während der Lebenszeit eines Individuums unverändert, d.h. in seiner Keimbahnkonfiguration erhalten.

Die Gesamtheit der Allelausstattung an mehreren bzw. allen Genorten eines Chromosoms wird als HLA-Haplotyp bezeichnet.

Im Bereich der α -Kettengene der Klasse I-Merkmale gibt es auf einem Chromosom jeweils nur einen polymorphen Genlocus.

Bei den HLA-Klasse II-Genen, die sich in die Regionen HLA-DR, -DQ und -DP mit jeweils α - und β -Loci gliedern, gibt es nur innerhalb der HLA-DR-Region für die α -Kette (DRA) einen nicht-polymorphen Genort. Für letztere Region existieren mehrere polymorphe β -Kettengene (DRB1- DRB9). Je nach Haplotyp liegen dabei 1-4 β -Kettengene auf einem Chromosom. Von den bisher bekannten β -Kettengenen beherbergen die Genorte DRB2 und DRB6-9 Pseudogene. Das DRB1-Gen, das auf allen Haplotypen vertreten ist, kodiert die Merkmale HLA-DR1-18. Das DRB3-Gen kodiert die Merkmale der HLA-DR52-Gruppe, DRB4 die Merkmale der HLA-DR53-Gruppe und DRB5 die der HLA-DR51-Gruppe. Alle DR-Merkmale besitzen dabei die gleiche DRA-Kette.

Die HLA-DQ-Subregion enthält 5 Genorte. Nur die beiden polymorphen Gene DQA1 und DQB1 werden exprimiert. Die Gene DQA2, DQB2 und DQB3 stellen Pseudogene dar.

Die HLA-DP-Region enthält 4 Genloci. Auch hier stellen zwei Genorte, DPA2 und DPB2, Pseudogene dar. Die exprimierten DP-Moleküle werden von den polymorphen Genen DPA1 und DPB1 kodiert.

Da im Bereich der HLA-DQ- und -DP-Merkmale sowohl die α - als auch β -Kettengene polymorph sind, können bei Heterozygotie durch cis- und trans-Assoziationen zwischen den Genprodukten des väterlichen und mütterlichen HLA-Komplexes verschiedene Heterodimere gebildet werden, wodurch sich die Variabilität der HLA-Merkmale ebenfalls erhöht.

Ein weiteres Merkmal des HLA-Komplexes ist die Existenz sogenannter Kopplungsungleichgewichte (engl. linkage disequilibrium) zwischen den Allelen verschiedener Genorte eines Haplotyps. Hierunter versteht man das Abweichen der beobachteten Häufigkeit des Auftretens gemeinsam vererbter Allelkombinationen von einem Erwartungswert, der aus dem Produkt der Allelfrequenzen berechnet werden kann. Die Differenz zwischen Beobachtungs- und Erwartungswert wird als Maß für das Kopplungsungleichgewicht herangezogen und Delta (Δ) genannt. Das Vorzeichen des Deltawertes kennzeichnet ein positives oder negatives Kopplungsungleichgewicht. Diese treten sowohl im Bereich der Klas-

se I- als auch Klasse II-Genorte auf. Hervorzuheben ist hierbei das ausgesprochen starke Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA-DR und -DQ. Die hier zugrundeliegenden Mechanismen, die zur Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von Kopplungsungleichgewichten geführt haben, sind bisher noch unklar. Es konnte ebenso nicht geklärt werden, warum das Kopplungsungleichgewicht und damit die Rekombinationsfrequenz zwischen verschiedenen etwa äquidistanten Genorten innerhalb des HLA-Komplexes unterschiedlich ist. Vermutet werden aber z.B. durch Pathogene verursachte selektive Mechanismen (98).

Die Nomenklatur des HLA-Systems

In der Nomenklatur des WHO-Komitees, das die Benennung neuer Gene, Allele und serologischer Spezifitäten festlegt, spiegelt sich die Entwicklung der Typisierungstechniken der HLA-Merkmale wieder. Die im folgenden aufgeführten aktuellen Angaben über die bekannten serologisch, zellulär und molekulargenetisch definierten HLA-Merkmale beziehen sich auf die Veröffentlichung des WHO-Nomenklatur-Komitees für Faktoren des HLA-Systems aus dem Jahre 1996 (17).

Ursprünglich wurden (und werden noch immer) serologische Untersuchungstechniken zum Nachweis exprimierter HLA-Merkmale auf der Zelloberfläche vitaler Zellen verwendet (Mikrolymphozytotoxizitätstest). Die hierbei mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesenen Merkmale können in Haupt- und Feinspezifitäten (Splits) gegliedert werden. Das bedeutet, daß ein HLA-Merkmal neben seiner höchsteigenen (engl. „private“) Antigenstruktur (Feinspezifität), die nur bei diesem Merkmal auftritt und durch einen spezifischen Antikörper erkannt wird, eine zweite, allgemeine (engl. „public“) Antigenstruktur (Hauptspezifität) tragen kann, die es mit anderen HLA-Molekülen teilt. Außerdem gibt es im Bereich der HLA-B-Merkmale einen dritten antigenen Bereich („supertypische“ Determinante), der mit den HLA-B-Merkmalen entweder als Bw4 oder als Bw6 auftritt.

Das WHO-Nomenklatur-Komitee nennt 1996 für das HLA-Klasse I-System 28 HLA-A, 61 HLA-B und 10 HLA-Cw Spezifitäten (17). Die Klasse II-Merkmale weisen serologisch einen geringeren Polymorphismus auf. Bisher konnten serologisch 21 HLA-DR und 9 HLA-DQ Spezifitäten unterschieden werden. Die

Merkmale DR51, DR52 und DR53 bilden assoziierte supertypische Determinanten.

Neben den serologisch definierten HLA-Merkmalen können mit Hilfe der gemischten Lymphozytenkultur (MLC= mixed lymphocyte culture) (5, 6, 65) Determinanten der HLA-D-Region, die sich zum Teil mit den HLA-DR-Spezifitäten überschneiden, als HLA-Dw-Merkmale (T-Zell-definierte HLA-D-Spezifitäten) nachgewiesen werden (71, 110), wobei die verantwortlichen Antigenstrukturen jedoch nicht mit den durch Antikörper definierten Merkmalen der HLA-DR-Merkmale übereinstimmen. Sowohl HLA-DR- als auch -DQ-Moleküle tragen zu den Dw-Spezifitäten bei. 26 Dw-Spezifitäten sind bekannt. Über das ‚primed lymphocyte typing‘ (PLT), eine Form der MLC, bei der HLA-DR- und HLA-Dw-idente Zellen miteinander kultiviert werden, können 6 HLA-DPw-Allele identifiziert werden, die nur bedingt den auf DNA-Ebene ermittelten HLA-DPB-Allelen zugeordnet werden können. Durch den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (72, 88) für molekulargenetische HLA-Typisierungstechniken (RFLP, PCR-SSP, PCR-SSO, Sequenzierung) wurde der Nachweis der einzelnen Allele auf der DNA-Ebene möglich (77).

Diese Methoden haben unabhängig von der Verfügbarkeit vitaler Zellen mit ihrer Reproduzierbarkeit und Genauigkeit eine höhere Differenzierung bekannter Allele und die Beschreibung neuer Allele ermöglicht.

Im Bereich der Nukleotidsequenz sind (Stand 1996) 83 HLA-A-, 186 HLA-B- und 42 HLA-Cw-Allele definiert, außerdem die Sequenz von 2 HLA-DRA-, 184 HLA-DRB1-, 11 HLA-DRB3-, 9 HLA-DRB4- und 12 HLA-DRB5-Allelen, 18 HLA-DQA1- und 31 HLA-DQB1-Allelen sowie von 10 HLA-DPA1- und 77 HLA-DPB1-Allelen (17).

Die klassischen serologisch definierten HLA-Merkmale werden durch den Namen ihres Genortes und die Nummer ihrer Spezifität benannt (z.B. HLA-A9), ebenso ihre Splits (z.B. HLA-A24). Die Bezeichnung eines Allels setzt sich aus dem Namen des Genortes und einer Allelnummer, beides durch ein Sternchen (*) getrennt, zusammen. Hierbei geben die ersten beiden Ziffern der Allelnummer die Hauptgruppe, die nachfolgenden beiden Ziffern die Nebengruppe an (z.B. DRB3*0101). Eine fünfte Ziffer wird angefügt, wenn sich dieses Allel von

den anderen seiner Gruppe nur durch eine stumme Mutation unterscheidet, die nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt (z.B. DRB3*01011). In der vorliegenden Arbeit wird außerdem auf die Kombinationen der HLA-Antigene und auf *geschätzte* Haplotypen (engl. estimated haplotypes) eingegangen. Bei Kombinationen sind die Gene, welche die entsprechenden Spezifitäten verschlüsseln, auf verschiedenen Chromosomen des Chromosomenpaares 6 lokalisiert. Zwischen die Bezeichnungen der HLA-Merkmale wird dann ein Komma (,) eingefügt (z.B. HLA-A*03,A*25). Zur Darstellung von *geschätzten* Haplotypen werden die Bezeichnungen der HLA-Merkmale durch Doppelpunkte (:) verknüpft (z.B. Cw*07:DRB1*15:DQB1*06). Auch die Anwendung von Komma und Punkt in einem Haplotyp ist möglich. Beispielsweise drückt der Term HLA-DRB1*15:DRB5*(51),DQB1*07 aus, daß DRB1*15 und DRB5*(51) auf dem einen Chromosom lokalisiert sind und DQB1*07 auf dem anderen.

2.3. HLA und Gliome - Immunologische Aspekte

Krebs, eine der drei häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern, wird durch das progressive Wachstum der Nachkommen (Klone) einer einzigen transformierten (neoplastischen) Zelle verursacht. Durch molekularbiologische Untersuchungen konnte die Existenz sogenannter Protoonkogene experimentell belegt werden (99). Diese stellen kritische Wirkungsorte in der zellulären DNA dar. Zelluläre Protoonkogene dürften eine zentrale Rolle bei der Embryonalentwicklung sowie bei Regenerations- und Wundheilungsprozessen einnehmen und daher absolut lebensnotwendig sein. Zur Erfüllung ihrer Funktion scheint entscheidend, daß sie intakt sind und zur rechten Zeit am rechten Ort ein- bzw. wieder abgeschaltet werden. Darüber hinaus können sie durch Viren und Karzinogene als auch Amplifikation oder Rearrangierung aktiviert werden. Die Entstehung eines malignen Phänotyps erfolgt wahrscheinlich in Teilschritten oft unter Beteiligung und Wechselwirkung verschiedener Onkogene bzw. Onkogenproteine. Die im Zellkern lokalisierten (nukleären) Onkogene (wie z.B. myc, myb, p53, E1A) können dabei in den Zellzyklus, d.h. Zellproliferation und Differenzierung, eingreifen. Zytoplasmatische Onkogene (wie z.B. H-ras, N-ras, src, abl) können zur morphologischen Zelltransformation führen. Wiederum an-

dere produzieren Produkte, die ähnlich Wachstumsfaktoren wirken und das zelluläre Verhalten von außen über die Signalkette beeinflussen. (91)

Eine weitere Voraussetzung für die Karzinogenese ist die Abwesenheit bzw. das Nichtfunktionieren von sogenannten Tumorsuppressorgenen (z.B. Rb-1 und p53), die ebenso regulierende Funktionen bei z.B. Zellproliferation, Differenzierung, Signaltransduktion, Angio- oder Embryogenese besitzen und bereits in erblich bedingten Tumoren wie dem Retinoblastom oder dem Wilms-Tumor nachgewiesen und lokalisiert werden konnten. Ständig mehren sich die Hinweise, daß auch die häufigeren, nicht erblich bedingten Krebsarten, wie Karzinome von Lunge, Brust oder Dickdarm, offensichtlich durch eine schrittweise Akkumulation von Mutationen entstehen, die sowohl die Onkogene wie auch die Tumorsuppressorgene beeinflussen. (86, 87, 91)

Die Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören, wird als Immunüberwachung (engl. immune surveillance) bezeichnet. Viele Wissenschaftler sind überzeugt, daß Tumorzellen Antigene exprimieren, die durch das Immunsystem erkannt werden könnten. Eine Erkrankung entsteht demnach in dem Fall, wenn die Immunreaktion gegen diese Antigene ausbleibt oder dadurch der Tumor nicht beseitigt werden kann. Allerdings ist es schwierig zu zeigen, daß Tumoren tatsächlich immer einer Immunüberwachung unterliegen, denn Krebs ist eine weitverbreitete Krankheit und die meisten Tumoren scheinen einer immunologischen Kontrolle nicht zu unterliegen bzw. haben sich dieser bereits frühzeitig entziehen können. Bei Mäusen, die keine Lymphozyten besitzen, unterscheidet sich die Tumorfrequenz kaum von der normaler Kontrolltiere (70, 107). Andererseits deutet das gehäufte Auftreten von Tumoren bei z.B. AIDS-Patienten oder immunsupprimierten Menschen darauf hin, daß das Immunsystem bei der Kontrolle des Tumorwachstums eine bedeutende Rolle spielt und somit progressiv wachsende Tumoren scheinbar in der Lage sind, sich der Zerstörung durch das Immunsystem zu entziehen. Auf dem Gebiet der Tumorummunologie wurde versucht, solche Mechanismen aufzudecken und therapeutische Ansätze zu entwickeln. (55)

Tumoren können sich auf verschiedene Art und Weise der Immunüberwachung entziehen (Abb. 5). Zum einen können Tumoren nur eine *geringe immunogene Wirkung* besitzen. Einige weisen dabei keine mutierten Peptide auf, die in MHC-

Molekülen präsentiert werden, andere haben ein oder mehrere MHC-Moleküle verloren oder präsentieren keine kostimulatorischen Moleküle. Bekannt sind diese Phänomene z.B. vom Dickdarmkrebs, wo der Verlust von HLA-Klasse I-Molekülen beschrieben wurde (20), aber auch von anderen soliden Tumoren (23, 29, 45). Ein weiterer Mechanismus besteht darin, daß anfangs exprimierte Antigene, die vom Immunsystem erkannt werden, durch *antikörperinduzierte Aufnahme in die Zelle* oder auf Grund *antigener Variation* verlorengehen. Des weiteren kann durch *immunsuppressive Cytokine* wie TGF- β oder IL-10, welche die Reaktion inflammatorischer CD4⁺-T-Lymphozyten hemmen, die Immunantwort direkt unterdrückt werden (Abb. 5). (55)

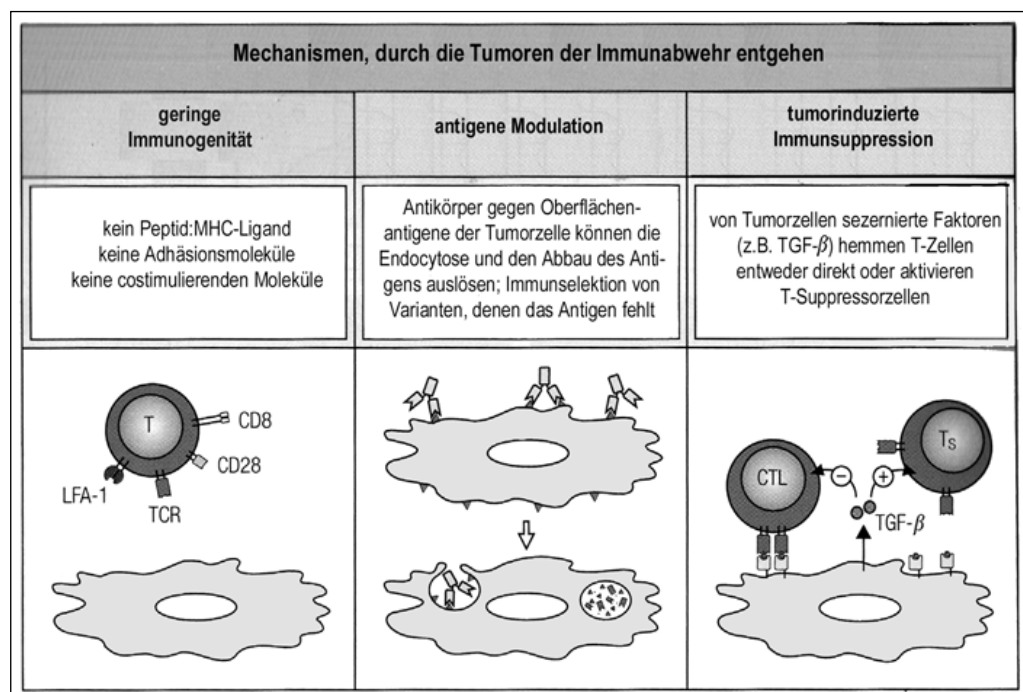


Abb. 5: (55)

Maligne Gliome scheinen sich zum einen durch eine Glucosaminoglycan-Schutzschicht der Immunabwehr entziehen zu können, zum anderen können die Zellen die Aktivität von T-Zellen durch Sekretion von Transforming Growth Factor β_2 (TGF- β) hemmen. Des weiteren scheint auch die Expression mancher Onkogene eine Toleranz gegenüber der Immunabwehr zu vermitteln. So soll beispielsweise die Expression von erb-B₂ die zelluläre Empfindlichkeit gegenüber TNF α senken (113). Das erb-B-Onkogen kodiert ein dem EGF-Rezeptor

entsprechendes transmembranales Protein, dem jedoch die für die Hormonbindung relevanten Abschnitte fehlen (74 statt 83 Aminosäuren). Deshalb ist die von erb-B kodierte Tyrosinkinase, als die der Rezeptor fungiert, der Regulation durch EGF entzogen.

Weitere mögliche Mechanismen, durch die sich maligne Gliome einer suffizienten Immunabwehr entziehen können, sind Gegenstand verschiedener Studien gewesen. Woiciechowsky et al. beschreiben eine verminderte monozytische HLA-DR-Expression und ex vivo Zytokinsekretionskapazität ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-10) als Zeichen monozytischer Deaktivierung bei Glioblastompatienten (115). Für Astrozytompatienten konnte dies nicht bestätigt werden. In einer chinesischen Studie wurde vermutet, daß die HLA-DR-Expression durch Hirntumorzellen selektiv CD8⁺-Lymphozyten hemmt, welche in situ an einer Immunreaktion gegen Hirntumoren beteiligt sind (116).

HLA-Moleküle sind eng mit der Regulation der Immunantwort verbunden. Die Bedeutung des HLA-Systems bezüglich der Krankheitsanfälligkeit und der Tumorentwicklung in einer wachsenden Zahl neoplastischer Vorgänge wird zunehmend deutlicher. HLA-Klasse I-A, B und C-Moleküle, die von beinahe allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, präsentieren den CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten endogenes Antigen, während durch die HLA-Klasse II-DR, DQ und DP-Moleküle, die von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, den CD4⁺-T-Helferzellen exogenes Antigen präsentiert wird. Die während der Entwicklung verschiedener Tumoren auftretende sogenannte „down-regulation“ (regulativer Verlust) der HLA-Klasse I-Expression konnte in verschiedenen menschlichen Tumoren, wie z.B. dem malignen Melanom (41), Karzinomen der Brust (57), Cervix (60) und Lunge (62) sowie dem Burkitt-Lymphom (52), beobachtet werden. Darüber hinaus wurde ebenso die Induktion von HLA-Klasse II-Expression bei einigen Malignitäten wie dem Brustkrebs berichtet (66). Bei HLA-assoziierten Krankheiten scheinen bestimmte HLA-Allele für die Krankheitsentwicklung notwendig zu sein. Jedoch entwickelt nicht jeder Träger krankheitsassoziiertes HLA-Allele auch zwangsläufig eine solche. Dies legt nahe, daß andere Faktoren notwendig sind, die in Kombination oder auch unabhängig vom HLA-Typ zum Ausbruch der Erkrankung führen. Hierbei könnte es sich um infektiöse Agenzien, Kanzerogene oder auch individuelle Unterschiede

im Immunstatus handeln. Des weiteren ist zu berücksichtigen, daß sich ein primär identifizierter krankheitsassoziiertes HLA-Locus im Kopplungsungleichgewicht mit einem anderen HLA-Locus oder einem Gen einer anderen MHC-Region befinden kann und gerade hierdurch ein nachteiliger Effekt für eine Immunantwort entsteht. So sollten individuell auch erweiterte Haplotypen berücksichtigt werden, um einen primär mit einer Krankheit assoziierten HLA-Locus mit Sicherheit zu identifizieren. (7)

Eine direkte Assoziation einer Krankheit mit einem bestimmten HLA-Allel suggeriert, daß sich die Funktion des HLA-Moleküls, welches durch jenes Allel kodiert wird, signifikant von Molekülen, die durch alternative Allele kodiert werden, in ihrer Fähigkeit, T-Lymphozyten Antigen zu präsentieren, unterscheidet. Dieses zeigt die Bedeutung, die Funktion des HLA-Systems bei der Krankheitsentstehung und mögliche Assoziationen von HLA-Markern mit einer Krankheit aufzudecken.

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Kontrollgruppe

In diese Studie wurden im Zeitraum von September 1994 bis März 1999 65 Astrozytompatienten (26 weiblich, 39 männlich) der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung aufgenommen und auf ihre HLA-Merkmale untersucht. Die katamnestischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alle Patienten waren kaukasischen Ursprungs und Einwohner des Bundeslandes Sachsen-Anhalt. Für die HLA-Typisierung wurde vor der Operation peripher-venöses Blut entnommen. Die pathologische Diagnose und der Grad der Differenzierung des Tumors wurden mittels Evaluation in Paraffin gebetteter Tumorproben, welche während der Operation gewonnen wurden, unter dem Lichtmikroskop erhoben.

Die Patientengruppe wurde mit einer Kontrollgruppe aus demselben Bundesland, bestehend aus 157 gesunden HLA-typisierten Testblutspendern (94 weiblich, 63 männlich) des Interdisziplinären HLA-Labors, verglichen.

Beide Gruppen wurden auf chronische Krankheiten, wie Diabetes mellitus, Polyarthrit, Spondylitis ankylosans und Multiple Sklerose, klinisch untersucht. Abgesehen von einer mitunter diabetischen Stoffwechsellage bei Gliompatienten - therapeutisch hervorgerufen durch hochdosierte Steroidgaben - konnte keine der oben aufgeführten Krankheiten weder bei der Patienten- noch bei der Kontrollgruppe diagnostiziert werden. Ebenso lagen bei den Kontrollprobanden weder Symptome für gliale Hirntumoren vor noch entwickelten sie solche in der folgenden Zeit von mehr als drei Jahren, womit das zu diesem Zeitpunkt noch unentdeckte Bestehen eines Glioms praktisch ausgeschlossen werden kann, da diese normalerweise relativ schnell wachsen und in weniger als einem Jahr Symptome verursachen würden (13, 51, 95).

3.2. Serologische Untersuchung der HLA-Klasse I-Antigene

3.2.1. Methodik der Typisierung der HLA-Antigene

Die serologische Bestimmung der HLA-Antigene erfolgte auf der Basis des Mikrolymphozytotoxizitätstests (MLCT) nach Terasaki und McClelland (104), standardisiert nach dem National Institute of Health (NIH, Bethesda/USA).

Mit diesem Test werden mononukleäre Zellen des Blutes (mehr als 95% Lymphozyten) mittels Antikörper verschiedener Anti-HLA-Spezifität auf ihre Merkmale getestet. Lymphozyten haben sich auf Grund ihrer guten Vitalität, Stabilität und Inertheit in der Suspension (relativ hohe Lebensdauer, Robustheit und Suspensierbarkeit), vor allem aber auch dank ihrer hohen Dichte an HLA-Antigenen auf der Zelloberfläche als Indikatorzellen hervorgetan.

Mittels Dichtezentrifugation werden die Lymphozyten aus dem peripheren Blut isoliert und zur Bestimmung der HLA-Klasse I-Merkmale direkt dem MLCT zugeführt.

Für die Bestimmung der HLA-Klasse II-Merkmale wäre eine weitergehende Separation der B-Lymphozyten erforderlich, da die Klasse II-Merkmale auf B-Lymphozyten und Monozyten exprimiert werden, nicht jedoch auf ruhenden T-Lymphozyten des peripheren Blutes.

Mit der serologischen HLA-Typisierung konnten 23 HLA-A-, 51 HLA-B- und 8 HLA-Cw-Merkmale unterschieden werden.

3.2.2. Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut

Für die Gewinnung der peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurde jedem Probanden 20 ml venöses Blut entnommen und mit gerinnungshemmendem Natriumzitrat versetzt (Monovetten Fa. Sarstedt, 9 NC/10 ml).

Die Lymphozytenpräparation erfolgte nach dem Prinzip von Böyum (18).

Dazu wurde das Blut mit isotonischer Pufferlösung (PBS, Fa. Bica, Frankfurt/O.) im Verhältnis 3:7 verdünnt und nachfolgend im Verhältnis 1:1 auf eine Gradientenflüssigkeit mit der Durchschnittsdichte der Lymphozyten (Eigenherstellung FICOLL-Urographin, Dichte = 1,076 g/cm³, pH= 7,2 bzw. Lymphoprep, Biotest AG, Dreieich) überschichtet, welche in 15-ml-Glaszentrifugenröhrchen

zu jeweils 4 ml vorgelegt wurde. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 20 Minuten bei 3200 U/min [Bremsstufe 5] (Rotanta-Zentrifuge AP, Typ 4302, Fa. Hettich, Tuttlingen). Auf Grund ihrer spezifischen Dichte befinden sich die mononukleären Zellen als weißlich-trübe erscheinende Schicht („Ring“) in der Interphase zwischen Überstand und Gradientenflüssigkeit, während die Erythrozyten auf Grund ihrer hohen Dichte (hoher Eisengehalt) auf den Boden der Röhrrchen sedimentieren. Die benötigten PBL sind hauptsächlich im „Ring“ zu finden. Außerdem sind die Monozyten, z.T. Thrombozyten und zwischen 1-10% Granulozyten enthalten. Dieser „Ring“ wurde dann mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in ein weiteres Röhrrchen überführt und dieses mit 10 ml PBS aufgefüllt. Zur Rückgewinnung der Lymphozyten aus der Suspension erfolgte eine niedrigtourige Zentrifugation bei 900 U/min für 10 Minuten („Waschen“), wobei die Thrombozyten zu größerer Zahl im Überstand verblieben. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet mit PBS resuspendiert und aufgefüllt. Nach wiederholtem Waschvorgang und Dekantieren des Röhrrchens wurden die Zellen in ca. 100 µl PBS resuspendiert.

Im Anschluß daran mußte die Zellsuspension auf Vitalität und Zellzahl überprüft werden. Dazu wurde 1 µl der Zellsuspension in eine leere Kavität der Mikrotestkammer getropft. Nach Zusatz von 2 µl Ethidiumbromid/Acridinorange-Färbelösung (s. Anlage 9.1.) und 2 µl Hämopath (s.u.) sowie 3minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Begutachtung der Zellen im invertierten Fluoreszenzmikroskop (s.u.). Zur Überprüfung der Vitalität wurde die Anzahl der lebenden Zellen mit der der toten Zellen verglichen. Bei einer Vitalität von mindestens 90% wurden die Zellen auf ca. 2000-3000 Zellen/µl eingestellt (Schätzen der Zellzahl).

Die auf diese Weise vorbereiteten Lymphozytensuspensionen waren der Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale zugänglich. Für eine HLA-Klasse II-Typisierung würde sich eine weitere Zellseparation zur Gewinnung der B-Lymphozyten anschließen (109), jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich molekularbiologisch typisierte HLA-Klasse II-Merkmale ausgewertet (s. 3.3.).

3.2.3. Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale

Prinzip des Mikrolymphozytotoxizitätstests

Vitale Lymphozyten als Träger der HLA-Merkmale werden mit Anti-HLA-Testseren und Komplement inkubiert. Diese Testseren enthalten zytotoxische Antikörper, welche im Hinblick darauf selektiert wurden, bestimmte HLA-Merkmale erkennen und binden zu können. Durch die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes auf der Zelloberfläche wird Komplement aktiviert, was zur Perforation der Zellmembran und folgend zur Lyse der Zelle führt (zytotoxische Reaktion). Der anschließend zugegebene Farbstoff kann in die lysierte Zelle eindringen und die Zelle färben (positive Reaktion). Tragen hingegen die Lymphozyten das HLA-Merkmal nicht, gegen welches der spezifische Antikörper gerichtet ist, findet keine Antigen-Antikörper-Reaktion statt, es wird kein Komplement aktiviert, die Zelle durch Perforation der Zellmembran nicht zerstört und die Zelle folglich nicht angefärbt (negative Reaktion). (104)

Testdurchführung der HLA-Klasse I-(A,B,C)-Typisierung

Die Typisierung der Klasse I-Merkmale erfolgte mit Hilfe von Typisierungskammern, die ein Anti-HLA-Serum-Set enthalten, nach einer Methode von Terasaki und McClelland (104). Pro Kavität lagen 1 µl des Testserums vor. Um ein Verdunsten zu vermeiden, waren die Seren mit jeweils 5 µl Paraffinöl überschichtet. Die Testkammern wurden tiefgefroren bei -60 °C aufbewahrt, vor der Benutzung mindestens für 1 Tag bei -24 °C zwischengelagert und vor Testbeginn 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut.

Benutzt wurden die kommerziell erworbenen HLA-Typisierungssets der Firmen Biotest AG, Dreieich (Italia-ABC 144), BAG Lich (BAG-ABC 144) sowie One Lambda, Krefeld (BmT-C). Diese Kammern enthielten je nach Fragestellung ein Set von 30-144 standardisierten HLA-Klasse I-Antiseren, wobei jede HLA-Spezifität durch mindestens zwei Antiseren vertreten war.

Ein multispezifisches Antilymphozytenserum diente für diesen MLCT als positive Kontrolle, ein antikörperfreies, nichtzytotoxisches AB-Serum als negative Kontrolle.

Mit Hilfe eines Dispensers (PB 600 Dispenser, Fa. Hamilton, Bonaduz AG, Schweiz) wurden jeweils 1 μl der nach 3.2.2. vorbereiteten Lymphozytensuspension in das jeweilige unter dem Paraffinöl befindliche Antiserum einer jeden Kavität übertragen. Anschließend waren die Kammern für 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 °C) zu inkubieren (Inkubator WTC Binder, Tuttlingen). Mit einem Mehrfachdispenser (Terasaki Dispenser, Fa. Hamilton, Bonaduz AG, Schweiz) wurden daraufhin pro Kavität 5 μl Kaninchenkomplement (wird mit dem HLA-Typisierungsset mitgeliefert) zugesetzt und für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach war der MLCT abgelaufen, und es konnte die Färbung der Testkammern erfolgen (92).

Zur Färbung der Kammern wurde Ethidiumbromid/Acridinorange-Lösung in PBS (s. Anlage 9.1.) verwendet. Ethidiumbromid als „Letalfarbstoff“ diffundiert in die zerstörten Zellen und färbt die DNA. Mittels UV-Licht werden Elektronen des an der DNA interkalierten Ethidiumbromids angeregt und auf ein höheres Energieniveau gebracht. Beim Rücksprung auf das ursprüngliche Niveau wird rotes Licht emittiert, so daß zerstörte und folgend gefärbte Zellen im inverten Fluoreszenzmikroskop rot erscheinen.

Acridinorange als Vitalfarbstoff wird per Pinozytose von den vitalen Zellen aufgenommen und reichert sich intrazellulär an. Nach UV-Anregung emittiert dieser Farbstoff grünes Licht, das heißt lebende Zellen erscheinen im inverten Fluoreszenzmikroskop grün.

Pro Kavität wurden 2 μl Ethidiumbromid/Acridinorange-Färbelösung zugesetzt sowie 2 μl Hämoglobin (Hämopath, Pharma Dessau) zur optischen Abdunkelung des Hintergrundes. Diese Färbungsschritte erfolgten mittels eines Mehrfachdispensers (Hamilton, s.o.).

Bewertung der Reaktion

Die Auswertung der einzelnen Reaktionen erfolgte am inversen Fluoreszenzmikroskop (CK2, Fa. Olympus, Hamburg; Okular CWHK 10x/18L, Objektiv A 10 PL [10x]) unter Aufsicht mit Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 509 \text{ nm}$ unter Benutzung eines entsprechenden Anregungs-, Sperr- und Wärmefiltersystems.

Die Reaktionsstärke wurde für jede Kavität aus dem Verhältnis der zerstörten Zellen (positive Reaktion) zu den vitalen Zellen (negative Reaktion) ermittelt.

Dazu unterscheidet man verschiedene Reaktionsstufen (Score-Werte), die sich gemäß des Internationalen Histokompatibilitäts-Workshop-Standards prozentual folgendermaßen darstellen:

% lysierter Lymphozyten	Score (Reaktionsstärke)	Bedeutung der Reaktion
0-10	1	negativ
11-20	2	fraglich negativ
21-50	4	fraglich positiv
51-80	6	positiv
81-100	8	stark positiv
?	0	nicht ablesbar

Bewertungsschema der Reaktionsstärken im MLCT

Die Score-Werte 4, 6 und 8 wurden als positiv bewertet.

Die Positivkontrolle dient zum Vergleich der Testergebnisse, entspricht also 100% lysierter Lymphozyten (12).

Die Testergebnisse wurden auf vorgefertigten Worksheets (s. Anhang 9.2.) protokolliert und ausgewertet. Dabei gilt bei positiver Reaktion ein HLA-Merkmal eines jeweiligen Genlocus als nachgewiesen, wenn bis auf das bei Heterozygotie zweite zu erwartende HLA-Merkmal alle anderen HLA-Merkmale gleichzeitig ausgeschlossen werden konnten und negativ waren.

Die HLA-Klasse II-Merkmale betreffend, wurden die Probanden in der vorliegenden Arbeit - wie bereits erwähnt - nicht mit den serologischen, sondern ausschließlich den PCR-SSP-Klasse II-Typisierungsergebnissen ausgewertet. Die entsprechenden molekularbiologischen Grundlagen werden nachfolgend beschrieben.

3.3. Molekularbiologische Untersuchung der HLA-Antigene

3.3.1. Prinzip der molekularbiologischen HLA-Typisierung

Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden ist es möglich, eine spezifische und reproduzierbare Typisierung von HLA-Allelen auf genetischer Ebene durchzuführen. Es können die Ergebnisse serologischer Typisierungstechnik abgesichert und auf Grund der höheren Auflösung dieses Verfahrens präzisiert werden, insbesondere für die HLA-Klasse II-Merkmale.

Grundlage für eine molekulargenetische Analyse der HLA-Merkmale ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mullis und Faloona (72) sowie Saiki et al. (88) führten erstmals Experimente mit der PCR durch, um DNA-Moleküle *in vitro* zu amplifizieren.

Die Methodik der PCR ist eng an das natürliche Prinzip der DNA-Replikation angelehnt. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, bestimmte DNA-Sequenzen hochgradig zu vervielfältigen.

Im wesentlichen sind es drei sich zyklisch wiederholende Prozesse, welche zur Amplifikation der DNA führen: die Denaturierung der DNA, die Primerhybridisierung (Annealing) und die Polymerisation (Extension).

Die Denaturierung der DNA erfolgt durch Temperaturerhöhung auf 95 °C (Hitzenaturierung), wobei der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge aufgetrennt wird und diese in ihre Primärstruktur „aufgerollt“ werden. Ein schnelles Abkühlen auf ca. 55 °C verhindert eine Reassoziierung der Einzelstränge. Nun können sich spezifische Primer (synthetisierte einsträngige Oligonukleotide, die als Starternukleotide für die DNA-Polymerasen dienen) an komplementäre Sequenzen der Matrizen-DNA anlagern. Dieser Schritt - als Annealing (Anlagerung) bezeichnet - erfordert je nach Länge der Primer und Art der Nukleotidbasen eine spezifische Temperatur. In Gegenwart freier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP, =Nukleotide) synthetisiert die DNA-Polymerase dann ein Stück des komplementären Stranges. Durch die Verwendung zweier Primer, die das gewünschte DNA-Fragment flankieren, läuft die DNA-Synthese doppelt ab. Diese als Extension (Verlängerungsphase) bezeichnete Reaktion läuft bei einer Temperatur von 72 °C ab.

Bereits nach dem 3. Zyklus entstehen DNA-Doppelstränge, die genau dem gesuchten DNA-Abschnitt entsprechen. Eine n-fache Wiederholung dieser Reaktion entspricht einer 2^n -fachen Amplifikation der Matrizen-DNA. Im allgemeinen reichen 25 Zyklen aus, um eine millionenfache Kopie zu erhalten. Um die bei den hohen Temperaturen je Zyklus erneute Zugabe einer hitzeinstabilen DNA-Polymerase zu vermeiden, wird eine aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) verwendet. Diese ist bei den oben genannten Temperaturen beständig und ermöglicht die Automatisierung der PCR.

Im vorliegenden Falle wurde zur Untersuchung der HLA-Merkmale das PCR-SSP-Verfahren (SSP: sequenz-spezifische Primer) genutzt. Hierbei werden HLA-Allele bzw. -Allelgruppen über die Bildung sequenzspezifischer PCR-Produkte differenziert, wobei eine Amplifikationsreaktion nur bei Komplementarität zwischen 3'-Ende des Primers und der Zielsequenz abläuft (77). Das heißt, der Differenzierungsschritt geschieht bereits auf Ebene der Amplifikation. So werden Primer eingesetzt, die entsprechend ihrer Sequenz nur in Anwesenheit bestimmter Allele ein PCR-Produkt bilden. Nach abgelaufener PCR werden die Amplifikate gelelektrophoretisch nachgewiesen.

3.3.2. Die DNA-Isolierung

Für die Isolierung der DNA können sowohl Citratblut, der nach Lymphozytenpräparation vorliegende Buffy Coat als auch Milzzellen herangezogen werden. Es werden verschiedene Methoden der DNA-Extraktion beschrieben, u.a. die Chloroform-Triethylammoniumbromid(CTAB)-Methode (74) oder die Phenol-Chloroformreinigung (3). In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Präparation ausgehend von 10 ml Citratblut bzw. leukozytenhaltiger Gradientenflüssigkeit mit einer NaCl-Aussalzungsmethode (69) durchgeführt.

Die zur DNA-Typisierung dienenden kernhaltigen Zellen aus dem Citratblut wurden durch 5minütige Zentrifugation bei 4000 U/min abgetrennt und der entstehende Plasmaüberstand verworfen. Die anschließende Zugabe von 45 ml

1 x RCLB (Red Cell Lysis Buffer; s. Anlage 9.1.) bewirkte eine Lyse vorhandener Erythrozyten. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 U/min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde den sedimentierten kernhaltigen Zellen nochmals RCLB zugesetzt und diese erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang war noch ein- bis zweimal zu wiederholen, bis das Zellpellet keine Verunreinigungen mehr aufwies. Die gewaschenen kernhaltigen Zellen wurden in ein Eppendorf Cap (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt, in 1 ml 1 x RCLB resuspendiert und bei 14000 U/min eine Minute lang zentrifugiert (Eppendorfcentrifuge, Fa. Eppendorf, Hamburg). Nach Absaugen des Überstandes erfolgte zwecks „Aufknacken“ der Zellen und zum Proteinverdau die Zugabe von 200 μ l 0,5 x RCLB und 50 μ l Proteinase K-Lösung (Fa. Boehringer, Mannheim) zum Zellverdau. Des weiteren wurden als Detergenz 30 μ l SDS-Lösung (Sodium Dodecyl Sulfat 10%, Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg) zugegeben und das Zellpellet 1 Stunde lang bei 65 °C im Eppendorf Thermomixer inkubiert. Durch den Zusatz von 100 μ l gesättigter NaCl-Lösung (Wasserentzug durch Salze) und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C wurden die Proteine ausgefällt. Nach weiterer Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 U/min wurde die im Überstand befindliche DNA in ein Saarestedt Cap mit 750 μ l vorgelegtem Isopropanol (Laborchemie Apolda GmbH) überführt und die DNA unter vorsichtigem Schwenken ausgefällt. Das nun als weißer Faden sichtbare DNA-Pellet wurde nochmals für 3 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes in 200 μ l Aqua dest. (Pharmacia & Upjohns AS, Halden/Norwegen) resuspendiert. Nach abschließender Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C konnte das DNA-Pellet für einen späteren Gebrauch bei einer Temperatur von -72 °C gelagert werden. Somit war also je nach Notwendigkeit eine spätere bzw. wiederholte oder auch detailliertere DNA-Typisierung möglich.

Bei sofortiger Typisierung schloß sich der DNA-Präparation die Bestimmung des DNA-Gehaltes bzw. -Reinheitsgrades an. Die DNA-Konzentration wurde dabei über die Bestimmung der optischen Dichte (OD) am Spektrometer (UV/VIS-Spektrometer, Fa. Pharmacia) ermittelt. Hierzu wird die Extinktion der DNA-Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei eine Extinktion von 1,0 einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA entspricht.

Verunreinigungen durch Proteine wurden berücksichtigt, indem deren Extinktion bei $\lambda = 280$ nm gemessen und mit der optischen Dichte der DNA bei $\lambda = 260$ nm ins Verhältnis gesetzt wurde. Der so ermittelte Reinheitsindex der DNA (OD_{260}/OD_{280}) sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dieses vorausgesetzt, wurde die DNA auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l eingestellt.

3.3.3. PCR-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)

Nach Präparation der DNA war diese der Polymerasekettenreaktion zugänglich. Für die Amplifikation mittels PCR-SSP wurden kommerzielle Testkits verschiedener Firmen eingesetzt: für die Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale Primer-Kits der Firmen Deutsche Dynal AG (Hamburg) und CTS (Universität Heidelberg); für die Typisierung der HLA-Klasse II-Merkmale die Primer-Kits HLA-DRB/-DQB1 der Firmen BAG (Lich) und One Lambda (Cologna, USA) sowie die Primer-Kits HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 und -DQB1 der Firma Deutsche Dynal.

Die für den Reaktionsansatz notwendigen Materialien sind im sogenannten Mastermix und Primermix enthalten. Der Mastermix besteht aus jeweils 3 μ l PCR-Lösung (mit dNTPs zu gleichen Anteilen; s. Anlage 9.1.), 2 μ l der Proben-DNA mit insgesamt 100 ng DNA-Gehalt und 0,1 μ l Taq-Polymerase (0,4 Units AmpliTaq, AGS, Heidelberg). Der Primermix enthält jeweils ein spezifisches Primerpaar, welches die Amplifikation von DNA-Abschnitten bestimmter HLA-Allele bzw. -Allelgruppen gestattet, sowie ein Kontroll-Primerpaar, welches an

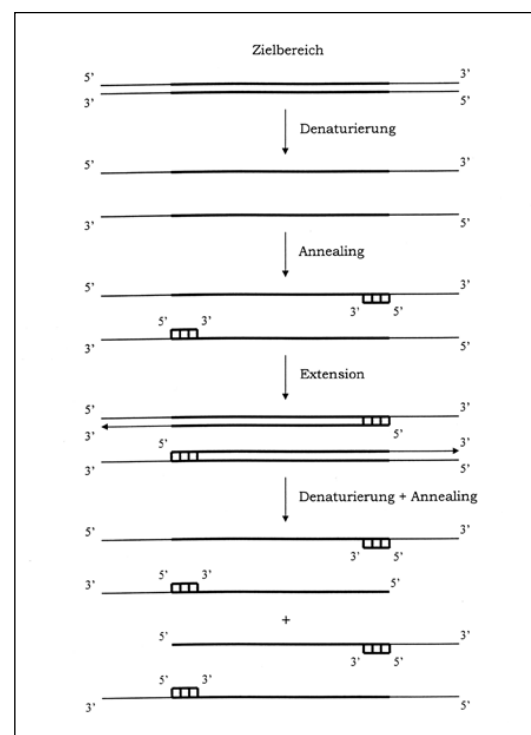


Abb. 6: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus (114)

nichtallelische Sequenzen bindet. Pro PCR-Reaktion wurden aus einem Set verschiedener Primermischungen jeweils 5 μl des Primermix einer entsprechenden HLA-Spezifität in einem Eppendorf Cap vorgelegt und weitere 5 μl des PCR-Mastermix zugegeben. Die Amplifikationsreaktion fand in einem programmierten Thermocycler (Gene Amp 9600, Perkin Elmer, Weiterbach) entsprechend den Firmenschemata statt. Folgendes Temperaturmodell wurde dabei durchlaufen: Nach 2minütiger Denaturierung bei 94 °C folgten 10 Zyklen mit jeweils 10 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung) und 60 Sekunden bei 65 °C (Annealing und Extension). Dem schlossen sich wiederum 20 Zyklen an, die aus jeweils 10 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung), 50 Sekunden bei 65 °C (Annealing) und 30 Sekunden bei 72 °C (Extension) bestanden (schematisch in Abb. 6).

Da der Komplex aus Primer und Matrizen-DNA bei einer geringeren Temperatur stabiler ist, führt eine Verringerung der Annealing-Temperatur nach den ersten 10 Zyklen zu einem größeren Gewinn an PCR-Produkten.

3.3.4. Nachweis der Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Hier diente die Agarosegelelektrophorese der Detektion der PCR-SSP-Produkte. Diese Methode erlaubt durch die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe innerhalb kurzer Zeit den Nachweis, ob eine Amplifikation stattgefunden hat bzw. ob ein PCR-Produkt in dem zu erwartenden Größenbereich liegt. Richtige Ergebnisse und unspezifische (falsch positive) PCR-Produkte können so unterschieden werden.

DNA-Moleküle sind negativ geladene Makromoleküle, die bei Anlegen einer elektrischen Spannung in einem geeigneten Laufpuffer (pH = 7,2) in Richtung Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei u.a. abhängig von der Größe der DNA-Fragmente. Längenstandards aus DNA-Fragmenten bekannter Größe werden parallel mit den PCR-Produkten aufgetragen und ermöglichen so die Ermittlung der Größe der Amplifikate. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid als DNA-Farbstoff zum Agarosegel ist eine anschließende Auswertung der Elektrophorese unter UV-Licht möglich (Fluoreszenz unter UV-Strahlung nach Interkalation von Ethidiumbromid an die DNA).

Zur Vorbereitung der Agarosegelelektrophorese wurden 3 g Agarose (Agarose N, Pharmacia, Uppsala) in 100 ml 1 x TBE-Laufpuffer (s. Anlage 9.1.) gelöst und in der Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 100 ml des Gels 30 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Fa. Merck, Darmstadt) zugesetzt. Anschließend wurde das Gel in spezielle Gelträger unter Vermeidung von Bläschen ausgegossen. Vor dem Erkalten wurden Kämmen in das Agarosegel getaucht, die Slots (12 Vertiefungen pro Kamm) für die Aufnahme der Amplifikate bildeten.

Das erstarrte Agarosegel (mindestens für 30 min im Kühlschrank) konnte dann in die Elektrophoresekammer (Pharmacia Biotech, Fa. Biometra, Berlin) überführt werden. Diese war mit Puffer gefüllt und mit entsprechenden Elektroden versehen. Die DNA-Produkte wurden mit jeweils 2 µl Blue-Ethidiumbromid-Marker (s. Anlage 9.1.) versetzt und mit einer Pipette in die Slots des Agarosegels eingefüllt. Nun wurde die Elektrophorese mit einer Spannung von 100 Volt für ca. 15 Minuten durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte unter UV-Licht an einem Transilluminator (GelPrint 1000i+, MWG Biotech, Ebersberg).

3.3.5. Differenzierungsgrad der HLA-Typisierung

Je nach Auflösungsvermögen der eingesetzten Primer-Kits können HLA-Merkmale mit der molekularbiologischen Typisierung unterschiedlich stark differenziert werden. So wird eine high-resolution- (hochauflösende) von einer low-resolution- (niedrigauflösenden) Typisierung unterschieden.

Mit Hilfe serologischer Techniken war es möglich, sowohl Haupt- als auch viele Feinmerkmale von HLA-Antigenen zu bestimmen. Auf Grund der begrenzten Spezifität der benutzten Antiseren war jedoch mitunter die Bestimmung einiger HLA-Merkmale nur im Ausschlußverfahren bzw. durch Kombinationen mit anderen nachgewiesenen HLA-Antigenen eines bekannten Haplotyps möglich. Nicht alle Splits der HLA-Merkmale konnten aber serologisch nachgewiesen werden. Bei der Interpretation der Resultate mußten außerdem (i.allg. bekannte) Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Antiseren berücksichtigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollten die serologisch erhaltenen HLA-A,B,C-

Typisierungsergebnisse molekularbiologisch abgesichert bzw. präzisiert werden. Hierzu wurden die HLA-Merkmale A, B, Cw, DR und DQ (mit Ausnahme der als HLA-Cwblank zusammengefaßten Merkmale) mit einer niedrigauflösenden (low-resolution) DNA-Typisierung molekulargenetisch überprüft. Dadurch konnten molekulargenetisch 20 HLA-A-, 40 HLA-B- und 15 HLA-Cw-Merkmale unterschieden werden.

Bei den nur mit PCR-SSP untersuchten HLA-Klasse II-Merkmalen konnten 14 HLA-DRB1- und 9 HLA-DQB1-Merkmale niedrig aufgelöst werden.

3.4. Statistische Methoden

Um die Ergebnisse der HLA-Typisierung der Astrozytompatienten und der Kontrollgruppe vergleichen zu können und die Frage nach einer möglichen Assoziation der Erkrankung mit einem Marker (z.B. HLA-Spezifitäten/Allele) klären zu können, wurden jeweils die Häufigkeiten (n) der untersuchten HLA-Merkmale gezählt und prozentual (Phänotypfrequenz) wiedergegeben.

Die Berechnung der statistischen Signifikanz von positiv und negativ assoziierten HLA-Merkmalen erfolgte über den Chi²-Heterogenitätstest (nach Pearson). Von einer Vierfeldertafel ausgehend wurde der jeweilige Chi²-Wert nach der Formel $\text{Chi}^2 = \sum (\text{O}-\text{E})^2/\text{E}$ (O= observed [beobachtet]; E= expected [erwartet]) berechnet. Da die so erhaltenen Chi²-Werte keine kontinuierliche, sondern eine diskrete Verteilung darstellen, d.h. nur eine Annäherung an die wahre Verteilung wiedergeben, war eine Berichtigung der Werte mittels der Yates-Kontinuitätskorrektur durchzuführen (p_y), um präzisere p-Werte zu erhalten (39). Dies gilt vor allem für kleinere Stichprobenumfänge. Allerdings wird dieses Verfahren von einigen Statistikern als zu konservativ angesehen - mögliche Assoziationen könnten übersehen werden. Folgende Berechnungsformel wurde eingesetzt:

$$T = N(|ad-bc|-N/2)^2 / [(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)] \quad (85).$$

Einen Freiheitsgrad vorausgesetzt, entspricht ein Chi²-Wert >3.84 einer Irrtumswahrscheinlichkeit <0.05. In diesem Fall wurde das Bestehen der Nullhypothese angezweifelt und die Assoziation als statistisch signifikant bewertet.

Für den Fall, daß eine der erwarteten bzw. beobachteten Häufigkeiten in der Vierfeldertafel ≤ 5 war, wurde zur Berechnung des p-Wertes Fisher's Exact Test verwendet (1, 39). Die Berechnung erfolgte mit Hilfe eines entsprechenden Computerprogramms (96).

Soweit eine Assoziation eines HLA-Merkmals mit Astrozytomen nicht aus früheren Studien bekannt war, mußte mit Hilfe der Bonferroni-Ungleichheitsmethode korrigiert und eine durch multiple Vergleiche innerhalb eines HLA-Locus entstehende zufällige Assoziation möglichst ausgeschlossen werden. Hierzu wurden die jeweils erhaltenen p-Werte mit der Anzahl der pro Locus untersuchten HLA-Spezifitäten (HLA-A: 14; HLA-B: 29; HLA-Cw: 14; HLA-DRB1: 13; HLA-DRB3/4/5: 4; HLA-DQB1: 7) multipliziert (p_b) (39).

Da zu untersuchende Haplotypen nicht mittels Familienanalyse bestimmt werden konnten, werden phänotypische Kombinationen von Antigenen, welche auf verschiedenen Loci liegen, hier als *geschätzte* Haplotypen (engl. estimated haplotypes) bezeichnet und als zwei- und drei-Locus-Kombinationen ermittelt (9, 68). Die statistische Analyse wurde entsprechend den oben beschriebenen Methoden durchgeführt.

In der vorliegenden Studie werden nur jene p-Werte aufgeführt, die nach Anwendung der konservativsten (stringentesten) statistischen Korrekturmethode noch signifikant waren.

Darüber hinaus wurde zur Beurteilung der Stärke einer Assoziation zwischen Krankheit und HLA-Antigenen das relative Risiko über die Formel $RR = ad/bc$ berechnet. Die Werte entstammen der bereits aufgeführten Vierfeldertafel. Für Häufigkeiten < 5 wurde die nach Haldane modifizierte Formel $RR_h = (2a+1)(2d+1)/(2b+1)(2c+1)$ angewandt (106). Ein relatives Risiko > 1 deutet auf eine positive, ein relatives Risiko < 1 auf eine negative Assoziation hin, wobei angegeben wird, um wievielfach höher bzw. niedriger das Risiko für einen Träger des entsprechenden Antigens im Vergleich zum Nicht-Antigenträger ist. Ein relatives Risiko von 1 entspricht einer fehlenden Krankheitsassoziation.

4. Ergebnisse

Frequenz der einzelnen HLA-Merkmale

Eine Übersicht gefundener HLA-Einzelspezifitäten ausgewählter HLA-Loci ist in Tabelle 2 zusammengefaßt. In der Gruppe der Patienten war - verglichen mit der Kontrollgruppe - die Häufigkeit folgender HLA-Antigene erhöht: HLA-A*25 ($p_c=0.04$), HLA-B*18 ($p=0.04$), HLA-B*27 ($p_c=0.03$), HLA-DRB1*15 ($p_c=0.03$), HLA-DRB5*(51) ($p=0.04$). Demgegenüber war die Frequenz von HLA-DRB1*07 bei den Gliompatienten im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant verringert ($p_c=0.02$). Jedoch behielt keine der gefundenen Differenzen ihre statistische Signifikanz nach Anwendung der stringenteren Bonferroni-Korrektur (Tab. 3).

Es konnten außerdem Unterschiede in der HLA-Antigenverteilung zwischen Männern und Frauen gefunden werden. Hierbei wurden aus der Kontrollgruppe nur die gesunden Probanden des jeweilig passenden Geschlechtes zum Vergleich herangezogen, beispielsweise wurden die männlichen Patienten nur mit den männlichen Kontrollprobanden verglichen. So hatten einerseits Gliompatientinnen signifikant erhöhte Frequenzen von HLA-DRB5*(51) ($p_b=0.02$), HLA-DRB1*15 ($p_c=0.01$) und HLA-B*27 ($p=0.02$), wogegen die Erhöhung dieser Antigene bei den männlichen Patienten nicht statistisch signifikant war (Tab. 4). Andererseits traten bei den letzteren die Merkmale HLA-A*25 und HLA-B*18 (beide $p_f=0.03$) statistisch signifikant häufiger auf. Die Häufigkeit von HLA-B*18 war hingegen für Frauen in beiden Gruppen identisch.

Häufigkeit des Auftretens von HLA-Antigenkombinationen und geschätzten Haplotypen

Die Kombination einzelner HLA-Antigene miteinander betreffend, konnte eine signifikant erhöhte Häufigkeit ($p_c=0.01$) der Kombination HLA-A*03,A*25 in der Patientengruppe gefunden werden (Tab. 5). In einigen *geschätzten* Haplotypen wurde bei den Gliompatienten HLA-A*25 ebenfalls in erhöhter Frequenz exprimiert, so z.B. in HLA-A*25:B*18 ($p_f=0.04$), HLA-A*25:Cw*12 ($p_c=0.01$), HLA-A*25:Cw*12:B*18 ($p_c=0.04$) und HLA-A*25:Cw*12:DRB1*15 ($p_c=0.04$) (Tab. 5). Darüber hinaus waren die Frequenzen der Kombinationen HLA-Cw*02,Cw*07

($p_c=0.009$), HLA-DRB1*01,DRB1*15 ($p_f=0.04$) und - besonders hervorzuheben - HLA-DRB1*11,DRB1*15 ($p_b=0.01$) signifikant erhöht (Tab. 5).

Des Weiteren war im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Patienten eine erhöhte Frequenz der *geschätzten* Haplotypen HLA-A*25:DRB1*15 ($p=0.04$), HLA-B*07:DRB1*15 ($p_c=0.01$), HLA-B*18:DRB1*15 ($p_c=0.04$), HLA-Cw*07:DRB1*15 ($p_c=0.02$), HLA-Bw*6:DRB1*15 und HLA-DRB1*15:DRB5*(51) (beide $p_c=0.03$) sowie des erweiterten *geschätzten* Haplotyps HLA-DRB1*15:DRB5*(51):DQB1*06 ($p=0.03$) zu finden.

Im Gegensatz dazu kamen Patienten mit dem Klasse II-Merkmal HLA-DRB1*07 signifikant weniger häufig vor, als nach der Normalverteilung zu erwarten wäre ($p_c=0.02$). Gemessen an den Kontrollprobanden waren die Frequenzen der *geschätzten* Haplotypen HLA-Cw*06:DRB1*07 ($p_c=0.03$), HLA-Bw4:DRB1*07 ($p_c=0.006$), HLA-DRB1*07:DRB4*(53) ($p_c=0.02$), HLA-DRB1*07:DQB1*02 ($p_c=0.03$) und HLA-DRB1*07:DRB4*(53):DQB1*02 ($p_c=0.04$) bei den Patienten ebenfalls verringert.

Weiterhin konnte im Vergleich zur Normalverteilung eine erhöhte Frequenz von Gliompatienten mit den *geschätzten* HLA-Haplotypen Cw*07:DRB1*15:DQB1*06 ($p_c=0.04$), Cw*07:DRB1*15,DQB1*07 ($p_c=0.01$), DRB1*15:DRB5*(51),DQB1*07 ($p_c=0.03$) und Cw*06:DQB1*05 ($p_c=0.01$) festgestellt werden (Tab. 5).

Lediglich bei den weiblichen Patienten konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der Kombinationen HLA-A*03,A*25 ($p_f<0.05$) und HLA-Cw*02,Cw*07 ($p_c=0.03$) nachgewiesen werden. Bei den männlichen Patienten waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (Tab.6). Die Kombination HLA-DRB1*11,DRB1*15 hingegen war - verglichen mit der jeweils entsprechenden Kontrollgruppe - in beiden Gruppen erhöht mit $p_f=0.03$ für die männlichen ($RR_h=6.6$) und $p_f<0.05$ für die weiblichen Patienten ($RR_h=19.3$). Es konnte außerdem eine signifikant höhere Anzahl von Patientinnen mit den *geschätzten* Haplotypen HLA-Cw*07:DRB1*15:DQB1*06 ($p_c=0.004$) und HLA-B*07:DRB1*15 ($p_c=0.001$) gefunden werden. Für die männlichen Patienten konnte dies nicht bestätigt werden. Der *geschätzte* Haplotyp HLA-Cw*06:DQB1*05 war in der Gruppe der Gliompatientinnen ebenfalls erhöht (Tab. 6).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß andere Variationen dieser erweiterten *geschätzten* Haplotypen, wie z.B. HLA-DRB1*15:DRB5*(51):DQB1*06, in höherer Frequenz bei den weiblichen Patienten vorkamen ($p_c=0.01$). Bei den männlichen Probanden hingegen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der Frequenzen dieser *geschätzten* Haplotypen gefunden werden (Tab. 6).

In der Verteilung der Homozygotiefrequenzen unterschieden sich Gliompatienten und Kontrollprobanden weder in den Gesamtgruppen noch in den nach Geschlecht unterteilten Gruppen.

Sowohl bezüglich der Frequenzen der einzelnen HLA-Merkmale als auch der Häufigkeiten des Auftretens von HLA-Antigenkombinationen und *geschätzten* Haplotypen wurden männliche und weibliche Gliompatienten miteinander verglichen, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Studienkollektiven.

Zum Ausschluß zufälliger Assoziationen wurde neben der Yates-Kontinuitätskorrektur die unter 3.4. beschriebene Bonferroni-Korrektur als stringenteste statistische Korrekturmethode durchgeführt. Die hierfür verwendeten Faktoren entsprachen der Anzahl der untersuchten bzw. ermittelten HLA-Marker, -Kombinationen und -Haplotypen. Bei den HLA-Loci für HLA-DRB3/4/5/blank war er beispielsweise ,4', bei HLA-A ,14' und bei der Kombination der beiden HLA-DRB1-Loci bereits ,74'; bei den *geschätzten* Zwei-Locus-Haplotypen HLA-A,B immerhin schon ,232' bis hin zu ,446' für die *geschätzten* Drei-Locus-Haplotypen für HLA-Cw,DR,DQ und gar ,767' für die *geschätzten* Haplotypen HLA-A,Cw,B. Hieraus ist auch ersichtlich, daß die auf Grund der Komplexität des HLA-Systems anfallenden Datenmengen nur mit Hilfe entsprechender Computerprogramme zu erfassen und zu verarbeiten sind.

5. Tabellen

Tabelle 1: Katamnestische Patientendaten. n.v. – nicht verfügbar (keine Sterbefälle in dieser Untergruppe zu Studienschluß)

Tumortyp	WHO grading	Anzahl Patienten	Frauen	Männer	Durchschnittsalter (Jahre)	Überlebenszeit (Monate)
Glioblastom	G IV	41	20	21	59.4±2	12.1±2
anaplastisches Astrozytom	G III	17	5	12	48.8±3	36.4±15
niedriggradiges Astrozytom	G II	7	1	6	41.7±6	n.v.
Gesamt:		65	26	39	55.1±13.1	-

Tabelle 2: Frequenzen gefundener HLA-Einzelmerkmale ausgewählter HLA-Loci (in %). H- Anzahl Homozygoter Gesamt. Berechnet wurden Phänotypfrequenzen ($\Sigma=200\%$).

A	Kontrollen	Patienten	Cw	Kontrollen	Patienten	B	Kontrollen	Patienten	DR	Kontrollen	Patienten	DQ	Kontrollen	Patienten
1	31.9	26.2	1	21.0	9.2	7	21.0	29.2	1	19.8	29.2	2	41.4	29.2
2	48.4	49.2	2	8.9	13.9	8	21.7	13.9	4	22.9	20.0	4	8.9	6.2
3	25.5	35.4	3	8.3	18.5	13	9.6	7.7	7	28.0	12.3	5	28.0	38.5
11	8.3	9.2	4	26.1	16.9	14	5.1	9.2	8	9.6	6.2	6	44.0	46.2
23	4.5	0.0	5	8.9	12.3	18	7.6	16.9	9	0.6	1.5	7	41.4	49.2
24	19.1	16.9	6	23.6	21.5	27	7.6	18.5	10	0.6	0.0	8	15.9	12.3
25	5.7	15.4	7	49.7	61.5	35	18.5	15.4	11	24.2	32.3	9	8.3	6.2
26	10.8	4.6	8	5.1	9.2	37	5.7	3.1	12	4.5	1.5	H	12.1	12.3
28	11.5	10.8	12	12.1	15.4	38	7.6	3.1	13	29.9	20.0			
29	5.1	4.6	13	0.6	0.0	39	5.7	6.2	14	3.8	6.2			
30	4.5	3.1	14	1.9	3.1	41	0.6	1.5	15	17.8	32.3			
31	3.8	4.6	15	7.0	1.5	44	15.9	15.4	16	3.8	3.1			
32	5.7	6.2	16	5.1	6.2	45	1.9	0.0	17	24.8	21.5			
33	1.3	3.1	17	0.6	0.0	47	1.3	3.1	H	9.6	13.9			
H	14.0	10.8	H	19.8	10.7	49	1.9	1.5						
						50	1.9	3.1						
						51	11.5	7.7						
						52	0.6	3.1						
						53	0.6	0.0						
						55	3.2	0.0						
						56	1.9	6.2						
						57	7.6	1.5						
						58	1.9	3.1						
						60	9.6	3.1						
						61	3.2	1.5						
						62	15.3	16.9						
						63	1.3	1.5						
						73	0.0	1.5						
						75	0.6	0.0						
						H	8.9	6.2						

Tabelle 3: Frequenzen von HLA-Antigenen bei Gliompatienten verglichen mit Kontrollprobanden. n.s.- nicht signifikant; _f Fisher's Exakter Test; _c- Yates Kontinuitätskorrektur; _b- Bonferroni Korrektur; RR-relatives Risiko. RR wurde nur für statistisch signifikante Werte berechnet. Kursiv gedruckte HLA-Antigene sind lediglich zum Vergleich mit anderen Studien aufgeführt. HLA-DRB1*13/14 besteht aus den zwei Einzelantigenen und entspricht HLA-DRw6 (36).

HLA-	Kontrollen (%) (n=157)	Patienten (%) (n=65)	p-Wert	RR
<i>A*24</i>	19.1	17.0	<i>n.s.</i>	-
<i>A*25</i>	5.7	15.4	0.04 _c	3.0
<i>B*18</i>	7.6	16.9	0.04	2.5
<i>B*27</i>	7.6	18.5	0.03 _c	2.7
<i>B*35</i>	18.5	15.4	<i>n.s.</i>	-
<i>B*61</i>	3.2	1.5	<i>n.s.</i>	-
<i>DRB1*01</i>	19.8	29.2	<i>n.s.</i>	-
<i>DRB1*07</i>	28.0	12.3	0.02 _c	0.4
<i>DRB1*13/14</i>	33.8	26.2	<i>n.s.</i>	-
<i>DRB1*15</i>	17.8	32.3	0.03 _c	2.2
<i>DRB5*(51)</i>	22.3	35.4	0.04	1.9

Tabelle 4: Geschlechtsspezifische HLA-Antigenfrequenzen bei Gliompatienten und Kontrollprobanden. n.s. - nicht signifikant; _f Fisher's Exakter Test; _c- Yates Kontinuitätskorrektur; _b- Bonferroni Korrektur; RR-relatives Risiko; RR_h- Haldane Methode. RR_(h) wurde nur für statistisch signifikante Werte berechnet.

HLA-	Männer				Frauen			
	Kontrollen (%)	Patienten (%)	p-Wert	RR	Kontrollen (%)	Patienten (%)	p-Wert	RR
	(n=63)	(n=39)			(n=94)	(n=26)		
A*25	4.8	18.0	0.03 _f	4.0 _h	6.4	11.5	n.s.	-
B*18	7.9	23.1	0.03 _f	3.5	7.5	7.7	n.s.	-
B*27	7.9	15.4	n.s.	-	7.5	23.1	0.02	3.7
DRB1*15	19.1	25.6	n.s.	-	17.0	42.3	0.01 _c	3.6
DRB5*(51)	27.0	28.2	n.s.	-	19.2	46.2	0.02 _b	3.6

Tabelle 5: Frequenzen ausgewählter HLA-Kombinationen und *geschätzter* Haplotypen bei Gliompatienten und Kontrollprobanden. n.s.- nicht signifikant; _f- Fisher's Exakter Test; _c- Yates Kontinuitätskorrektur; _b- Bonferroni Korrektur; RR-relatives Risiko; RR_n- Haldane Methode. RR_(h) wurde nur für statistisch signifikante Werte berechnet. Kursiv gedruckte HLA-Antigene sind lediglich zum Vergleich mit anderen Studien aufgeführt.

HLA-	Kontrollen (%) (n=157)	Patienten (%) (n=65)	p-Wert	RR
A*03, A*25	0.6	7.7	0.01 _c	9.5 _h
Cw*02, Cw*07	2.6	12.3	0.009 _c	5.0 _h
DRB1*01,DRB1*15	1.9	7.7	0.04 _f	4.0 _h
DRB1*11,DRB1*15	0.6	10.8	0.01 _b	13.4 _h
Bw*4:DRB1*07	24.8	7.7	0.006 _c	0.3
Bw*6:DRB1*15	16.6	30.8	0.03 _c	2.2
Cw*06,DQB1*05	1.9	10.8	0.01 _c	5.7 _h
<i>B*35:DRB1*01</i>	6.4	9.2	<i>n.s.</i>	-
B*07:DRB1*15	11.5	26.2	0.01 _c	2.7
Cw*06:DRB1*07	14.7	3.1	0.03 _c	0.2 _h
DRB1*07:DRB4*(53)	27.4	12.3	0.02 _c	0.4
DRB1*15:DRB5*(51)	17.8	32.3	0.03 _c	2.2
DRB1*07:DQB1*02	20.4	7.7	0.03 _c	0.3
A*25:Cw*12	0.6	7.7	0.01 _c	9.5 _h
A*25:B*18	1.9	7.7	0.04 _f	4.0 _h
A*25:DRB1*15	0.6	4.6	0.04	5.8 _h
Cw*07:DRB1*15	13.4	27.7	0.02 _c	2.5
B*18:DRB1*15	0.6	6.2	0.04 _c	7.6 _h
A*25:Cw*12:B*18	0.6	6.2	0.04 _c	7.6 _h
A*25:Cw*12:DRB1*15	0.0	4.6	0.04 _c	17.6 _h
Cw*07:DRB1*15:DQB1*06	13.4	26.2	0.04 _c	2.3
Cw*07:DRB1*15,DQB1*07	1.3	9.2	0.01 _c	6.8 _h
DRB1*15:DRB5*(51):DQB1*06	17.8	30.8	0.03	2.1
DRB1*15:DRB5*(51),DQB1*07	2.6	10.8	0.03 _c	4.4 _h
DRB1*07:DRB4*(53):DQB1*02	19.8	7.7	0.04 _c	0.3

Tabelle 6: Geschlechtsspezifische Frequenzen ausgewählter HLA-Kombinationen und *geschätzter* HLA-Haplotypen bei Gliompatienten und Kontrollprobanden. n.s.- nicht signifikant; _f- Fisher's Exakter Test; _c- Yates Kontinuitätskorrektur; _b- Bonferroni Korrektur; RR-relatives Risiko; RR_h- Haldane Methode. RR_(h) wurde nur für statistisch signifikante Werte berechnet. Kursiv gedruckte HLA-Antigene sind lediglich zum Vergleich mit anderen Studien aufgeführt.

HLA-	Männer				Frauen			
	Kontrollen (%)	Patienten (%)	p-Wert	RR	Kontrollen (%)	Patienten (%)	p-Wert	RR
	(n=63)	(n=39)			(n=94)	(n=26)		
A*03,A*25	1.6	7.7	n.s.	-	0.0	7.7	0.05 _f	19.3 _h
Cw*02,Cw*07	3.2	10.3	n.s.	-	2.1	15.4	0.03 _c	7.4 _h
DRB1*11,DRB1*15	1.6	12.8	0.03 _f	6.6 _h	0.0	7.7	0.05 _f	19.3 _h
DRB1*15:DRB5*(51):DQB1*06	19.1	23.1	n.s.	-	17.0	42.3	0.01 _c	3.6
B*07:DRB1*15	14.3	18.0	n.s.	-	9.6	38.5	0.001 _c	5.9
Cw*06,DQB1*05	3.2	10.3	n.s.	-	1.1	11.5	0.04 _c	9.3 _h
Cw*07:DRB1*15:DQB1*06	15.9	18.0	n.s.	-	11.7	38.5	0.004 _c	4.7

6. Diskussion

In der vorliegenden Studie konnten statistisch signifikante Korrelationen einzelner HLA-Antigene mit symptomatischen glialen Hirntumoren bei erwachsenen kaukasischen Patienten nachgewiesen werden. So könnten Individuen, die die HLA-Antigene A*25, B*18, B*27 oder DRB1*15 exprimieren, ein höheres Risiko besitzen, ein Gliom zu entwickeln (RR: 3.0, 2.5, 2.7 bzw. 2.2), wohingegen das relative Risiko HLA-DRB*07 exprimierender Individuen verringert zu sein scheint ($p_c=0.02$, RR=0.4). Innerhalb der nach Geschlecht getrennten Gruppen traten einige der Ergebnisse sogar noch ausgeprägter zu Tage. Die Frequenz von HLA-A*25 war bei den männlichen Patienten höher, was in einem höheren relativen Risiko resultierte (RR=4.0). Für HLA-B*18 konnte ein 3.5fach erhöhtes Erkrankungsrisiko berechnet werden. Letzteres Phänomen könnte mit dem Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA-A*25 und HLA-B*18 erklärt werden (10), d.h. auf Grund der erhöhten Frequenz von HLA-A*25 würde auch HLA-B*18 mit erhöht auftreten. Entsprechendes könnte auch für die noch folgend aufgeführten erweiterten *geschätzten* Haplotypen gelten. Bei weiblichen Patienten war HLA-B*27 signifikant erhöht und mit einem 3.7fachen Erkrankungsrisiko assoziiert ($p=0.02$), ebenso wie HLA-DRB1*15 ($p_c=0.01$, RR=3.6) (Tab. 3 und 4).

Einige HLA-Kombinationen und *geschätzte* Haplotypen könnten bei solchen Patienten vorherrschend sein, die während ihres Erwachsenenlebens ein zerebrales Gliom entwickeln. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten lassen vermuten, daß es einzelne HLA-Antigene gibt, die für einen für diese Krankheit anfälligen Phänotyp kodieren und daß das relative Risiko für das Eintreten dieser Erkrankung steigt, wenn diese Antigene mit bestimmten Haplotypen assoziiert sind. So ergab sich bei einer Kombination von HLA-DRB1*15:DRB5*(51) und HLA-DRB1*11 ein stark erhöhtes relatives Risiko für Gliome ($RR_h=13.4$). Des weiteren war das gleichzeitige Auftreten von HLA-A*03 und HLA-A*25 (HLA-A*03,A*25) bei einem Individuum mit einem 9.5fach erhöhten Gliomrisiko (RR_h) verbunden. Bei den weiblichen Patienten betrug das relative Risiko (RR_h) für beide Kombinationen 19.3 ($p_f=0.05$) (Tab. 5 und 6). Diese beiden Kombinationen waren aber in keinem Falle gleichzeitig bei ein und demselben Patienten anzutreffen, d.h., daß Patienten, die HLA-DRB1*11 und HLA-DRB1*15 nie

HLA-A*03,A*25 zur gleichen Zeit exprimierten. Zusätzlich konnte die Kombination HLA-Cw*02,Cw*07 signifikant häufiger bei weiblichen Patienten als bei den weiblichen Kontrollen gefunden werden ($RR_h=7.4$). Filterte man die HLA-DRB1*11 und HLA-DRB1*15 positiven Probanden heraus und untersuchte ausschließlich diese bezüglich der Häufigkeit vorhandener einzelner HLA-Marker und auch Haplotypen, konnten keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. Allerdings war für eine Analyse der sehr komplexeren erweiterten Haplotypen die Zahl der Probanden recht klein, weshalb lediglich Trends vermutet werden konnten. Ein größeres Probandenkollektiv wäre für diese Betrachtung nötig.

Die hier aufgeführten einzelnen HLA-Antigene mit abweichenden Frequenzen waren in verschiedenen *geschätzten* Haplotypen signifikant erhöht, z.B. HLA-A*25:B*18; HLA-A*25:Cw*12; HLA-A*25:DRB1*15; HLA-B*18:DRB1*15 (RR_h : 4.0, 9.5, 5.8 bzw. 7.6). Wie bereits erwähnt, könnte auch hier das Kopplungsungleichgewicht für ein erhöhtes Auftreten von HLA-B*18 verantwortlich und somit ein Einfluß von HLA-B*18 auf die Krankheitsentstehung fraglich sein. Allerdings war dieses Merkmal bereits im Zusammenhang mit dem Kaposi-Sarkom (58), kolorektalem Karzinom (27) sowie Leukämie (83) und deren Behandlungsaussichten (30) auffällig, jedoch auch als sogenannter Resistenz-Marker (75).

Die folgenden erweiterten *geschätzten* Haplotypen kamen bei Patienten signifikant häufiger vor als bei den Kontrollprobanden: HLA-A*25:Cw*12:B*18 ($RR_h=7.6$); HLA-A*25:Cw*12:DRB1*15 ($RR_h=17.6$); HLA-Cw*07:DRB1*15,DQB1*07 ($RR_h=6.8$) und HLA-DRB1*15:DRB5*(51),DQB1*07 ($RR_h=4.4$). Die entsprechenden p-Werte können der Tabelle 5 entnommen werden. Das Vorhandensein von HLA-Cw*06:DQB1*05 bei Patientinnen entsprach einem 9.3fach erhöhten Risiko (RR_h) einer Gliomerkrankung ($p_c=0.04$). Andererseits könnten das Vorhandensein von HLA-Cw*06:DRB1*07 ($RR_h=0.2$) und HLA-DRB1*07:DRB4*(53):DQB1*02 ($RR=0.3$) das relative Risiko einer Gliomerkrankung vermindern (Tab. 5). Auch hier sollte wiederum betont werden, daß bezüglich der aufgeführten erweiterten *geschätzten* Haplotypen die gefundenen Resultate auf Grund der geringen Stichprobenumfänge mit Vorsicht zu interpretieren sind.

Trotzdem deuten die ermittelten Daten darauf hin, daß die Anfälligkeit für Gliomerkrankungen mit sowohl HLA-Kombinationen und HLA-Haplotypen als auch einzelnen HLA-Antigenen assoziiert sein kann.

HLA und solide periphere Tumoren

Assoziationen von HLA-Markern mit soliden Tumoren, wie z.B. dem kolorektalen Karzinom, Nasopharynx- oder Schilddrüsenkarzinom, sind zurückliegend bereits beschrieben worden (21, 25, 27, 100). Wie in dieser Studie vornehmlich bei männlichen Patienten (Tab. 3 und 4) wurde HLA-B*18 bei malaiischen Patienten mit Pharynxkarzinom ($p_c=0.0027$; $RR=4.4$) (25) und in einer griechischen Studie bei Patienten, die mit einem kolorektalen Karzinom diagnostiziert wurden, ($p<0.025$; $odds\ ratio=2.3$) (27) signifikant erhöht gefunden. Romano et al. (84) fanden eine signifikante Assoziation zwischen HLA-DR7 (heute bekannt als HLA-DRB1*07) und einer geringeren Anfälligkeit gegenüber Lungenkrebs, was den Befunden der vorliegenden Arbeit entspricht (Tab. 3 und 5). Demgegenüber zeigten Sridama et al. (100) eine signifikante Erhöhung der HLA-DR7-Expression bei Patienten mit Schilddrüsenkrebs auf ($p_c<0.004$). In einer Studie zum Nierenzellkarzinom fanden Kantor et al. (59) erhöhte Frequenzen der Einzelmerkmale HLA-DR8 und HLA-Bw44 sowie des Haplotyps HLA-A3B7DR2 (HLA-DR2 heute die HLA-Splits DRB1*15 und DRB1*16).

In einer weiteren der noch verhältnismäßig wenigen Studien, in der auch erweiterte Haplotypen betrachtet wurden, beschrieben Hildesheim et al. (49) im Gegensatz zur vorgelegten Studie eine negative Assoziation von HLA-DRB1*1501:DQB1*0602 mit Neoplasien der Cervix ($RR=0.21$). Andere Studien hingegen (63, 89), die ebenso Neoplasien der Cervix auf mögliche Assoziationen mit spezifischen HLA-Markern untersuchten, ergaben ähnlich den Schlußfolgerungen bei den hier untersuchten Gliompatienten, daß HLA-DRB1*1501 und HLA-DQB1*0602 das Risiko von Erkrankungen der Cervix eher erhöhen können.

Es ist ersichtlich, daß es hier noch keinen wirklichen Konsens gibt, ob es eine zweifelsfreie Korrelation spezifischer HLA-Marker mit soliden Tumoren gibt, obwohl die Autoren überzeugt sind, daß das HLA-System einen Einfluß auf die Anfälligkeit gegenüber Tumoren bzw. auf die Entwicklung solider Tumoren ausübt. Über eine eventuelle Einbeziehung des HLA-Typs zu diagnostischen und

prognostischen Zwecken kann derzeit keine endgültige Aussage gemacht werden. Zur Zeit ist die Interpretation und der Vergleich von Ergebnissen - zumindest teilweise - auf Grund der geringen Anzahl von Studien und der darin untersuchten Patienten und Kontrollprobanden noch schwierig.

Wie in der Einleitung aufgeführt, wurden bereits zu vielen - auch nichtneoplastischen - Erkrankungen Untersuchungen zum Einfluß des HLA-Systems auf Entstehung, Verlauf und Prognose durchgeführt. An dieser Stelle sollen noch die Narkolepsie und die Multiple Sklerose erwähnt werden. Obwohl auf Grund verschiedener Beobachtungen von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen werden muß, konnte in einer Studie zur Narkolepsie (80) bei spanischen Patienten eine positive Assoziation mit dem HLA-Haplotyp DRB1*1501-DRB5*0101-DQA1*0102-DQB1*0602 gefunden werden, während der Haplotyp DRB1*0701-DRB4*01-DQA1*0201-DQB1*02 bei den Patienten verringert war. Diese zwei Ergebnisse traten auch in der vorliegenden Arbeit auf, allerdings auf Ebene der low-resolution-Typisierung. Und auch bei der Multiplen Sklerose wurde mehrfach ein möglicher Einfluß des HLA-Merkmals DRB1*15 diskutiert (26, 40).

HLA und gliale Tumoren

Nitta et al. (76) untersuchten eine Gruppe japanischer Gliompatienten (42 Probanden) und berichteten von einer signifikant erhöhten Frequenz an HLA-A24(A9) (heute bekannt als HLA-A*24) bei diesen Probanden ($p < 0.05$). Demgegenüber konnte in unserer Untersuchung eine erhöhte Frequenz von HLA-A*24 nicht bestätigt werden (Tab. 3). Auch in einer anderen japanischen Patientengruppe (35 Probanden), die von Takai et al. untersucht wurde (102), konnte ein vermehrtes Auftreten von HLA-A24 im Rahmen einer gliomatösen Erkrankung nicht bestätigt werden. Jedoch fanden diese Autoren eine erhöhte HLA-B61-Expression ($p_c < 0.064$), welche wiederum nicht in der anderen japanischen Patientengruppe gefunden werden konnte. In der vorliegenden Arbeit war die Frequenz von HLA-B61 (heute bekannt als HLA-B*40) bei Gliompatienten tendenziell eher verringert (Tab. 3). Des weiteren beschreiben Takai et al. das Fehlen von HLA-DRw6 (heute als die Splits HLA-DRB1*13 und HLA-DRB1*14 bekannt) ($p_c < 0.04$) bei den von ihnen untersuchten Patienten. In der

vorliegenden Studie war diese Korrelation statistisch nicht signifikant (Tab. 3). Da hier jedoch kaukasische Patienten aus Deutschland untersucht wurden, könnten rassische Unterschiede bei den HLA-Assoziationen für die Diskrepanzen im Vergleich zu den japanischen Gruppen verantwortlich sein (11). Ebenso ist in den beiden japanischen Untersuchungen das Studienkollektiv nicht in männliche und weibliche Probanden unterteilt worden.

Wie in der vorliegenden Studie untersuchten De Moerloose et al. (36) eine kaukasische Gruppe von Schweizer Gliompatienten und fanden eine erhöhte Frequenz von HLA-Bw35 und HLA-DRw1 (heute bekannt als HLA-B*35 und HLA-DRB1*01), zwischen denen ein Kopplungsungleichgewicht bekannt ist (8) und daher vermutet wurde, daß der HLA-Haplotyp Bw35:DRw1 als Ganzes eine Rolle bei Gliomerkrankungen spielen könnte. Jedoch blieben die p-Werte nach Korrektur nicht länger im signifikanten Bereich. Bei der Untersuchung der Verteilung beider HLA-Antigene bezogen auf Alter bei Diagnosestellung, Blutgruppe und Grad der Malignität konnte keine klare Assoziation gefunden werden. Lediglich bei Unterscheidung der Geschlechter war HLA-Bw35 bei 44.7% der männlichen und nur 21.2% der weiblichen Patienten zu finden ($p < 0.05$). In der vorliegenden Studie konnte - verglichen mit den Kontrollprobanden - kein signifikanter Unterschied der Frequenzen von HLA-Bw35 (HLA-B*35) und des *geschätzten* Haplotyps HLA-B*35:DRB1*01 bei den Patienten gefunden werden (Tab. 3 und 5). Unabhängig davon wurde in der Studie von De Moerloose et al. entsprechend gängiger Literatur ein Überwiegen männlicher Patienten (47 vs. 33 Frauen (1.4:1) (117) sowie ein Durchschnittsalter von 51 Jahren registriert (14, 51, 113) - zwei Charakteristika glialer Tumoren (14, 50). In der vorliegenden Studie wurden 39 Männer vs. 26 Frauen (1.5:1) untersucht sowie ein Durchschnittsalter von 55 Jahren ermittelt (s. Tab. 1).

Einige der in dieser Arbeit aufgeführten HLA-Antigene bzw. *geschätzten* Haplotypen zeigten lediglich bei männlichen oder weiblichen Patienten einen signifikanten Unterschied in der Frequenz. Geschlechtsspezifische Unterschiede bei HLA-Assoziationen sind auch von anderen Krankheiten bekannt, wie z.B. der Psoriasis, der Leukämie oder rheumatischen Krankheiten (37, 53, 67). Diese Unterschiede könnten durch den Einfluß des HLA-Komplexes auf die Konzentration von Geschlechtshormonen (53) und deren mögliche Beeinflussung der Tumorentstehung erklärt werden (38, 44).

7. Zusammenfassung

Gliale Hirntumoren stellen schwer zu behandelnde, invasive Neoplasien dar, und trotz fortwährender therapeutischer Verbesserungen konnte in den letzten Jahrzehnten nur ein relativ geringer klinischer Fortschritt erreicht werden. Im Rahmen der Immunantwort gegen infektiöse Agenzien und maligne Zellen spielt die Expression humaner Leukozytenantigene eine essentielle Rolle. Untersuchungen zu Assoziationen einzelner HLA-Antigene oder HLA-Haplotypen mit verschiedenen Krankheiten haben u.a. Korrelationen zwischen verschiedenen HLA-Markern und Krebserkrankungen aufgezeigt. Bisher gibt es jedoch erst wenige Untersuchungen zu Assoziationen zwischen dem HLA-System und glialen Tumoren. Obwohl klinisch noch nicht unbedingt verwendbar, sind sie ein notwendiger Beitrag zum Verständnis der Mechanismen der Karzinogenese.

In der vorliegenden Studie wurden 65 deutsche Gliompatienten kaukasischer Abstammung bezüglich der Verteilung ihrer HLA-Klasse I- und -Klasse II-Merkmale untersucht und mit einer vergleichbaren Gruppe gesunder Kontrollprobanden der gleichen Region verglichen. Die Typisierung erfolgte mittels serologischer und molekulargenetischer Methoden; die Diagnose wurde gemäß WHO-Standards gestellt.

Nach statistischer Auswertung konnten in der vorliegenden Studie signifikante Korrelationen sowohl einzelner HLA-Antigene als auch von HLA-Antigenkombinationen und *geschätzten* erweiterten HLA-Haplotypen demonstriert werden. So könnten Individuen, die die HLA-Antigene A*25, B*18, B*27 oder DRB1*15 exprimieren, ein höheres Risiko besitzen, ein Gliom zu entwickeln, wohingegen das relative Risiko HLA-DRB*07 exprimierender Individuen verringert zu sein scheint, also einen protektiven Faktor darstellt.

Besonders beim Auftreten einer Kombination von HLA-DRB1*15:DRB5*(51) und HLA-DRB1*11 schien das relative Risiko, an einem Gliom zu erkranken, stark erhöht. Darüber hinaus war das gleichzeitige Auftreten von HLA-A*03 und HLA-A*25 bei einem Individuum mit einem erhöhten Gliomrisiko verbunden. Zusätzlich konnte die Kombination HLA-Cw*02,Cw*07 signifikant häufiger bei den Patienten als bei den Kontrollprobanden gefunden werden. Ebenso kamen

die folgenden erweiterten *geschätzten* Haplotypen bei Patienten signifikant häufiger vor als bei den Kontrollen: HLA-A*25:Cw*12:B*18; HLA-A*25:Cw*12:DRB1*15; HLA-Cw*07:DRB1*15,DQB1*07 und HLA-DRB1*15:DRB5*(51),DQB1*07.

Besonders bei HLA-DRB1*15 als einzelner Merkmal als auch in Kombination bzw. als *geschätzter* HLA-Haplotyp mit anderen HLA-Markern waren die Unterschiede innerhalb des weiblichen Studienkollektivs ausgeprägter bzw. ausschließlich dort vorhanden, was darauf schließen ließe, daß das Geschlecht Einfluß auf die Tumorentstehung ausübt.

Aus der Arbeit ergeben sich auch Hinweise darauf, daß nicht unbedingt nur Einzelspezifitäten des HLA-Systems ausschlaggebend für die Tumorgenese sind, sondern eher das Auftreten bestimmter Kombinationen von HLA-Markern oder -Haplotypen hierfür verantwortlich ist.

8. Literaturverzeichnis

1. Agresti A: A Survey of Exact Inference for Contingency Tables. *Statistical Science* 7 (1992) 131-177
2. Atwood HL, MacKay WA: *Neurophysiologie*. Schattauer, Stuttgart New York, 1994
3. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K: *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York, 1987, S. 2.1.1.
4. Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER: Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317 (1985) 359-361
5. Bach FH, Albertini RJ, Amos DB, Ceppellini R, Mattiuz PL, Miggiano VC: Mixed leukocyte culture studies in families with known HL-A genotypes. *Transplant Proc* 1 (1969) 339-341
6. Bach FH, Hirschorn K: Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility test in vitro. *Science* 143 (1964) 813
7. Bateman AC, Howell WM: Human leukocyte antigens and cancer: is it in our genes? *J Pathol* 188 (1999) 231-236
8. 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-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1984, S. 677-755
9. Baur MP, Danilovs JA: Population analysis of HLA-A, B, C, DR and other genetic markers. In: Terasaki PI (Hrsg): *Histocompatibility testing 1980*. Munksgaard, Copenhagen, Denmark, 1980, S. 955
10. Baur MP, Neugebauer M, Albert ED: Reference tables of three-locus haplotype frequencies and delta values in Caucasians, Orientals and Negroids. In: Albert ED, Baur MP, Mayr WR (Hrsg): *Histocompatibility Testing 1984*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1984a, S. 756-760

11. Baur MP, Neugebauer M, Deppe H, Sigmund M, Luton T, Mayr WR, Albert ED: Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. In: Albert ED, Baur MP, Mayr WR (Hrsg): *Histocompatibility Testing 1984*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1984b, S. 333-341
12. Bender K: *Das HLA- System*. Biotest AG, Dreieich, 1987
13. Bernstein M: Low-grade gliomas: in search of evidence-based treatment. *Clin Neurosurg* 44 (1997) 315-330
14. Billiar T, D'Athis P, Borsotti J P, Sautreaux J L, Maingon P, Janoray P, Giroud M, Dumas R: Survival rates of malignant gliomas in Burgundy from 1990 to 1995. *Neurol Res* 21 (1999) 171-174
15. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329 (1987a) 506-512
16. 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 (1987b) 512-518
17. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Ehrlich H, Fauchet R, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tiss Antigens* 49 (1997) 297-321
18. Böyum A: A one- stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21 (1968) 77-89
19. 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
20. Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, Krausa P, Rowan A, Tonks S, Murray N, Bodmer J, Bodmer W: Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tiss Antigens* 47 (1996) 364-371
21. Burt RD, Vaughan TL, McKnight B, Davis S, Beckmann AM, Smith AG, Nisperos B, Swanson GM, Berwick M: Associations between human leukocyte antigen type and nasopharyngeal carcinoma in Caucasians in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5 (1996) 879-887

22. Buus S, Sette A, Colon SM, Miles C, Grey HM: The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 235 (1987) 1353-1358
23. Cabrera T, Collado A, Fernandez MA, Ferron A, Sancho J, Ruiz-Cabello F, Garrido F: High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tiss Antigens* 52 (1998) 114-123
24. Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F: Biological implications of HLA-DR expression in tumours. *Scand J Immunol* 41 (1995) 398-406
25. Chan SH, Chew CT, Prasad U, Wee GB, Srinivasan N, Kunaratnam N: HLA and nasopharyngeal carcinoma in Malays. *Br J Cancer* 51 (1985) 389-392
26. Chataway J, Feakes R, Corradu F, Gray J, Deans J, Fraser M, Robertson N, Broadley S, Jones H, Clayton D, Goodfellow P, Sawcer S, Compston A: The genetics of multiple sclerosis: principles, background and updated results of the United Kingdom systematic genome screen. *Brain* 121 (1998) 1869-1887
27. Chatzipetrou MA, Tarassi KE, Konstadoulakis MM, Pappas HE, Zafirellis KD, Athanassiades TE, Papadopoulos SA, Panousopoulos DG, Golematis BC, Papasteriades CA: Human leukocyte antigens as genetic markers in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 42 (1999) 66-70
28. Corradu F, Sawcer S, Feakes R, Chataway J, Broadley S, Jones HB, Clayton D, Gray J, Smith S, Taylor C, Goodfellow PN, Compston A: HLA typing in the United Kingdom multiple sclerosis genome screen. *Neurogenetics* 2 (1998) 24-33
29. Cordon-Cardo C, Fuks Z, Drobnjak M, Moreno C, Eisenbach L, Feldman M: Expression of HLA-A,B,C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Cancer Res* 51 (1991) 6372-6380
30. Cortes J, Fayad L, Kantarjian H, O'Brien S, Lee MS, Talpaz M: Association of HLA phenotype and response to interferon-alpha in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 12 (1998) 455-462
31. Cresswell P: Regulation of HLA class I and class II antigen expression. *Br Med Bull* 43 (1987) 66-80

32. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ: The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* 38 (1984a) 287-292
33. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ: The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 38 (1984b) 293-298
34. Dausset J: Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 4 (1954) 190-198
35. Dausset J: Iso-leuco-anticorps. *Acta Haemat* 20 (1958) 156-158
36. De Moerloose P, Jeannet M, Martin-Achard A, De Tribolet N, Seiler R, Guanella N: HLA and glioma. *Tiss Antigens* 12 (1978) 146-148
37. Demoor P, Boogaerts M, Louwagie A: More familial leukemia in patients with both and unexplained high transcortin levels and HLA antigen Cw3. *Brit J Haematol* 69 (1988) 225-227
38. Dorak MT, Lawson T, Machulla HK, Darke C, Mills KI, Burnett AK: Unravelling an HLA-DR association in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Blood* 94 (1999) 1-8
39. Dyer P, Warrens A: Design and interpretation of studies of the major histocompatibility complex in disease. In: Lechler R (Hrsg): *HLA and disease*. Academic Press Limited, London Boston San Diego New York Sydney Tokyo, 1994, S. 93-122
40. Epplen C, Jackel S, Santos EJ, D'Souza M, Poehlau D, Dotzauer B, Sindern E, Haupts M, Rude KP, Weber F, Stover J, Poser S, Gehler W, Malin JP, Przuntek H, Epplen JT: Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol* 41 (1997) 341-352
41. Ferrone S, Marincola FM: Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16 (1995) 487-494
42. Forsum U, Claesson K, Jonsson R, Karlsson-Parra A, Klareskog L, Scheynius A, Tjernlund U: Differential tissue distribution of HLA-DR, -DP and -DQ antigens. *Adv Exp Med Biol* 216 (1987) 233-239
43. Forsyth PA, Cairncross JG: Treatment of malignant glioma in adults. *Curr Opin Neurol* 8 (1995) 414-418

44. Gerencer M, Tajic M, Kerhin-Brkljacic V, et al.: An association between serum testosterone level and HLA phenotype. *Immunol Letters* 4 (1982) 155-158
45. Giacomini P, Giorda E, Fraioli R, Nicotra M R, Vitale N, Setini A, Delfino L, Morabito A, Benevolo M, Venturo I, Mottolese M, Ferrara G B, Natali P G: Low prevalence of selective human leukocyte antigen (HLA)-A and HLA-B epitope losses in early-passage tumor cell lines. *Cancer Res* 59 (1999) 2657-2667
46. Gorer PA: The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br J Exp Pathol* 17 (1936) 42-50
47. Grey HM, Buus S, Colon S, Miles C, Sette A: Structural requirements and biological significance of interactions between peptides and the major histocompatibility complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 323 (1989) 545-552
48. Guillet JG, Lai MZ, Briner TJ, Smith JA, Geffter ML: Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature* 324 (1986) 260-262
49. Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, Marti D, Kissner T, Sherman ME, Glass AG, Manos MM, Lorincz AT, Kurman RJ, Buckland J, Rush BB, Carrington M: Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7 (1998) 1035-1041
50. Hopewell JW, Edwards DN, Wiernik G: Sex dependence of human intracranial gliomata. *Br J Cancer* 34 (1976) 666-670
51. Hosli P, Sappino AP, de Tribolet N, Dietrich PY: Malignant glioma: should chemotherapy be overthrown by experimental treatments? *Ann Oncol* 9 (1998) 589-600
52. Imreh MP, Zhang QJ, De Campos-Lima PO, et al.: Mechanisms of allele-selective down-regulation of HLA class I in Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 62 (1995) 90-96
53. James WH: Sex ratio and hormones in HLA related rheumatic diseases. *Rheum Dis* 50 (1991) 401-404

54. Janeway AJ, Travers P: Antigenerkennung durch T-Lymphozyten: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, 1995a, S. 170-190
55. Janeway AJ, Travers P: Kontrolle und Manipulation der Immunantwort: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, 1995b, S. 570-577
56. Janeway CAJ, Bottomly K, Horowitz J, Kaye J, Jones B, Tite J: Modes of cell:cell communication in the immune system. *J Immunol* 135 (1985) 739s-742s
57. Kaklamanis L, Leek R, Koukourakis M, Gatter KC, Harris AL: Loss of transporter in antigen processing I transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res* 55 (1995) 5191-5194
58. Kaloterakis A, Papasteriades C, Filiotou A, Economidou J, Hadjiyannis S, Stratigos J: HLA in familial and nonfamilial Mediterranean Kaposi's sarcoma in Greece. *Tiss Antigens* 45 (1995) 117-119
59. Kantor AF, McLaughlin JK, Blattner WA, Bach FH, Blot WJ, Schuman LM, Fraumeni JFJ: HLA antigens in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 43 (1983) 2330-2333
60. Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, et al.: Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer* 72 (1995) 405-411
61. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW: The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 3 (1993) 255-268
62. Korkoloupou P, Kaklamanis L, Pezella F, Harris AL, Gatter KC: Loss of antigen- presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 73 (1996) 148-153
63. Krul EJ, Schipper RF, Schreuder GM, Fleuren GJ, Kenter GG, Melief CJ: HLA and susceptibility to cervical neoplasia. *Hum Immunol* 60 (1999) 337-342
64. Lechler R: HLA and disease. Academic Press Limited, London Boston San Diego New York Sydney Tokyo, 1994

65. Leeuwen van A, Schuit HR, Rood van JJ: Typing for MLC (LD). II. The selection of nonstimulator cells by MLC inhibition tests using SD-identical stimulator cells (MISIS) and fluorescence antibody studies. *Transplant Proc* 5 (1973) 1539-1542
66. Maiorana A, Cesinaro AM, Fano RA, Collina D: Expression of MHC class I and class II antigens in primary breast carcinomas and synchronous nodal metastases. *Clin Exp Metastasis* 13 (1995) 43-48
67. Mallon E, Bunce M, Wojarowska F, Welsk K: HLA-Cw*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriasis. *J Invest Dermatol* 109 (1997) 183-186
68. Mattiuz PL, Ihde D, Piazza A, Cepellini R, Bodmer WF: New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In: Terasaki PI (Hrsg): *Histocompatibility Testing 1970*. Munksgaard, Copenhagen, Denmark, 1970, S. 193
69. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16 (1988) 1215-1218
70. Moller P, Hammerling GJ: The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumour immunity. *Cancer Surv* 13 (1992) 101-127
71. Moser C, Vogel I: Die gemischte Lymphozytenkultur (MLC) als Parameter für die Verträglichkeit von allogenen Organtransplantaten. Teil I: Genetische Grundlagen und Möglichkeiten der HLA-D-Typisierung. *Wiener Klinische Wochenschrift* 19 (1977) 637-640
72. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 255 (1997) 335-350
73. Murken J, Cleve H: *Humangenetik*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1994, S. 116
74. Murray MG, Thompson WF: Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8 (1980) 4321-4325
75. Navarrete C, Alonso A, Awad J, McCloskey D, Ganesan TS, Amess J, Lister TA, Festenstein H: HLA class I and class II antigen associations in acute leukaemias. *J* 13 (1986) 77-84
76. Nitta T, Ebato M, Sato K: Association of malignant glioma with the human leukocyte antigen, HLA-A24(9). *Neurosurg Rev* 17 (1994) 211-215

77. Olerup O, Zitterquist H: HLA- DR typing by PCR amplification with sequence- specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tiss Antigens* 39 (1992) 225-235
78. Payne R, Rolfs MR: Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest* 37 (1958) 1756-1763
79. Petrov R: Ya ili nie ya: Immunologiceskije mobilii. *Molodaya Gvardiya Moskva* (1983)
80. Planelles D, Puig N, Beneto A, Gomez E, Rubio P, Mirabet V, Bonanad S, Blasco I, Montoro J A: HLA-DQA, -DQB and -DRB allele contribution to narcolepsy susceptibility. *Eur J Immunogenet* 24 (1997) 409-421
81. Powis SH, Trowsdale J: Human histocompatibility complex genes. *Behring Inst Mitt* 94 (1994) 17-25
82. Rainov NG, Dobberstein KU, Bahn H, Holzhausen HJ, Lautenschläger C, Heidecke V, Burkert W: Prognostic factors in malignant glioma: Influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival. *J Neuro-Oncol* 35 (1997) 13-28
83. Richter KV, Fischer G, Menzel GR, Langfeld M, Aigte H, Ruckwarth G, Freier G: HL-A antigens and susceptibility to malignant hematological diseases. *Haematologia (Budap)* 7 (1973) 203-209
84. Romano PJ, Bartholomew M, Smith PJ, Kloszewski F, Stryker J, Houck J, Vesell ES: HLA antigens influence resistance to lung carcinoma. *Hum Immunol* 31 (1991) 236-240
85. Rosner B: *Fundamentals of biostatistics*. PWS Publishers, Boston, 1986
86. Sager R: Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 246 (1989) 1406-1412
87. Sager R: Genetic strategies of tumor suppression. *Am Rev Respir Dis* 142 (1990) 40-43
88. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel SJ, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer- directed enzymatic amplification of DNA with thermostabile DNA polymerase. *Science* 239 (1988) 487-491

89. Sanjeevi CB, Hjelmstrom P, Hallmans G, Wiklund F, Lenner P, Angstrom T, Dillner J, Lernmark A: Different HLA-DR-DQ haplotypes are associated with cervical intraepithelial neoplasia among human papillomavirus type-16 seropositive and seronegative Swedish women. *Int J Cancer* 68 (1996) 409-414
90. Schiebler TH, Schmidt W: *Anatomie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, 1987, S. 89-91
91. Schirmacher V: Tumoren: Entstehung, Metastasierung und immunologische Abwehrmechanismen. In: Gemsa D, Kalden JR, Resch K (Hrsg): *Immunologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1997, S. 201-219
92. Schließl B: *HLA- Bestimmung- Probleme und Lösungen*. Biotest Diagnostics, Labor für Immungenetik, München, 1986
93. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM: High association of an HL-A antigen, W 27, with ankylosing spondylitis. *New Engl J Med* 288 (1973) 704-706
94. Sette A, Buus S, Appella E, Adorini L, Grey HM: Structural requirements for the interaction between class II MHC molecules and peptide antigens. *Immunol Res* 9 (1990) 2-7
95. Shapiro WR: Current therapy for brain tumors: back to the future. *Arch Neurol* 56 (1999) 429-432
96. SISA (Simple Interactive Statistical Analysis): fisher.exe (unter MS-DOS). <http://home.clara.net/sisa/>
97. Snell G: Histocompatibility genes of the mouse. II Production and analysis of isogenic resistance lines. *J Natl Cancer Inst* 21 (1958) 843-877
98. Snell GD: The H-2 locus of the mouse: Observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. *Folia Biologica* 14 (1968) 335-358
99. Spandidos DA: Mechanism of carcinogenesis: the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. *Anticancer Res* 5 (1985) 485-498
100. Sridama V, Hara Y, Fauchet R, DeGroot LJ: Association of differentiated thyroid carcinoma with HLA-DR7. *Cancer* 56 (1985) 1086-1088

101. Svejgaard A, Ryder LP: HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tiss Antigens* 43 (1994) 18-27
102. Takai N, Yoshida S, Hara N, Saito T, Kamoya K, Tanaka R: Investigation of HLA in patients with glioma. *No To Shinkei* 38 (1986) 741-745
103. Tang WM, Pulido JS, Eckels DD, Han DP, Mieler WF, Pierce K: The association of HLA-DR15 and intermediate uveitis. *Am J Ophthalmol* 123 (1997) 70-75
104. Terasaki PI, McClelland JD: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204 (1964) 998-1000
105. Thorsby E: Structure and function of HLA molecules. *Transplant Proc* 19 (1987) 29-35
106. Tiwari JL, Terasaki PI: HLA and disease associations. Springer, New York, 1985, S. 20
107. Uytenhove C, Maryanski J, Boon T: Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J Exp Med* 157 (1983) 1040-1052
108. VanRood JJ, Eernisse J G, VanLeeuwen A: Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 181 (1958) 1735-1736
109. 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. *Tiss Antigens* 28 (1986) 301-312
110. Vogel I, Moser C: Die gemischte Lymphozytenkultur (MLC) als Parameter für die Verträglichkeit von allogenen Organtransplantaten. Teil II: Technik, Aussagekraft und Anwendung. *Wiener Klinische Wochenschrift* 19 (1977) 640-643
111. Wagner U, Kalthäuser S, Sauer H, et al.: HLA markers and prediction of clinical course on outcome in rheumatoid arthritis. *Arthrit Rheumatism* 40 (1997) 341-351
112. Waßmuth R: Einführung in das HLA- System. ecomed verlagsgesellschaft, Landsberg, 1995, S. 1-16
113. Westphal M, Hermann HD: Krankheiten des Gehirns: Tumoren. In: Kunze K (Hrsg): *Lehrbuch der Neurologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1992, S. 483-487

114. Wink M: Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion. In: Wink M, Wehrle H (Hrsg): PCR im medizinischen und biologischen Labor - Handbuch für den Praktiker. GIT Verlag, Darmstadt, 1994, S. 5-12
115. Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Schoning B, Glockner F: Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion. J Neuroimmunol 84 (1998) 164-171
116. Yu SZ, Xu XH, Zhang JQ: A study on HLA-DR expression of brain tumor cells and mononuclear cell subsets infiltrating in these tumors. Chung hua Ping Li Hsueh Tsa Chih 23 (1994) 221-223
117. Zülch KJ: Brain Tumors. Springer, Berlin, 1986

9. Anlagen

9.1. Chemikalien

Ethidiumbromid/ Acridinorange-Färbelösung:

Stammlösung: 50 mg Ethidiumbromid (No. 11615, Fa. Merck, Darmstadt), 15 mg Acridinorange (No. 15931, Fa. Merck, Darmstadt), 49 ml 10% EDTA-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in isotonischem Puffer (PBS, Fa. Bica, Frankfurt/O.)

Gebrauchslösung: 1 ml Stammlösung+ 9 ml PBS (kühl und dunkel gelagert)

Red Cell Lysis Buffer:

Stammlösung: 12,1 g TRIS (Sigma Chemical Co., St. Louis), 10,2 g MgCl₂ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 5,8 g NaCl (Fa. Merck, Darmstadt), 5 ml konzentrierte Salzsäure auf 1 l Aqua dest. bei pH= 7,6

Gebrauchslösung: (1 x RCLB): Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

Elektrophoreselösung:

Stammlösung: 108 g (0,9 M) TRIS (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz), 55 g (0,9 M) Borsäure (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), 40 ml (0,5 M) EDTA mit pH= 8,0 (20 mM EDTA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe);
Tris-Basis und Borsäure in 700 ml Aqua dest. auflösen, EDTA zugeben und mit Aqua dest. auf 1 l auf-füllen

Gebrauchslösung: (1 x TBE): 50 ml Stammlösung+ 975 ml Aqua dest.

Blue-Ethidium-Marker:

Ethidiumbromid-Lösung: 1 g Ethidiumbromid (No. 11615, Fa. Merck, Darmstadt) in 100 ml PBS (Fa. Bica, Frankfurt/O.)

Blue Marker: 2 mg Bromphenolblau (Fa. Merck, Darmstadt) in 10 ml Ficoll (Dichte= 1,076 g/cm³) (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Blue Marker und Ethidiumbromid-Lösung im Verhältnis von 10:1

PCR-Lösung:

500 µl 10 x PCR-Puffer (Applied Biosystem, Weiterstadt): 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 100 mM Tris-HCl (pH= 8,3), 0,01% w/v Gelatine

250 µl Glycerol (99%, Endkonzentration 5%, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis)


350 µl autoklaviertes Aqua dest. (Pharmacia & Upjohn GmbH, Heidelberg)

je 100 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM, Endkonzentration 200 µM, Applied Biosystems, Weiterstadt)

9.2. Auswertungsbögen/ Worksheets

Worksheet – Lymphotype HLA-ABC 144/1 Italia

2x72 WELL TRAY WITH PRE-DROPPED ANTI-HLA-ABC REAGENTS
For use in the microlymphocytotoxicity test (see directions) – Subject to change



1121098

Last Name _____ First Name _____ Born _____ Specimen No. _____ Compliment Lot No. _____

Result _____ Test Date _____ By _____

ROW	■ 1 →						■ 2 →						■ 3 →						■ 4 →							
COLUMN	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
REACTION																										
HLA-ABC SPECIFICITY	Neg. Contr.						Pos. Contr.						A1						A1+36							
ID-NUMBER	111098						110988						6102						5080							

ROW	■ 7 →						■ 8 →						■ 9 →						■ 10 →							
COLUMN	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
REACTION																										
HLA-ABC SPECIFICITY	A33						A33						A74+30+31						A74+30+31+602							
ID-NUMBER	6245						6182						1960						2981							

Specificities and splits:

A9 (23, 24, 2403)	A28 (68, 69)	B15 (62, 63, 75, 76, 77)	B22 (54, 55, 56)
A10 (25, 26, 34, 66)	B5 (51, 52)	B16 (38, 39)	B40 (60, 61)
A19 (29, 30, 31, 32, 33, 74)	B12 (44, 45)	B17 (57, 58)	B70 (71, 72)
	B14 (64, 65)	B21 (49, 50)	B78 (7801, 7802) = B5 creg
			B81 = BDT (B7 creg)

Codes:

A1 = anti-HLA-A1
 ID = identification
 wk = weak reaction
 e = extra reaction
 o = monoclonal reagent


Caution:
 HLA cross reactions
 creg = crossreactive group

Art. No.: 823045
Lot No.: 1420199
Exp. Date: December 1999

Biotest AG · 63303 Dreieich/Germany

Worksheet – Lymphotype HLA-ABC 144/2 Italia

2x72 WELL TRAY WITH PRE-DROPPED ANTI-HLA-ABC REAGENTS
For use in the microlymphocytotoxicity test (see directions) – Subject to change



1121098

Last Name _____ First Name _____ Born _____ Specimen No. _____ Compliment Lot No. _____

Result _____ Test Date _____ By _____

ROW	■ 1 →						■ 2 →						■ 3 →						■ 4 →							
COLUMN	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
REACTION																										
HLA-ABC SPECIFICITY	Neg. Contr.						Pos. Contr.						B59+57						B57+58							
ID-NUMBER	1121098						110396						4089						6189							

ROW	■ 7 →						■ 8 →						■ 9 →						■ 10 →							
COLUMN	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
REACTION																										
HLA-ABC SPECIFICITY	B60						B41						B41						wk B42							
ID-NUMBER	6106						6055						5055						6201							

Specificities and splits:

A9 (23, 24, 2403)	A28 (68, 69)	B15 (62, 63, 75, 76, 77)	B22 (54, 55, 56)
A10 (25, 26, 34, 66)	B5 (51, 52)	B16 (38, 39)	B40 (60, 61)
A19 (29, 30, 31, 32, 33, 74)	B12 (44, 45)	B17 (57, 58)	B70 (71, 72)
	B14 (64, 65)	B21 (49, 50)	B78 (7801, 7802) = B5 creg
			B81 = BDT (B7 creg)

Codes:

A1 = anti-HLA-A1
 ID = identification
 wk = weak reaction
 e = extra reaction
 o = monoclonal reagent

Caution:
 HLA cross reactions
 creg = crossreactive group

Art. No.: 823045
Lot No.: 1420199
Exp. Date: December 1999



HISTO TRAY ABC 144/1

Mikrotestkammern (72) mit vorgetropften HLA-ABC Antisera und Kontrollen (human oder monoklonal) zur Typisierung eines Probanden
Microtest trays (72) with predropped HLA-ABC anti sera and controls (human or monoclonal) for typing one specimen

Ergebnisprotokoll/Worksheet

Testdatum/Test Date:

Untersucher/Tech:

Name:

Vorname/First Name:

Geb. Datum/born:

Proben Nr./Specimen No.:

Best.-Nr. : 7035

Cat. No.

Ch.-B. : 91T257

Lot No.

Verw. bis : 31.05.2000

Exp. Date

Lagerung : mindestens - 20°C

Storage

Kaninchenkompl. Ch.-B.: B3H885

Rabbit Complement Lot No.

Verw. bis : 31.08.2000

Exp. Date

A _____ A _____ B _____ B _____
 Cw _____ Cw _____ Bw _____ Bw _____

Pos. Well	Serum Ch.-B. Lot No.	Anti-HLA	Reaktion Reaction	Pos. Well	Serum Ch.-B. Lot No.	Anti-HLA	Reaktion Reaction
1A	93 H 655 *	pos. Kontrolle		7A	93 H 909 *	A32+25	
1B	93 H 823 *	neg. Kontrolle		7B	93 H 903 *	A32 (27)	
1C	93 H 464 *	A1		7C	93 H 510 *	A32	
1D	93 H 904 *	A1+36+80		7D	93 H 833 *	A33 (34)	
1E	93 H 188	A1		7E	13 H 813 *	A33	
1F	93 H 842 **	A2+69		7F	93 H 834 *	A33+837	
2F	93 H 905 *	A2		8F	93 H 388	A33 (31)	
2E	93 H 454	A2		8E	93 H 358	A34	
2D	93 H 576	A3		8D	92 H 945 *	A34	
2C	93 H 836 *	A3		8C	93 H 588	A36+3+11	
2B	93 H 577	A3		8B	93 H 296	A6601	
2A	93 H 858 *	A 23		8A	93 H 065 *	B 51	
3A	93 H 906 *	A 23		9A	93 H 496	B 51	
3B	93 H 772	A9[23+24]		9B	93 H 847 *	B5[51+52]+53+49	
3C	93 H 593	A 24		9C	93 H 423	B7+81-73	
3D	93 H 907 *	A 24		9D	93 H 599	B7+81	
3E	93 H 893	A 25		9E	93 H 379	B7+81 (42, 67, 58)	
3F	93 H 418	A 25		9F	93 H 412	B8+59	
4F	93 H 861 *	A10[25+26+34+66]		10F	92 H 738	B8 (59)	
4E	93 H 876 *	A 26+34+6601		10E	93 H 615	B8	
4D	93 H 877 *	A 26+6601		10D	93 H 530	B 44	
4C	93 H 781	A11		10C	93 H 329 *	B12[44+45]	
4B	93 H 589	A11		10B	93 H 243	B12[44+45]	
4A	93 H 908 *	A11		10A	93 H 202 *	B 45+50-41+40 (62)	
5A	93 H 607	A28[68+69]		11A	93 H 616	B 45-76	
5B	93 H 605	A28[68+69]		11B	93 H 468	B13	
5C	92 H 741	A28[68+69]+10-33		11C	93 H 881 *	B13	
5D	93 H 864 *	A28[68+69]		11D	93 H 517	B 65	
5E	93 H 865 *	A29		11E	93 H 302	B 65	
5F	93 H 869 *	A29		11F	93 H 734 *	B14[64+65]	
6F	93 H 868 *	A29		12F	93 H 699 *	B14[64+65] (8)	
6E	93 H 564	A30		12E	93 H 414 **	B62	
6D	93 H 657	A30		12D	93 H 644 *	B62+63 (67)	
6C	93 H 916 *	A30+31		12C	93 H 910 *	B62+63+57	
6B	93 H 509 *	A30+31		12B	93 H 328 *	B62+63	
6A	93 H 673 *	A 31		12A	93 H 853 *	B 63	



Amtsgerichtsstrasse 1-5 · D-35423 Lich · PF 1152 · D-35419 Lich
 Telefon 06404/925-0 · Telefax 06404/62554 · www.bag-germany.com

HISTO TRAY ABC 144/2

Ch.-B. / Lot. No.: 91T257

Pos. Well	Serum Ch.-B. Lot No.	Anti-HLA	Reaktion Reaction	Pos. Well	Serum Ch.-B. Lot No.	Anti-HLA	Reaktion Reaction
7A	93 H 728 *	B 38		7A	93 H 744 *	B41	
7B	93 H 647	B 38		7B	93 H 855	B42	
7C	93 H 000 *	B16[38+39]+56 (35, 7)		7C	93 H 660	B45	
7D	93 H 585 *	B16[38-39]		7D	93 H 389 *	B47+27	
7E	93 H 681 *	B 39		7E	93 H 569	B47+46 (49,45)	
7F	93 H 651	B 57 wa		7F	93 H 469	B47+40+13 (41)	
8F	93 H 912 *	B 57+58 wa		8F	93 H 694	B47+40	
8E	93 H 697	B 57+58 wa+63		8E	93 H 854 *	B48 (cwb)	
8D	93 H 357	B17[57+58]		8D	93 H 819 *	B67 (39)	
8C	93 H 364	B18		8C	93 H 586	B70+51+52+35-53+18+62	
8B	93 H 440 *	B18 (37, 52)		8B	93 H 746 *	B70[71+72]+62 (50)	
8A	93 H 911 *	B18		8A	93 H 578 *	B70[71+72]+62+46	
9A	93 H 415	B 49		9A	93 H 844 *	B70[71+72]+62+35+53+51+8	
9B	93 H 642	B 49 (52)		9B	93 H 901 *	B70[71+72]+62+35+56+53(62)	
9C	92 H 736	B21[49+50]		9C	93 H 658	B73+27	
9D	93 H 735	B21[49+50]		9D	93 H 845 *	B73	
9E	93 H 324 *	B21[49+50]		9E	92 H 753	B73	
9F	93 H 443 *	B 54+55		9F	93 H 770 *	Cw1+B46	
10F	93 H 771	B 55		10F	93 H 883 *	Cw1+B46	
10E	93 H 693	B22[54+55+56]+42 (7)		10E	93 H 798 *	Cw2	
10D	93 H 529	B 56		10D	93 H 913 *	Cw2	
10C	93 H 624 *	B 56		10C	93 H 527	Cw3+B46	
10B	93 H 769	B27		10B	93 H 631	Cw3	
10A	93 H 843	B27		10A	92 H 790 *	Cw4	
11A	93 H 841	B35+50+56+62+70		11A	93 H 040 *	Cw5 wa	
11B	92 H 335 *	B35+53+5+18		11B	93 H 295 *	Cw5	
11C	93 H 704 *	B35 (33)		11C	93 H 814	Cw6+4	
11D	92 H 868 *	B35+53		11D	93 H 895 *	Cw6	
11E	93 H 701	B37		11E	93 H 451 *	Cw7	
11F	93 H 700	B37		11F	93 H 914 *	Cw7	
12F	93 H 568 **	B37+47+52 (18, 36, 41)		12F	93 H 915 *	Cw17+B41	
12E	93 H 779	B 60+81+48		12E	93 H 698 *	Cw8	
12D	93 H 778 *	B 60		12D	93 H 346 **	Bw4 (A 32)	
12C	93 H 898 *	B40[60+61] (13, 41)		12C	93 H 760	Bw4 (A 32, A9)	
12B	93 H 456 *	B40[60+61]+7+73		12B	93 H 347 **	Bw6	
12A	93 H 186	B41		12A	93 H 763	Bw6	

Bemerkungen/Remarks:
 s.t.wk = manchmal schwach/sometimes weak + e = extra Reaktion/extra reaction ↓ = carry over possible
 [] = Split-Reaktion/Split-reactions () = kann Reaktion zeigen/may show reactions
 + = monodona * = Neues Antiserum oder neue Position/new antiserum or new position

Bw4 und Bw6 Assoziationen Bw4 and Bw6 associations

Bw4:	B5 B5102 · B5103 · B13 · B17 · B27 · B37 · B38 (16) · B44 (12) · B47 · B49 (21) · B51 (5) · B52 (5) · B53 · B57 (17) · B58 (17) · B59 · B63 (15) · B77 (15)
möglich possible	A9 · A23 (9) · A24 (9) · A2403 · A25 (10) · A32 (19)
Bw6:	B7 B703 · B8 · B14 · B18 · B22 · B2708 · B35 · B39 (16) · B3901 · B40 · B4005 · B41 · B42 · B45 (12) · B46 · B48 · B50 (21) · B54 (22) · B55 (22) · B56 (22) · B60 (40) · B61 (40) · B62 (15) · B64 (14) · B65 (14) · B67 · B70 · B71 (70) · B72 (70) · B73 · B75 (15) · B76 (15) · B78 · B81

55/9200/0699

AUSWERTEFORMULAR / Worksheet
HISTO-TYPE / DNA-DQ



Vorname / first name..... Name / name.....
 Geb. Datum / date of birth..... Fam / fam.....
 Typisierungsnr. / typ. no..... Eingangsnr. / ID.no.....

Typisierung: DRB1*..... DRB1*.....
 typing DRB3*..... DRB4*..... DRB5*.....
 DQA1*..... DQA1*.....
 DQB1*..... DQB1*.....

Datum..... Unterschrift.....
 date signature

Patientenprobe: EDTA-Blut Heparin-Blut Citrat-Blut
 patient sample EDTA-blood heparine blood citrate blood

Milz Zellen Sonst.....
 spleen cells others

Extraktionsmethode:.....
 extraction method

OD_{260/280} : / Konz. / conc..... ng / µl

PHOTO

mit Labnummer, Datum
incl. lab.no, date

[DQ_PROTO.DOC] V. 1.0 / 21.04.98 [KE]

DQA+B	Lot-No.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10a	10b	11	12	13	14	15	16	
-	DQA1*0101-0126	■																	
-	DQA1*0201		■																
-	DQA1*0301,0302,0303			■															
-	DQA1*0401				■														
-	DQA1*0501-013,0302-04					■													
-	DQA1*0601						■												
5(1)	DQB1*0501							■											
5(1)	DQB1*0502-0504								■										
6(1)	DQB1*0601,06012									■									
6(1)	DQB1*0602,10,11,13										■								
6(1)	DQB1*0603-0609,12,14											■							
2	DQB1*0201-0202												■						
2	DQB1*0203													■					
7(3)	DQB1*0301														■				
8(3)	DQB1*0302,0307															■			
9(3)	DQB1*03032																■		
7(3)	DQB1*0304																	■	
-	DQB1*0305																		■
-	DQB1*0306																		■
4	DQB1*0401-0402																		■
	Länge / length in bp	204	111	128	190	176	128	220	149	156	165	91	176	156	100	71	128	119	

Mix 10: DQB1*0601 (10a=165 bp) oder/ or DQB1*0602,*0610,*0611,*0613 (10b=91 bp) !

DQB(8)	Lot-No.....	1	2	3	4	5	6	7	8
5(1)	DQB1*0501-0504	■							
6(1)	DQB1*0601-0614		■						
2	DQB1*0201-0202			■					
2	DQB1*0203				■				
7(3)	DQB1*0301					■			
8(3)	DQB1*0302,*0307						■		
9(3)	DQB1*03032							■	
7(3)	DQB1*0304								■
-	DQB1*0305								
-	DQB1*0306								
4	DQB1*0401-0402								
	Länge / length in bp	220	116	175	156	100	71	127	87

Dynal *Classic* SSP WorkSheet

Tube No.	Result	Size	Amplified DRB1* alleles
1		195	0101 - 01022, 0104, 0105
2		200	0103
3		210	15011 - 1508
4		205 215 220	16011 - 1608
5		225	03011 - 0310, 0311 ^{weak} , 0312, 1107
6		85	03011, 03012, 0304 - 0306, 0308 - 0312, 1327
7		95	03021 - 0303, 1315, 1319, 1326, 1402, 1403, 1406, 1412, 1413, 1418 - 1420, 1424, 1427, 1429
8		265	04011 - 0432, 1122, 1410
9		230 215	0701 - 0704
10		215 220 165	1415, 0801 - 0821
11		195	09012
12		205	1001
13		170 180	0308, 0415, 11011 - 1134
14		105	1201 - 1205
15		205	1102, 1114, 1116, 1118 - 1121, 1131, 1301 - 1304, 1306, 1308 - 1310, 1312, 1313, 1315, 1316, 1319, 1322, 1323, 1327, 1328, 1330 - 1334, 1416, 1424
16		205 215 195	11011 - 11042, 1106, 1109 - 1112, 1114 - 1116, 1120, 1121, 1123 - 1125, 1127 - 1129, 1132, 1133, 12021, 12022, 1301, 1302, 1304, 1305, 13071 - 1308, 1311, 1314 - 1324, 1326 - 1329, 1331, 1332, 1334, 1415, 1416, 1422, 1425, 1427, 0801 - 08022, 08041 - 0809, 0811, 0816, 0817, 0821
17		180	03011 - 0307, 0309, 0311, 0312, 1301 - 1316, 1318 - 1334, 1402, 1403, 1405, 1406, 1409, 1412 - 1414, 1417 - 1421, 1423, 1424, 1427, 1429, 1430
18		210 200	1113, 1117, 1401, 1404, 1405, 1407, 1408, 1411, 1414, 1418, 1423, 1426, 1428, 1431
19		150 145	1310, 1402, 1406, 1409, 1413, 1417, 1419 - 1421, 1429, 1430
20		225 155	1123, 1125, 1313, 1318, 1403, 1412, 1415, 1427, 0809, 0821
21		175	0310, 1401, 1407, 1410, 1416, 1422, 1425, 1426
			Amplified DRB3/4/5* Alleles
31		220	DRB3*01011 - 0105, 0201 - 0208, 0301 - 0303
32		200	DRB4*01011 - 0105
33		265	DRB5*01011 - 0109, 0202 - 0204

DR "low resolution" Prod. No: 550.01

Batch No.: B662

Expiry Date: 2000 - 11

Institution: _____

Sample ID: _____

Patient Name: _____

Patient ID: _____

Date of Birth: _____

Interpretation

Manual

DRB1* _____ DRB1* _____

DRB 3/4/5 _____

Software

DRB1* _____ DRB1* _____

DRB 3/4/5 _____

Comments:

Tested By: _____ Date: _____

Approved By: _____ Date: _____



10. Thesen

1. Gliale Hirntumoren sind sehr schwer zu behandelnde, invasive Neoplasien, die letztlich zum Tod des betroffenen Patienten führen. Trotz fortwährender Verbesserung therapeutischer Konzepte konnte in den letzten Jahrzehnten nur ein relativ geringer klinischer Fortschritt erreicht werden.
2. Durch ihre Funktion der Antigenpräsentation nehmen die HLA-Moleküle eine zentrale Rolle im Rahmen der individuellen Immunantwort und somit auch der Tumorentstehung ein. Seit erstmalig eine Korrelation zwischen HLA und spezifischen Krankheiten demonstriert werden konnte, wurden zunehmend Untersuchungen zum Einfluß einzelner HLA-Merkmale oder HLA-Haplotypen auf das Risiko der Krankheitsentstehung durchgeführt.
3. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Gruppe von 65 Gliompatienten aus dem mitteldeutschen Raum serologisch (MLCT) und molekulargenetisch (PCR-SSP) HLA-typisiert und die Verteilung der HLA-Klasse I- und Klasse II-Merkmale mit der einer Gruppe von 157 klinisch gesunden Kontrollprobanden aus derselben Region verglichen.
4. In der Gruppe der Patienten war - verglichen mit der Kontrollgruppe - die Häufigkeit der folgenden HLA-Antigene erhöht: HLA-A*25, HLA-B*18, HLA-B*27, HLA-DRB1*15 und HLA-DRB5*(51). Demgegenüber war die Frequenz von HLA-DRB1*07 bei den Gliompatienten statistisch signifikant verringert.
5. Bei Kombination der einzelnen HLA-Antigene miteinander ergab sich in der Patientengruppe, verglichen mit den Kontrollprobanden, eine signifikant erhöhte Häufigkeit der Kombination HLA-A*03,A*25. Darüber hinaus waren die Frequenzen der Kombinationen HLA-Cw*02,Cw*07; HLA-DRB1*01,DRB1*15 und HLA-DRB1*11,DRB1*15 signifikant erhöht. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Verteilung der Homozygotiefrequenzen zwischen Gliompatienten und Kontrollprobanden gefunden werden.

6. Anhand von Kopplungsanalysen konnten verschiedene HLA-Merkmale zu Haplotypen zusammengefaßt werden. Einige *geschätzte* Haplotypen, in denen die oben erwähnten Einzelmerkmale zum Teil vertreten waren, wurden bei den Gliompatienten in erhöhter Frequenz gefunden, so z.B. HLA-A*25:B*18, HLA-A*25:Cw*12, HLA-A*25:Cw*12:B*18 und HLA-A*25:Cw*12:DRB1*15, des weiteren die *geschätzten* Haplotypen HLA-A*25:DRB1*15, HLA-B*07:DRB1*15, HLA-B*18:DRB1*15, HLA-Cw*07:DRB1*15, HLA-Bw*6:DRB1*15 und HLA-DRB1*15:DRB5*(51) sowie der erweiterte *geschätzte* Haplotyp HLA-DRB1*15:DRB5*(51):DQB1*06. Verringert waren u.a. die Frequenzen der *geschätzten* Haplotypen HLA-Cw*06:DRB1*07 und HLA-DRB1*07:DRB4*(53):DQB1*02.
7. Es wurden - verglichen mit dem jeweiligen Geschlecht der Kontrollgruppe - Unterschiede in der HLA-Antigenverteilung zwischen weiblichen und männlichen Individuen aufgezeigt. Die Gliompatientinnen hatten statistisch signifikant erhöhte Frequenzen der HLA-Merkmale DRB1*15, DRB5*(51) und B*27. Die Erhöhung dieser Merkmale war bei den männlichen Patienten nicht statistisch signifikant. Bei diesen traten im Gegensatz zu den Frauen die HLA-Merkmale A*25 und B*18 statistisch signifikant häufiger auf.
8. Die Kombination HLA-DRB1*11,DRB1*15 war in beiden geschlechtsspezifischen Gruppen erhöht. Es konnte außerdem eine signifikant höhere Anzahl von Patientinnen mit den *geschätzten* Haplotypen HLA-Cw*07:DRB1*15:DQB1*06 und HLA-B*07:DRB1*15 gefunden werden.
9. Bezüglich der Frequenzen der einzelnen HLA-Merkmale als auch der Häufigkeiten des Auftretens von HLA-Antigenkombinationen und *geschätzten* Haplotypen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Gliompatienten.

10. Es konnte gezeigt werden, daß - im Vergleich zu den asymptomatischen (klinisch gesunden) Individuen - einzelne HLA-Antigene und ihre Kombinationen und *geschätzten* Haplotypen signifikant häufiger oder seltener von Personen, die während ihres Erwachsenenlebens ein symptomatisches Gliom manifestieren, exprimiert werden.
11. Aus der Arbeit ergeben sich auch Hinweise darauf, daß nicht unbedingt nur Einzelmerkmale des HLA-Systems ausschlaggebend für den Einfluß auf die Tumorgenese sind, sondern eher das Auftreten bestimmter Kombinationen von HLA-Markern oder -Haplotypen hierfür verantwortlich ist. Auf Grund der Komplexität des HLA-Systems und der hieraus resultierenden kleinen Zahlen absoluter Häufigkeiten sowie auf Grund der relativ geringen, jedoch statistisch signifikanten Assoziation können sichere Aussagen endgültig nur mit Hilfe von größeren Patientenkollektiven bzw. durch Bestätigung in weiteren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen erbracht werden.

Tabellarischer Lebenslauf*Persönliche Daten:*

Name: Steinborn
Vorname: Frank
Geburtsdatum: 20. Februar 1974
Geburtsort: Havelberg
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1980-1990 Polytechnische Oberschule „Hermann Matern“ in Kietz
1990-1992 Abitur am IVA / Gymnasium am Reileck in Halle

1992-1993 Ableistung des Wehrdienstes

Studium:

seit 1993 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1997-1998 Auslandsaufenthalt

**Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere
Promotionsversuche:**

Hiermit erkläre ich, Frank Steinborn, daß ich die hier vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Niemand hat von mir geldwerte Leistungen für im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehende Arbeiten erhalten.

Weiterhin erkläre ich, daß ich diesen Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens der vorliegenden Arbeit erstmalig beim Dekan des wissenschaftlichen Rates der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg stelle und in der Vergangenheit auch an keiner anderen in- oder ausländischen Universität gestellt habe.

Halle, den 29.12.1999

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Frank Steinborn', written in a cursive style.

Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen der Promotionsarbeit

Einige wesentliche Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit wurden bereits veröffentlicht:

Machulla HK, Steinborn F, Schaaf A, Heidecke V, Rainov NG: Brain Glioma and Human Leukocyte Antigens (HLA) – is There an Association. J Neuro-Oncol 52 (2001) 253-261

Machulla HKG, Schaaf A, Steinborn F, Krüger K and Rainov NG: HLA-A,B,C,DRB1,DRB3/4/5,DQB1 of German glioma patients. Human Immunology 5.2 #93 S80

Posterbeitrag zum 25th Annual Meeting der „American Society for Histocompatibility and Immunogenetics“, New Orleans,Luisiana/USA, Oktober 1999

Machulla HKG, Steinborn F, Rainov NG: Brain glioma and human leukocyte antigens (HLA) - is there an association? Proceedings of the 52. Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery, p. 27
ISSN 1615-7923

Machulla HKG, Steinborn F, Rainov NG: HLA-Antigene und Entstehung von Gliomen. MedReport 23 (2001) 7

Danksagung

Herrn Dr. med. habil. N.G. Rainov (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie) danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, ebenso Herrn Dr. rer. nat. H.K.G. Machulla (Klinik für Medizinische Immunologie/ Abteilung GHATT), der maßgeblich an der Erstellung des Themas beteiligt war und mir die HLA-Untersuchungsergebnisse von Blutspendern als Kontrollgruppe zur Verfügung stellte. Ich möchte mich herzlich für die sehr umfangreiche fachliche Unterstützung und vor allem für die unkomplizierte und entgegenkommende Betreuung bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. J. Langner, daß die für diese Studie notwendigen Laborarbeiten im Interdisziplinären HLA-Labor GHATT (germany halle tissue typing/ laboratory of eurotransplant) des Institutes für Medizinische Immunologie durchgeführt werden konnten.

Vielmals bedanken möchte ich mich bei Frau A. Schaaf, Frau J. Krüger und Frau C. Kloß, die als Medizinisch-Technische Assistentinnen des Interdisziplinären HLA-Labors die HLA-Typisierungen mit Engagement durchführten.

Herrn OA Prof. Dr. med. habil. H.J. Holzhausen aus dem Institut für Pathologie danke ich sehr für seine Unterstützung bei der Recherche der histologischen Diagnosen, sowie Frau Dr. rer. nat. C. Lautenschläger vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik für ihre fachkundige Hilfe in einem beratenden Gespräch bezüglich der anzuwendenden statistischen Testverfahren.

Bei den Schwestern der Neurochirurgischen Ambulanz bedanke ich mich für die schnelle Beschaffung benötigter Akten.

Mein besonderer Dank für ihre Unterstützung gilt meinen Eltern.