

## Referat und bibliographische Beschreibung

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

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

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

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

## Inhaltsverzeichnis

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

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

## Abkürzungsverzeichnis

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

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

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