

1. Einleitung

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

1.1. Das HLA-System des Menschen

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

1.1.1. Molekülstruktur, Nomenklatur und Funktion der HLA-Merkmale

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

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

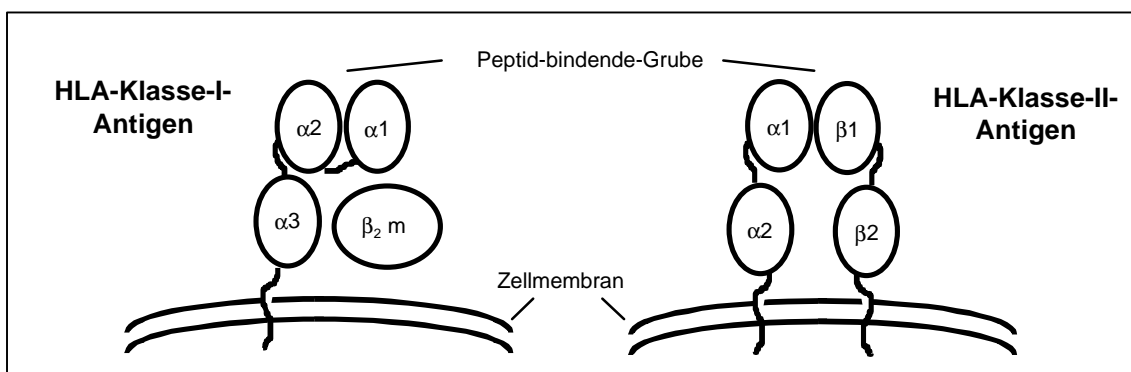


Abb. 1: Schematische Struktur der HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Moleküle; $\beta_2 m$ - β -2 Mikroglobulin

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

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

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

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

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

1.1.2. Struktur und Nomenklatur des menschlichen MHC

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

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

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

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

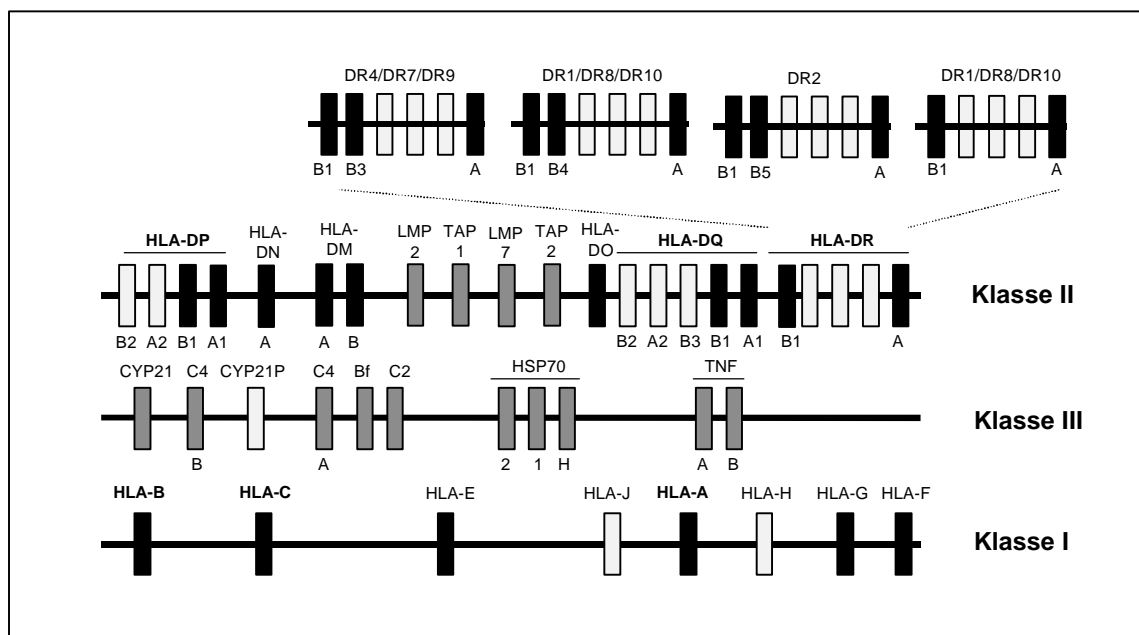


Abb. 2: Genkarte des humanen MHC. Abgebildet sind HLA-Gene (schwarz), Pseudogene (hellgrau) sowie Gene anderer Proteine (dunkelgrau). Die Struktur der HLA-DR-Region ist in Abhängigkeit des HLA-DRB1-Alleles dargestellt. [modifiziert nach (Campbell und Trowsdale, 1993)].

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

1.1.3. Polymorphismus und Populationsgenetik der HLA-Merkmale

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

1.2. Typisierung der HLA-Merkmale

1.2.1. Serologische Typisierungsmethoden

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

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

1.2.2. Molekulargenetische Typisierungsmethoden

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

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

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

1.3. Biologie des HLA-DP-Merkmales

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

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

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

1.4.2. Assoziation von HLA-Merkmalen und CLL

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

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

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

2. Problem- und Zielstellung

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