

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

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

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

3. Material und Methoden

3.1. Probanden und Referenz-DNA

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

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

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

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

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

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

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

3.2. Typisierung der HLA-DPB1-Allele

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

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

3.2.2. Präparation der DNA

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

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

3.2.3. Synthese der verwendeten Oligonukleotide und Dig-Markierung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.5. Hybridisierung der Dig-SSO-Sonden

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

3.2.6. Auswertung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.4. Serologische HLA-Typisierung

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

3.4.1. Präparation von Lymphozyten des peripheren Blutes

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

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

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

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

Tab. 6: Schema der Bewertung der Reaktionsstärken im MLCT

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

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

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

3.5. Qualitätskontrolle und statistische Auswertung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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