

4. Ergebnisse

4.1. Testung und Optimierung der HLA-DPB1-Typisierungsmethode

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

4.1.1. Effizienz der PCR-Amplifikation

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

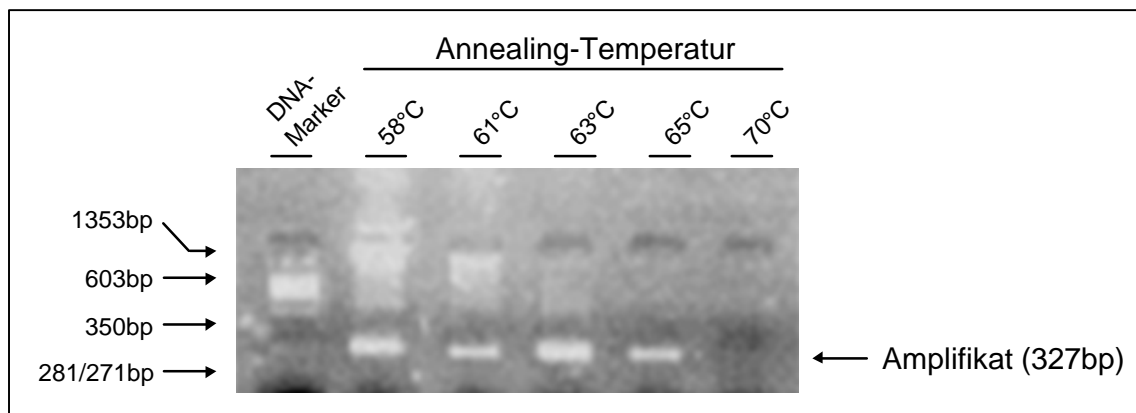


Abb. 5.: Elektrophorese nach PCR mit den Primern DPBAMP-A/-B bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen; übrige Reaktionsbedingungen gemäß Material und Methoden. Angegeben ist die Lokalisation des Amplifikates (327 bp) sowie der Molekulargewichtsmarker. Auf die Darstellung der Negativkontrolle wurde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

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

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

4.1.2. Spezifität der SSO-Hybridisierung

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

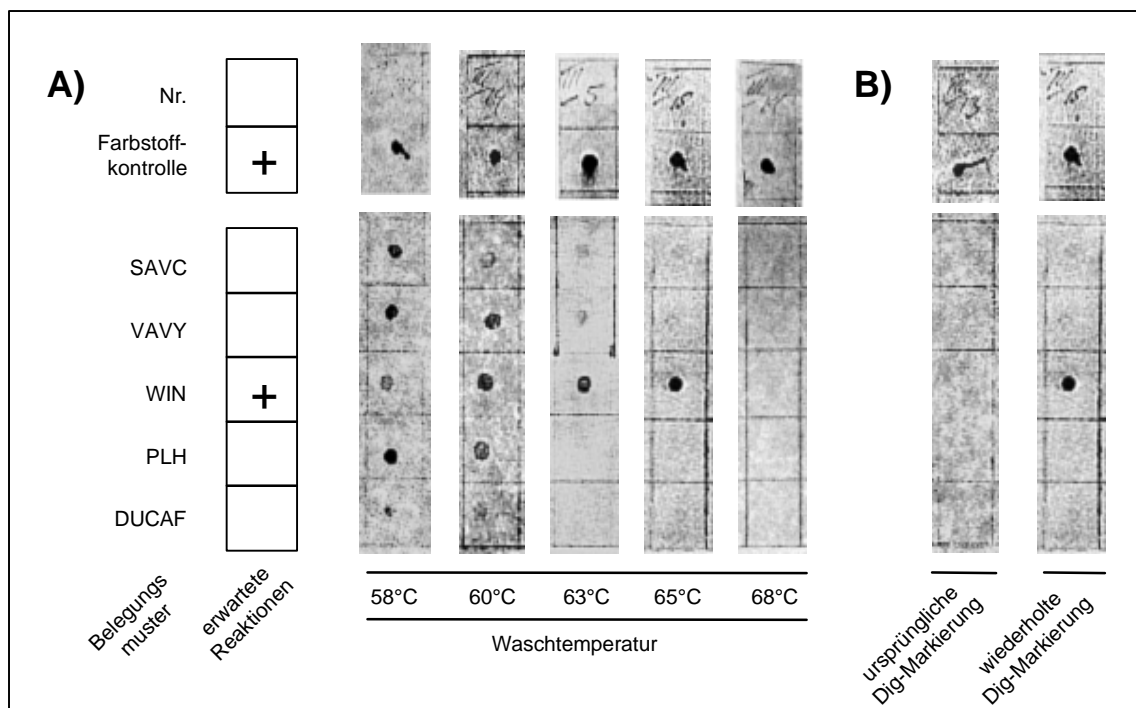


Abb. 6: Einfluss der Waschttemperatur und der Dig-Markierung auf das Typisierungsergebnis.

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

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

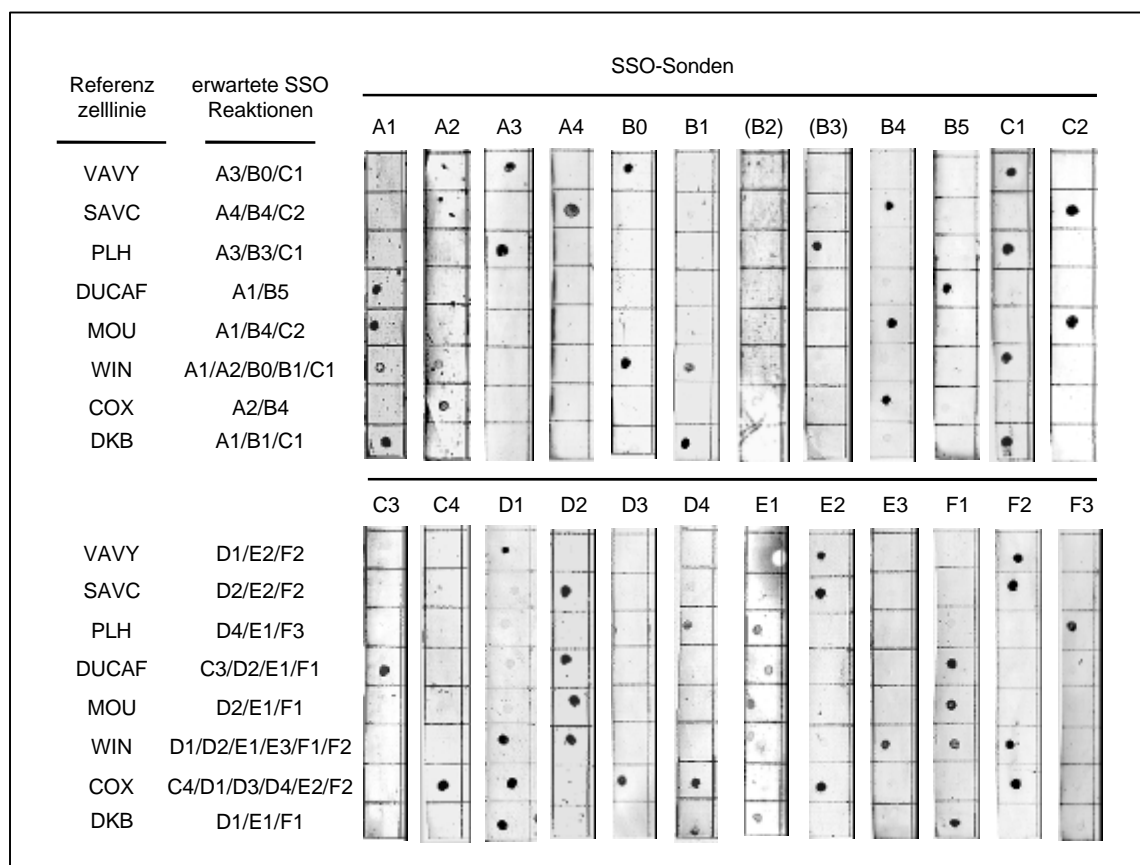


Abb. 7: HLA-DPB1-Typisierung von 8 lymphoblastoiden B-Zelllinien mit den verwendeten 22 (24) SSO-Sonden. Typisierung gemäß Material und Methoden. Die Sonden B2 und B3 wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

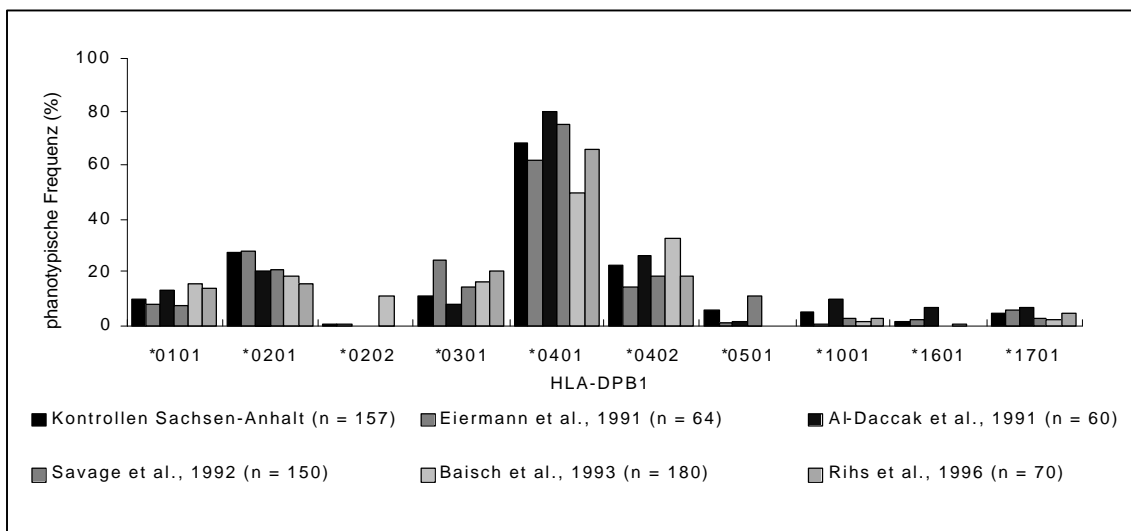


Abb. 8: Phänotypische HLA-DPB1-Frequenzen bei kaukasoiden Kontrollprobanden aus Sachsen-Anhalt sowie aus Europa und Nordamerika. Aufgeführt sind die 10 häufigsten Allele mit einer durchschnittlichen phänotypischen Frequenz > 10 %.

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

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

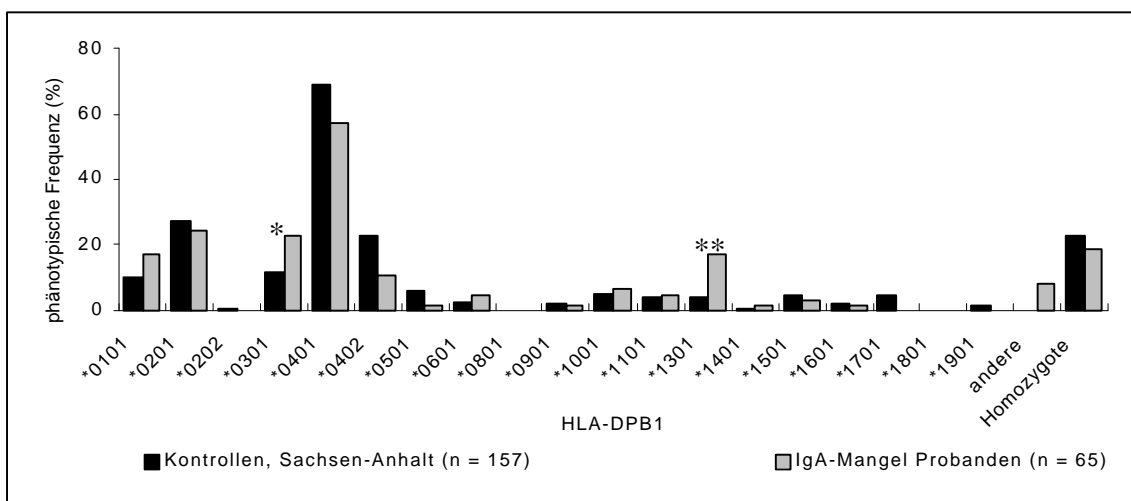


Abb. 9: Phänotypische HLA-DPB1-Frequenzen bei IgA-Mangel-Probanden und Kontrollen aus Sachsen-Anhalt. Die Allele HLA-DPB1*2001, -DPB1*2301, -DPB1*2601, -DPB1*2701 und -DPB1*5901 sind unter 'andere' zusammengefasst. * - $p < 0,05$; ** - $p_{MV} < 0,05$.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

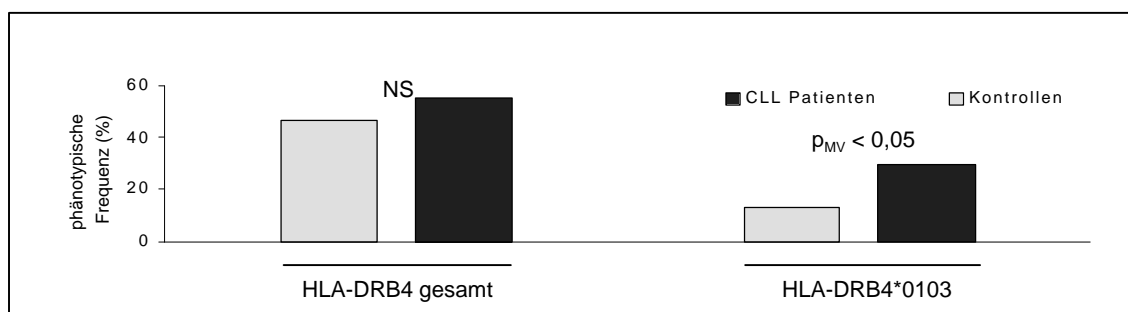


Abb. 10: Phänotypischer Anteil der HLA-DRB4- und HLA-DRB4*0103-positiven Probanden in den Gesamtgruppen der CLL-Patienten und Kontrollen.

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

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

HLA-	CLL-Patienten (n = 101)		Kontrollen (n = 157)		p
	n	pf (%)	n	pf (%)	
DRB1*0401	25	24,75	21	13,38	0,03
DRB1*0701	28	27,72	44	28,03	
DRB1*1301	12	11,88	34	21,66	0,07
DRB1* Homoz.	12	11,88	10	6,37	
DRB 4*0101	26	25,74	51	32,48	0,002 **
DRB4*0102	0	0,00	1	0,64	
DRB4*0103	30	29,70	21	13,38	
DRB3(52) Homoz.	20	19,80	35	22,29	
DRB3* Homoz.	11	10,89	16	10,19	
DRB4(53) Homoz.	10	9,90	10	6,37	
DRB4* Homoz.	8	7,92	10	6,67	0,02
DRB5(51) Homoz.	3	3,0	2	1,27	
DRB5* Homoz.	3	2,97	2	1,27	
DQB1*0201	34	33,66	45	28,66	0,02
DQB1*0202	4	3,96	21	13,38	
DQB1*0301	32	31,68	63	40,13	0,03
DQB1*0302	28	27,72	25	15,92	
DQB1* Homoz.	18	17,82	12	7,64	0,02

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.5.1. Unterteilung der Patientengruppe nach Alter und Geschlecht

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

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

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

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

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

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

4.5.2. HLA-Assoziationen der CLL in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter

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

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

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

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

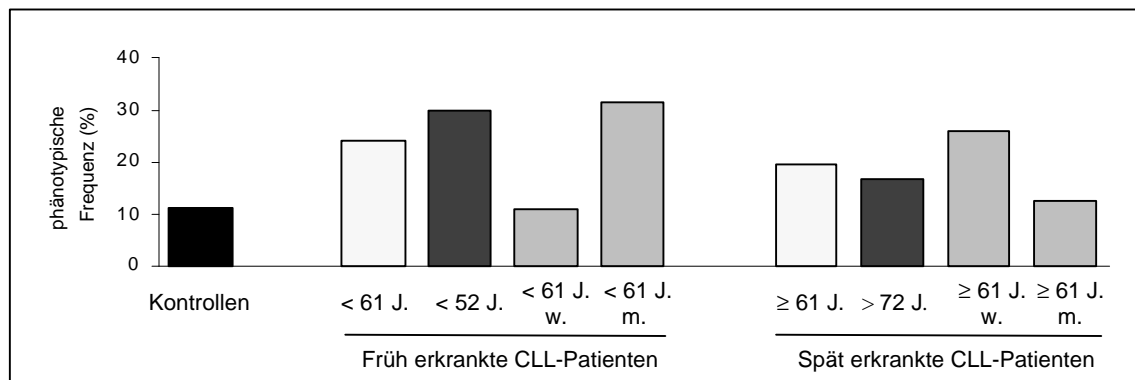


Abb. 11: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-DPB1*0301 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

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

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

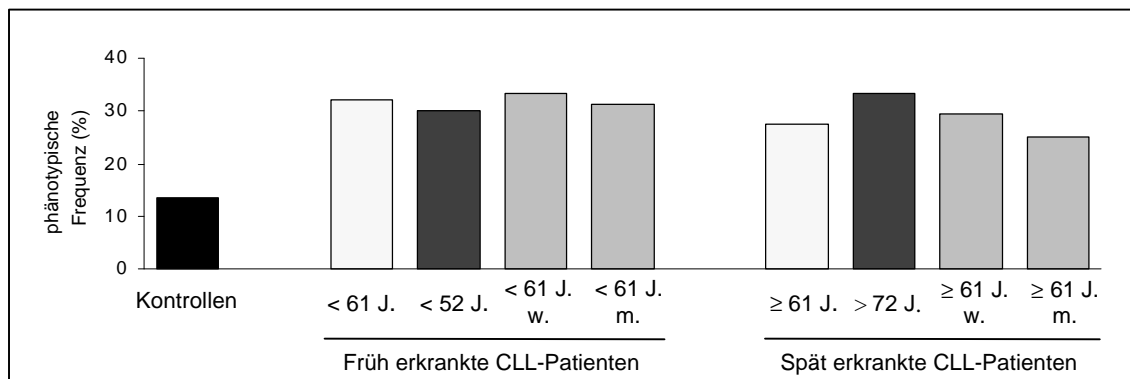


Abb. 12: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-DRB4*0103 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

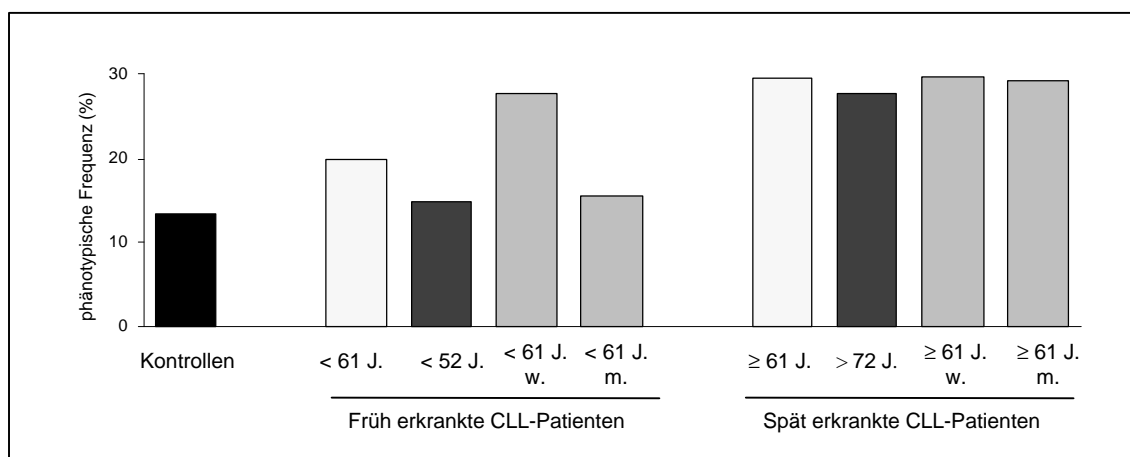


Abb. 13: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-DRB1*0401 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

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

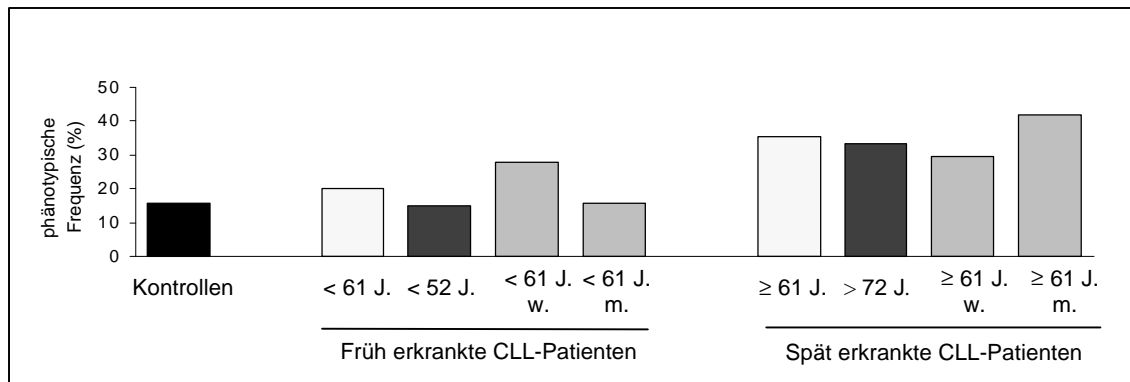


Abb. 14: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-DQB1*0302 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

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

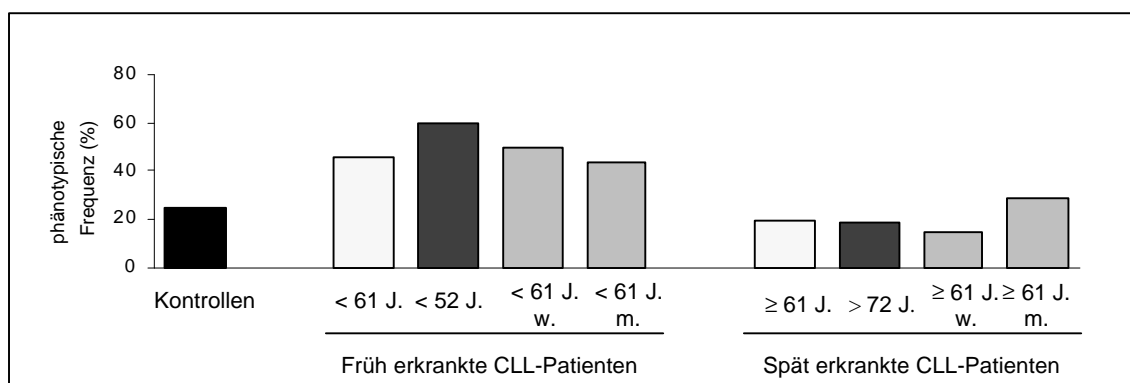


Abb. 15: Phänotypische Verteilung des Allels HLA-Cw*06 in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der CLL-Patienten.

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

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

4.5.3. HLA-Assoziationen der CLL in Abhängigkeit vom Geschlecht

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

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

HLA	CLL		Kontrollen	
	Weiblich (n = 45) n (pf)	Männlich (n = 56) n (pf)	Weiblich (n = 94) n (pf)	Männlich (n = 63) n (pf)
Cw*06	12 (26,7)	21 (37,5)	29 (30,9)	9 (14,3)
DRB1 Homoz.	9 (20,0)	3 (5,4)	6 (6,4)	4 (6,3)
DRB1*0401	13 (28,9)	12 (21,4)	12 (12,8)	9 (14,3)
DRB3/4/5 Homoz.	17 (37,8)	5 (8,9)	16 (17,0)	12 (19,0)
DRB3 Homoz.	19 (42,2)	2 (3,6)	7 (7,4)	9 (14,3)
DRB3*0101 Homoz.	6 (13,3)	0 (0,0)	4 (4,3)	5 (7,9)
DRB4 Homoz.	6 (13,3)	2 (3,6)	7 (7,5)	3 (4,8)
DRB4*0103	14 (31,1)	16 (28,6)	15 (16,0)	6 (9,5)
DQB1*0301 Homoz.	4 (8,9)	1 (1,18)	0 (0,0)	3 (4,8)
DQB1* Homoz.	13 (28,9)	5 (8,9)	8 (8,5)	4 (6,3)
DQB1*0202	2 (4,4)	2 (3,6)	15 (16,0)	6 (9,5)
DQB1*0302	13 (28,9)	15 (26,8)	16 (17,0)	9 (14,3)
DPB1*0301	9 (20,0)	13 (23,2)	9 (9,6)	9 (14,3)

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

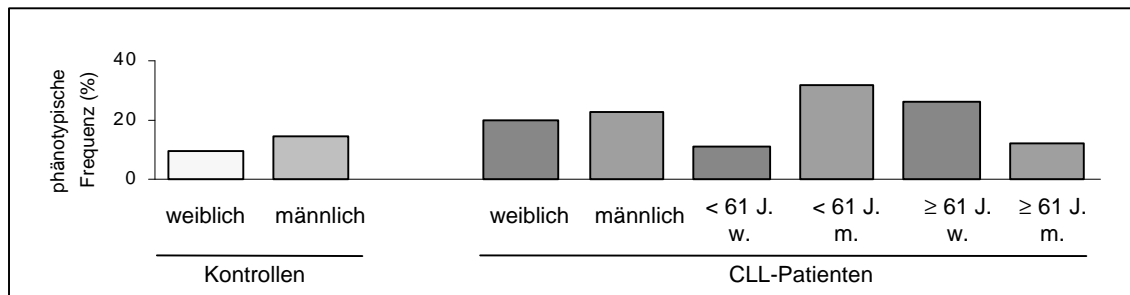


Abb. 15: Geschlechtsspezifische phänotypische Frequenzen des Allels HLA-DPB1*0301 unter CLL-Patienten und Kontrollen.

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

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

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

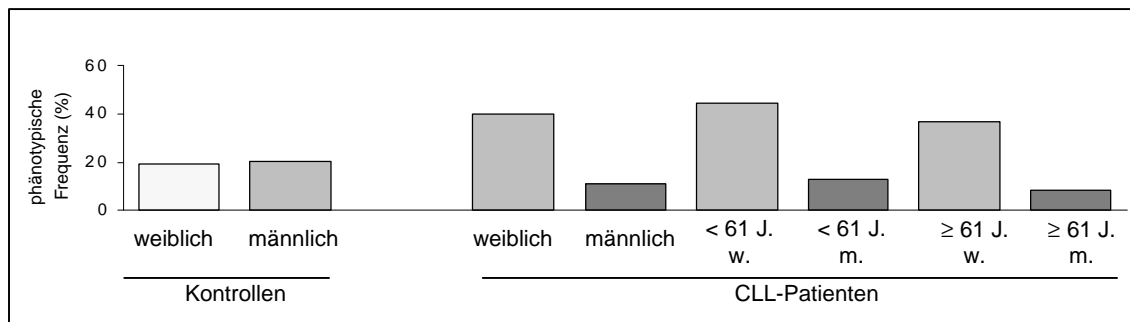


Abb. 16: Geschlechtsspezifische phänotypische Frequenzen der Gesamtzahl der Homozygotien der HLA-DRB3/4/5-Allele unter CLL-Patienten und Kontrollen.

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



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

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

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

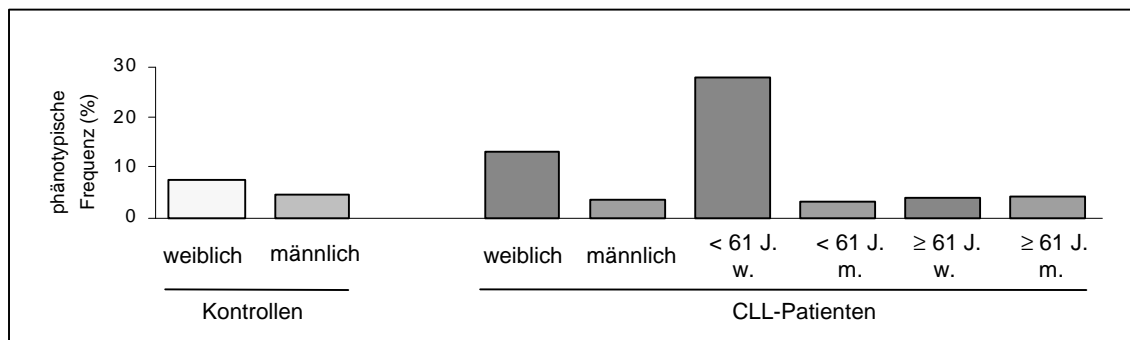


Abb. 18: Geschlechtsabhängige Verteilung der Gesamtzahl der HLA-DRB4-Homozygoten unter CLL-Patienten und Kontrollprobanden.

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

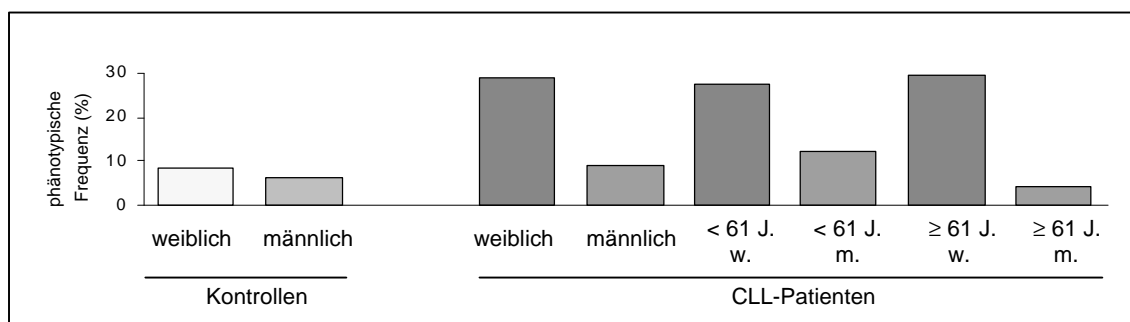


Abb. 19: Geschlechtsabhängige Verteilung der Gesamtzahl der HLA-DQB1-Homozygoten unter CLL-Patienten und Kontrollprobanden.

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

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

5. Diskussion

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

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