

eine enge Assoziation der Prognose der Erkrankung sowohl mit der TNF- α -Expression als auch mit dem Allel-Polymorphismus des TNF- α -Gens besteht (Salles et al., 1996; Warzocha et al., 1998). Weiterhin ist auch ein Zusammenhang zwischen HLA-assoziierten, geschlechtsabhängigen Hormonspiegeln und der Pathogenese von Leukämien zu berücksichtigen. So wurde eine Assoziation von HLA-Cw3 mit erhöhten Transcortinwerten bei Patienten mit lymphatischen Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen berichtet (De Moor et al., 1988).

Diese Überlegungen verdeutlichen die Komplexität der nur unvollständig verstandenen Pathogenese der CLL. Aus Sicht des Autors stellen die CLL-assoziierten HLA-Merkmale keinen für die Erkrankung notwendigen pathogenetischen Faktor dar, sondern prägen auf bisher nicht verstandene Weise das Erkrankungsrisiko sowie den Krankheitsverlauf. Die zahlreichen und zumeist schwachen HLA-Assoziationen der CLL sowie die Analogien mit der HLA-Assoziation von Autoimmunerkrankungen stimmen mit der Hypothese überein, dass bei der Pathogenese der CLL eine initiale Antigen-vermittelte Proliferation von B-Lymphozyten vorliegt, die nach einem mehrstufigen Mutationsprozess in einer malignen, monoklonalen Transformation resultiert (Gale et al., 1994). Gleichzeitig unterstützen die vorgelegten Ergebnisse auch die These, dass es sich bei der CLL um eine heterogene Erkrankung handeln könnte (Schroeder und Dighiero, 1994).

Zusammenfassend wird deutlich, dass:

- 1.) Die für alle Patienten beobachtete positive Assoziation der CLL mit HLA-DRB4*0103 und die CLL-spezifischen Kopplungen von Allelen des HLA-DR4:DR53:DQ8-Haplotypes auf eine Beteiligung der HLA-Merkmale an der Pathogenese der CLL hindeuten.
- 2.) Die für weibliche Patienten festgestellte positive Assoziation von HLA-DRB3/4/5- und HLA-DQB1-Homozygotie auf einen Zusammenhang zwischen MHC-Genen und geschlechtsspezifischem Erkrankungsrisiko hinweist.
- 3.) Die Assoziation von HLA-DPB1*0301 eine von den HLA-DR- und -DQ-Merkmalen unabhängigen Suszeptibilitätsfaktor in der zentromeren Region des MHC vermuten lässt.
- 4.) Die Assoziationen von CLL und Autoimmunerkrankungen mit identischen HLA-Merkmalen auf eine Immunpathogenese der CLL schließen lassen.

6. Zusammenfassung

Für verschiedene Krankheiten gilt ein Zusammenhang zwischen HLA-Merkmalen und Erkrankungsrisiko als gesichert. Die Entwicklung und Aktivierung spezifischer zellulärer und humoraler Effektormechanismen der erworbenen Immunität ist von der selektiven Präsentation antige-

ner Peptide durch die heterodimeren HLA-Moleküle abhängig. Gleichzeitig sind die im MHC lokalisierten Gene der HLA-Merkmale durch einen hohen Polymorphismus charakterisiert, dessen Verteilung populationspezifische Unterschiede aufweist. Die Bestimmung der Frequenzen der HLA-Merkmale in verschiedenen Bevölkerungsgruppen ist daher Voraussetzung für die Untersuchung einer möglichen Immunpathogenese HLA-assoziiierter Erkrankungen. Die Typisierung des HLA-DP-Merkmals, dessen Polymorphismus durch die Multiallelie des HLA-DPB1-Gens bestimmt wird, ist mit serologischen Methoden nur unzureichend möglich. Zu Beginn der vorliegenden Studie lagen nur wenige Daten zur HLA-DPB1-Verteilung in verschiedenen Bevölkerungsgruppen sowie zu HLA-DPB1-Krankheitsassoziationen vor.

Die CLL ist eine maligne Erkrankung, die durch eine monoklonale Proliferation von B-Lymphozyten gekennzeichnet ist. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung sind bisher nur wenig verstanden. Für die CLL wurde eine Assoziation mit verschiedenen, serologisch typisierten HLA-Merkmalen beschrieben, ohne dass eine definitive Assoziation gesichert ist. Daten zur HLA-DPB1-Verteilung bei CLL-Patienten liegen bisher nicht vor.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ausgehend von Referenzprotokollen eine Methode der HLA-DPB1-Typisierung basierend auf dem Prinzip der PCR-SSO entworfen und optimiert. Als kritisch für die Typisierung erwies sich die Temperatur des spezifischen TMAC-Waschschruttes sowie die Digoxigenin-Markierung der SSO-Sonden. Sechs neu entwickelte Sonden wurden erfolgreich getestet und für die Routinetypisierung verwandt. Das verwendete Set von 22 SSO-Sonden erlaubte die Differenzierung von 93 % der bekannten HLA-DPB1-Allele und wurde erfolgreich für die Typisierung von Referenz-DNA eingesetzt. Es wurde demonstriert, dass die Methode der PCR-SSO eine zuverlässige HLA-DPB1-Typisierung ermöglicht.

Mit der entwickelten PCR-SSO-Methode wurden die HLA-DPB1-Allele von 157 gesunden kaukasoiden Probanden aus Sachsen-Anhalt typisiert. Auch bei Berücksichtigung der zwischenzeitlich neu beschriebenen HLA-DPB1-Allele erlaubte die angewandte Methode bei allen Probanden eine eindeutige Typisierung. Die beobachtete HLA-DPB1-Frequenzverteilung entsprach der für kaukasoiden Populationen typischen Verteilung. Das häufigste Allel HLA-DPB1*0401 trat mit einer phänotypischen Frequenz von ca. 68 % auf; die Allele HLA-DPB1*0101, -DPB1*0201, -DPB1*0301 und -DPB1*0402 fanden sich mit einer Frequenz von jeweils 10 - 30 %, während alle anderen Allele mit Frequenzen < 10 % beobachtet wurden. Die im Vergleich zu anderen Untersuchungen beobachtete Varianz der Frequenzen verschiedener HLA-DPB1-Allele in kaukasoiden Populationen kann einerseits mit Unterschieden in Abhängigkeit von der geographischen Herkunft der Probanden erklärt werden. Andererseits wurde

deutlich, dass für die Untersuchung der Krankheitsassoziationen von HLA-DPB1 die Typisierung von gesunden und zufällig ausgewählten Kontrollprobanden notwendig ist. Die Ergebnisse bestätigen gleichzeitig, dass sich die typische kaukasoide HLA-DPB1-Allelverteilung von der Verteilung in Populationen anderer Abstammung unterscheidet. Damit wird deutlich, dass die Vererbung des HLA-DP-Merkmals durch eine genetische Variabilität und Selektion charakterisiert ist, wie sie für die anderen HLA-Merkmale vermutet wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Frequenzen der HLA-DPB1-Allele und weiterer HLA-Merkmale in einer Gruppe von 101 CLL-Patienten bestimmt und mit der Verteilung in der Kontrollgruppe verglichen. Dabei wurde eine erhöhte Frequenz des Allels HLA-DPB1*0301 festgestellt, während sich die Frequenzen der weiteren HLA-DPB1-Allele nicht von der Normalverteilung unterschieden. Auffällig war ein unter CLL-Patienten erhöhter Anteil der Allele, die an Position 65 und 69 der HLA-DPB1-Kette für die Aminosäuren Isoleucin bzw. Lysin und an Position 55 - 57 für die Sequenz AspGluAsp kodieren. Keiner dieser Unterschiede behielt seine Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche bei.

Es wurden zwischen CLL-Patienten und Kontrollen keine Unterschiede in der Verteilung der serologisch bestimmten HLA-A-, -B- und -DR-Antigene sowie in der Verteilung der in niedrigauflösender molekulargenetischer Typisierung bestimmten HLA-A-, -B- und -Cw-Merkmale beobachtet. Dagegen war unter CLL-Patienten die Frequenz der molekulargenetisch bestimmten Allele HLA-DRB4*0103, -DRB1*0401 und -DQB1*0302 erhöht und die des Allels HLA-DQB1*0202 verringert. Gleichzeitig war der Anteil der Gesamtzahl von Homozygoten der HLA-DQB1-Allele unter CLL-Patienten erhöht. Die Erhöhung der Frequenz des Allels HLA-DRB4*0103 war unabhängig vom Vorliegen des Merkmals HLA-DRB4 (DR53) und behielt ihre Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche bei. Dieser Unterschied stellte sich unabhängig vom Geschlecht und vom Alter der Patienten bei Erstdiagnose dar. Für die Allele HLA-DRB1*0401 und -DQB1*0302 fand sich die Frequenzerhöhung in allen Patientengruppen mit Ausnahme der Gruppe der männlichen Patienten mit einem Erkrankungsalter < 61 Jahren. Die erhöhte Frequenz der HLA-DQB1-Homozygoten betraf nur weibliche Patienten. Die Frequenz des Allels HLA-DQB1*0202 war nur unter Patienten mit einem Erkrankungsalter \geq 61 Jahre verringert.

Weiterhin wurde das Kopplungsungleichgewicht ausgewählter Allelkombinationen untersucht. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen wurden für HLA-DPB1-Allele unter kaukasoïden Probanden nur wenige und relativ schwache Kopplungen mit anderen HLA-Merkmalen beobachtet. Die bekannte Kopplung von HLA-DPB1*0101 mit HLA-DRB1*0301 konnte in

dieser Studie als Kopplung von HLA-DPB1*0101 mit Merkmalen des erweiterten Haplotyps HLA-B8:Cw7:DR3:DQ2 bestätigt werden. Allerdings fand sich diese Kopplung ausschließlich in der Kontrollgruppe, während unter CLL-Patienten für HLA-DPB1-Allele nur ein Kopplungsungleichgewicht für die Kombination HLA-DRB1*0701:DPB1*1701 bestand. Die Analyse der Kombinationen von CLL-assoziierten HLA-Allelen mit anderen HLA-Merkmalen ergab eine positive Assoziation der CLL mit den Allelkombinationen HLA-DRB4*0103:DQB1*0302 und HLA-DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302 sowie der erweiterten Kombination HLA-Cw*03:B*62:DRB1*0401:DRB4*0103:DQB1*0302. Es wurde dabei ein CLL-spezifisches, auch nach Korrektur für multiple Vergleiche signifikantes Kopplungsungleichgewicht für die Kombinationen HLA-DRB1*0401:DRB4*0103 und HLA-DRB4*0103:DQB1*0302 festgestellt. Es bestanden keine Kopplungsungleichgewichte für Kombinationen des CLL-assoziierten Allels HLA-DPB1*0301 mit anderen HLA-Merkmalen.

Der Vergleich der Verteilung der HLA-Merkmale hinsichtlich des Alters bei Erstdiagnose und des Geschlechtes der Patienten ergab eine erhöhte Frequenz des Merkmals HLA-Cw*06 unter Patienten mit einem Erkrankungsalter < 61 Jahre sowie des Merkmals HLA-B*18 bei Patienten mit einem Erkrankungsalter > 72 Jahre. Unter weiblichen Patienten fand sich eine erhöhte Frequenz der Gesamtzahl der Homozygotien der Merkmale HLA-DRB1/3/4/5 sowie der HLA-DQB1-Homozygotien.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die HLA-Merkmale einen Faktor der komplexen Pathogenese der CLL darstellen. Dabei ist interessant, dass für die CLL eine positive Assoziation mit Allelen des HLA-DR4:DR53:DQ8 Haplotyps besteht, für den gleichzeitig eine Assoziation mit Autoimmunerkrankungen als gesichert gilt. Die Kopplungsanalyse der erstmals in einer Gruppe von CLL-Patienten typisierten HLA-DPB1-Allele lässt vermuten, dass die Assoziation der CLL mit HLA-DPB1*0301 unabhängig von der Assoziation mit HLA-DR- und -DQ-Merkmalen ist. Die denkbaren zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen bestehen sowohl in einer HLA-abhängigen infektiösen Ätiologie, als auch in einer herabgesetzten HLA-abhängigen Anti-Tumoraktivität. Andererseits ist eine Kopplung zwischen HLA-Allelen und anderen, pathogenetisch relevanten Genen möglich. Die beobachteten alters- und geschlechtsspezifischen HLA-Assoziationen unterstützen die Hypothese, dass die HLA-Merkmale für die Pathogenese der CLL nicht entscheidend sind, jedoch das Risiko der malignen Lymphozytenproliferation sowie die Prognose der Erkrankung beeinflussen. Insbesondere das mit einer Homozygotie im HLA-DR- und -DQ-Bereich assoziierte erhöhte Erkrankungsrisiko unter weiblichen Patienten bestätigt frühere Untersuchungen, in denen ein mit MHC-Homozygotie assoziiertes Risiko monoklonaler Lymphozytenproliferation beschrieben wurde.