

Molekulargenetische Analyse der minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHag) und deren Relevanz für die allogene Blutstammzell-Transplantation

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Biologie und Geographie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Dipl. Biol. Falko Heinemann

aus Herford

im Januar 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Januar 2005

Namen der Gutachter: 1. Gutachter: Prof. Dr. H. Grosse-Wilde
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

Abkürzungen und Fachtermini

A	Adenin
ABCA	<i>ATP binding cassette transporter A</i>
ABL	<i>Ableson leukemia virus</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
CI	<i>confidence interval</i> (Konfidenzintervall)
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie Virus
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
DFFRY	<i>Drosophila fat facetsrelated, Y-linked</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
(d)dNTP	(Di)Desoxynukleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
ECBR	<i>European collection for biomedical research</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
GvL	<i>graft-versus-leukemia</i>
h	Stunde
HSCT	<i>hematopoeitic stem cell transplantation</i>
HGH	humanes Wachstumshormon (<i>human growth hormone</i>)
HLA	humanes Leukozyten Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HPA	humanes Plättchenantigen (<i>human platelet antigen</i>)
HSP	Hitzeschock-Protein
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
H-Y	Histokompatibilitäts Y Antigen
IFI	Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Essen
Ig-CAM	<i>Ig-like cell adhesion molecule</i>
ISD	<i>identical sibling donor</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>

kb	Kilobasen
KIR	<i>killer inhibitory receptor</i>
KMT	Knochenmark-Transplantation
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LIS-SSCP	<i>low sonic strenght-single-stranded conformation polymorphism</i>
Mb	Megabasenpaare
mHag	minor Histokompatibilitäts-Antigen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MUD	<i>matched unrelated donor</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
OR	<i>odds ratio</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBSCT	<i>peripheral blood stem cell transplantation</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31)</i>
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RSCA	<i>reference strand mediated conformation analysis</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of mean</i>
SMCY	<i>selected mouse cDNA on Y</i>
SSP	sequenzspezifische Primer
T	Thymin
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylendiamid
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TX	Transplantation
U	Enzymeinheit (<i>Unit</i>)
UPM	Umdrehungen pro Minute
UTY	<i>Ubiquitously transcribed TPR gene on Y</i>
V	Volt
VLA-2	<i>very late antigen 2</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Genstruktur des MHC sowie Struktur und Funktion der HLA-Antigene	1
1.2	Die allogene Knochenmarktransplantation (KMT)	5
1.3	minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHag)	6
1.4	Zielsetzung der Arbeit	11
2.	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Zelllinien	12
2.1.2	Patienten	12
2.1.3	DNA-Sequenzen	13
2.1.4	Oligodesoxynukleotide	14
2.1.5	DNA-Fragmentlängenmarker	16
2.1.6	Enzyme und Chemikalien	17
2.1.7	Verwendete kommerziell erhältliche Systeme (<i>Kits</i>)	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Kultivierung von humanen lymphoblastoiden Zelllinien (LCL)	19
2.2.2	DNA-Präparationsmethoden	19
2.2.2.1	DNA-Präparation aus Blut/LCLs (QIAGEN)	20
2.2.2.2	DNA-Präparation aus Blut (QIAamp Midi Kit)	21
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	21
2.2.4	Restriktionsspaltung von DNA	22
2.2.5	Aufreinigung von DNA	22
2.2.6	Gelelektrophorese	23
2.2.6.1	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.6.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	24
2.2.7	Kontrolle der Primer	26
2.2.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
2.2.8.1	PCR-SSP für die mHag-Testung	27
2.2.8.2	PCR-Bedingungen für <i>Sit^a</i> RFLP-Testung	28
2.2.8.3	Sequenzierungen	30
2.2.9	Statistik	32
3.	Ergebnisse	34
3.1	Etablierung der PCR-SSP-Methode zur allelspezifischen mHag-Testung	34
3.1.1	Positionen der sequenzspezifischen Primer im CD31-Gen	34
3.1.2	Sequenzspezifische Amplifikation der Allele HA-1 H und HA-1 R	37
3.1.3	Sequenzspezifische Amplifikation der CD49b-Allele HPA-5a und 5b	38
3.2	Die <i>Sit^a</i> RFLP-Testung	40
3.3	Allelverteilungen der untersuchten mHag bei Normalpersonen	41
3.3.1	Relative Häufigkeit der CD31-Allele	41
3.3.2	Relative Häufigkeit der HA-1-Allele	43

3.3.3	Relative Häufigkeit der CD49b Varianten HPA-5a und b	45
3.4	Segregationsanalyse der mHag-Haplotypen	45
3.4.1	Definition der CD31-Haplotypen	45
3.4.2	Bestätigung des neu detektierten CD31-Haplotyps mittels Sequenzierung	49
3.4.3	Segregationsanalyse der HA-1- und CD49b-Allele	50
3.5	Verteilung der HLA-Merkmale bei CML-Patienten und deren Spendern	54
3.6	Verteilung der mHag-Allele bei CML-Patienten und deren verwandten sowie unverwandten Spendern	54
3.7	Alter und aGvHD-Inzidenz innerhalb der Patientenkohorte	54
3.8	Inzidenz akuter GvHD und mHag-Inkompatibilität	57
3.8.1	Assoziation von mHag-Kompatibilität und aGvHD-Inzidenz bei Patienten mit bestimmten HLA-Merkmalen	57
3.8.2	mHag-Kompatibilität und aGvHD-Inzidenz bei in HLA-Supertypen eingeteilten Patienten	58
3.8.3	Einfluss von HA-1- und CD31-Inkompatibilität auf die aGvHD-Inzidenz von HSCT-Patienten.....	59
3.9	Einfluss der Geschlechts-Kompatibilität von Spender und Empfänger auf die Entwicklung einer akuten GvH-Reaktion.....	60
3.10	Untersuchung der cDNA Sequenz KIAA0223 bzw. der Aminosäure-Sequenz des HA-1-Genproduktes	67
3.10.1	Direkte Sequenzierung des 109 bp großen Exons Nummer 22 im HA-1-Gen	68
3.10.2	Nachweis einer bisher unbeschriebenen Variation im HA-1-Gen	69
4.	Diskussion	72
4.1	Validierung der mHag-Testung mittels PCR-SSP-Methodik	72
4.2	Klinische Relevanz der untersuchten mHag für die allogene Blutstammzell- Transplantation.....	74
4.3	Bedeutende Risikofaktoren für eine akute GvH-Reaktion.....	75
4.4	Auswirkungen weniger relevanter aGvHD-Einflussfaktoren	77
4.5	Geschlechts-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger (<i>Sex-Mismatch</i>)..	78
4.6	Auswirkungen von mHag-Inkompatibilitäten auf die unverwandte allogene Blutstammzell-Transplantation	78
4.7	Funktionelle Aspekte zur HLA-Klasse I-abhängigen mHag-Präsentation.....	80
4.8	Beschreibung einer Intron-Variation im HA-1-Gen.....	83
4.9	Schlussbemerkung	84
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literatur	86

1. Einleitung

Bei der Transplantation solider Organe sowie hämatopoetischer Stammzellen im Bereich der Knochenmarktransplantation (KMT) kommt es häufig zu Abstoßungsreaktionen, die durch einen Angriff des Immunsystems des Empfängers gegen das Fremdgewebe des Spenders oder im Fall der KMT des Spenders gegen das Gewebe des Empfängers gekennzeichnet sind. Als Hauptursache für diese Abwehrreaktion werden Differenzen in den Gewebeantigenen verantwortlich gemacht, die als polymorphe Glykoproteine von einem eng gekoppelten Gensystem kodiert werden. Dieses Gensystem bezeichnet man als „Haupt-Histokompatibilitätskomplex“ (*major histocompatibility complex*, MHC). Schon vor fast 70 Jahren erkannte man erste Hinweise auf die Existenz dieses Gensystems (Gorer PA, 1936), heute ist ein MHC-System bei allen untersuchten Säugetieren beschrieben (Götze D, 1977). Den menschlichen MHC bezeichnet man auch als HLA-System (für „Humanes Leukozyten Antigen“ oder *human leukocyte antigen*).

Die Entdeckung des MHC fand ihren Ursprung in Untersuchungen zur Gewebetransplantation. Dabei stellte sich bald heraus, dass die Ausprägung der immunologischen Abstoßungsreaktion im wesentlichen davon abhängt, inwieweit sich Spender und Empfänger in ihren Gewebeantigenen unterscheiden. Mittlerweile wird dem MHC-System eine zentrale Rolle im Immunsystem bei der Erkennung von „selbst“ und „nicht selbst“ zugesprochen. Die polymorphen MHC-Antigene vermitteln durch ihre Funktion als Antigen-präsentierende Moleküle die spezifische zelluläre Immunantwort nach Prozessierung von fremden (allogenen) oder auch körpereigenen (autologen) Proteinantigenen (Zinkernagel et al., 1974).

1.1 Genstruktur des MHC sowie Struktur und Funktion der HLA-Antigene

Der humane MHC ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert (6p21.1 - 6p21.3) und umfasst einen Bereich von ca. 3.500 Kilobasenpaaren (Abb. 1). Man unterscheidet innerhalb dieses Genabschnittes drei Regionen: Die Region der klassischen HLA-Klasse I-Gene liegt auf der telomer gelegenen Seite des MHC, zentromerwärts gelegen schließen sich die der HLA-Klasse III-Region zugehörigen Gene an. In diesen Bereich kartieren beispielsweise die Komplementfaktoren C2, Faktor B, C4A und C4B aber auch Regulationsproteine wie z. B. TNF α oder HSP70. Der Begriff der Klasse III-Gene bezeichnet damit eine heterogene Gruppe von Genen, die weder der Klasse I noch Klasse II zugerechnet werden können. Die klassischen HLA-Klasse II-Genorte liegen auf der zentromerwärts gelegenen Seite des MHC und beinhalten auch Gene für die intrazelluläre

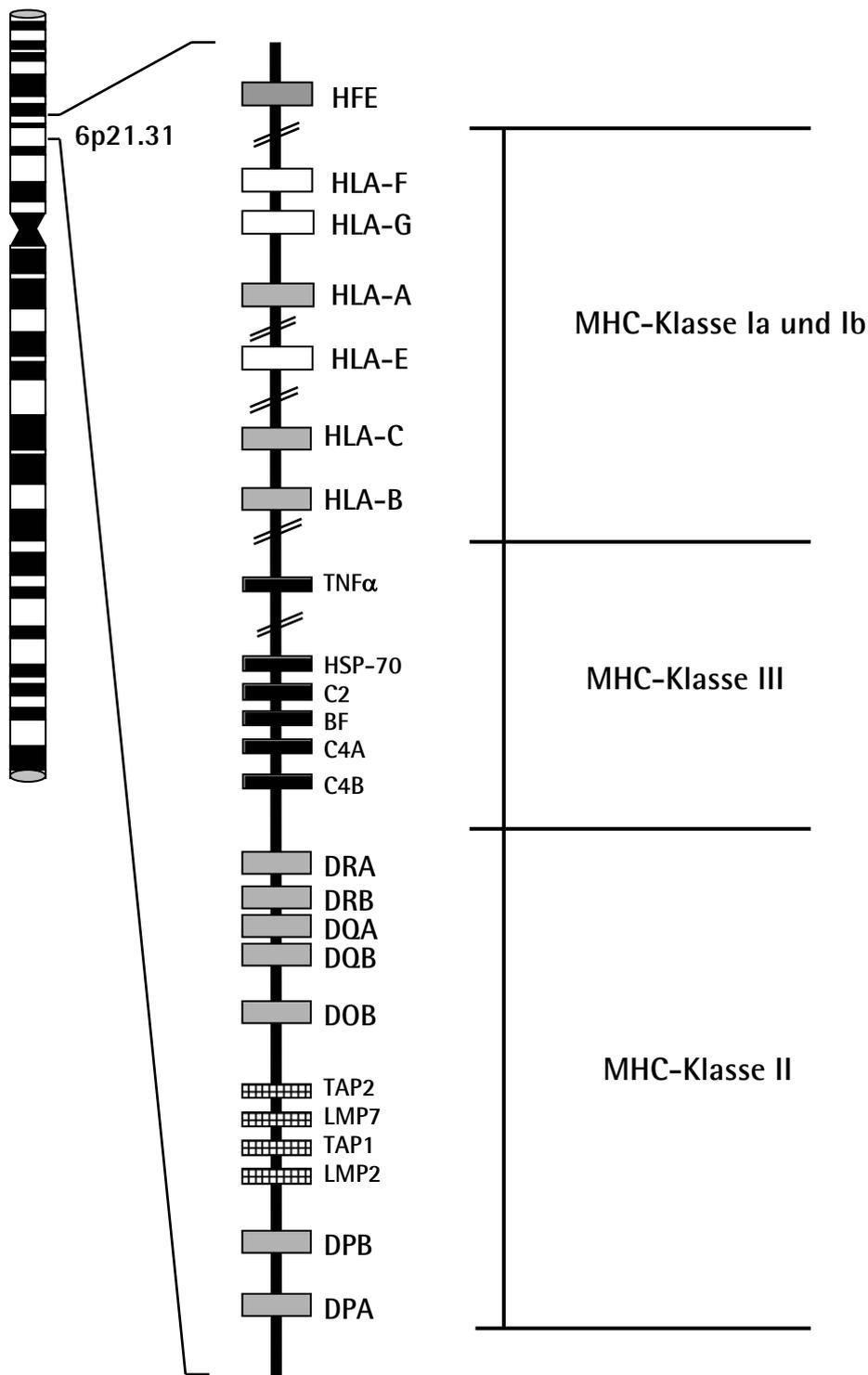


Abb. 1:
 Die genetische Organisation des humanen MHC. : Gene klassischer HLA-Klasse Ia und II Merkmale, : Gene nicht klassischer HLA-Klasse Ib Merkmale, : Gene innerhalb der MHC Klasse III-Region, : Gene für Antigen-Prozessierung und des Transportermoleküle innerhalb der MHC-Klasse II-Region

Antigenprozessierung und den Transportprozessierter Antigene (TAP1/TAP2 und LMP1/LMP2).

Bei den HLA-Klasse I-Molekülen kodieren drei Genorte für die klassischen serologischen Klasse Ia-Spezifitäten HLA-A, -B und -C. Darüber hinaus werden aus dieser Region auch die strukturell andersartigen, nicht klassischen Klasse Ib-Gene HLA-E, -F und -G exprimiert. Der HLA-Klasse II-Bereich wird durch mehrere Subregionen charakterisiert, von denen die HLA-DR-, HLA-DQ-, und HLA-DP-Genorte die wichtigsten darstellen. Die biologische Relevanz weiterer Klasse II-Genorte (DOB, DNA, u. a.) ist teilweise noch ungeklärt, auch sind letztgenannte weniger polymorph als die klassischen Klasse II-Genprodukte.

Die HLA-Klasse I-Merkmale lassen sich auch durch ihren molekularen Aufbau, ihre Expression im Gewebe und damit verbunden durch ihre Funktion von den HLA-Klasse II-Molekülen unterscheiden. HLA-Klasse I-Moleküle bestehen aus einer schweren Membran verankerten α -Kette mit ihren drei Domänen ($\alpha 1$ bis $\alpha 3$) und sind mit einer leichten β -Kette ($\beta 2$ -Mikroglobulin, $\beta 2m$) nicht kovalent verknüpft (Nakamuro et al., 1973). Das $\beta 2m$ -Molekül weist keinen Polymorphismus auf und kartiert auf Chromosom 15q22 (Goodfellow et al., 1975). Die Expression von Klasse I-Molekülen erfolgt auf der Mehrzahl der kernhaltigen Zellen.

Im Unterschied dazu werden Klasse II-Moleküle bevorzugt nur auf Antigen präsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten oder dendritischen Zellen exprimiert (Shakelford et al., 1982). Ihr Aufbau besteht aus einer schweren α - und einer leichten β -Kette mit den Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bzw. $\beta 1$ und $\beta 2$. Beide nicht kovalent miteinander verbundenen Ketten sind Membran verankert (Wernet P, 1976; Snary et al., 1977).

Die Funktion der HLA-Moleküle für die Immunabwehr besteht in der Präsentation von Antigenfragmenten (d. h. Peptiden), deren Herkunft entweder endogen oder auch exogen sein kann und die den T-Zellen präsentiert werden. Der für diese Aufgabe spezialisierte T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*=TCR) kann das ihm dargebotene Peptid nur im Kombination mit einem HLA-Molekül erkennen, was als HLA- oder MHC-Restriktion bezeichnet wird (Zinkernagel et al., 1974). Dabei stellt die hochpolymorphe Peptidbindungsstelle den funktionell wichtigsten Teil des HLA-Moleküls dar. Kristallographische Analysen haben gezeigt, dass die HLA-Moleküle an ihrer dem TCR zugewandten Seite eine Spalte ausbilden (Bjorkman et al., 1987). Diese Spalte ermöglicht die Aufnahme von Nonameren (bei HLA-Klasse I) bzw. längeren Peptiden durch einen weiteren Öffnungswinkel bei HLA-Klasse II-Molekülen.

Neuere Daten zeigen, dass ein Großteil aller humanen HLA-A und -B-Allele aufgrund ihrer Peptid-Bindungsspezifitäten in HLA-Supertypen eingeteilt werden kann (Sidney et al., 1996). Dazu sind bestimmte Aminosäuren an den sog. Ankerpositionen der Peptid bindenden Grube der HLA-Moleküle für die Bindung von entscheidender Bedeutung, die übrigen Aminosäuren der

Peptide spielen für die Bindung nur eine untergeordnete Rolle. Auf diese Weise konnten humane HLA-Supertypen definiert werden: der HLA-A3-Supertyp mit A*0301, A*1101, A*3101, A*3301, A*3401, A*6601, A*6801 und A*7401, der HLA-B7-Supertyp mit B*0702-5, B*3501-3, B*5101-5, B*5101-5, B*5301, B*5401, B*5501-2, B*5601, B*6701 und B*7801 sowie schließlich der HLA-B44-Supertyp, der durch die Allele HLA-B*37, B*40(60), B*40(61), B*41, B*44, B*45, B*47, B*49 und B*50 charakterisiert wurde.

Die eigentliche Antigenerkennung erfolgt durch den ternären Komplex aus HLA-Molekül, prozessiertem Antigen, welches an das HLA-Molekül gebunden ist, und dem T-Zell-Rezeptor (TCR, Abb. 2). Dabei können die T-Lymphozyten nicht nur das präsentierte Antigen, sondern gleichzeitig auch zwischen „eigenen“ (autologen) und „fremden“ (allogenen) HLA-Molekülen unterscheiden (Garcia et al., 1998). Mit dem T-Zellrezeptor komplexiert liegen die Glykoproteine CD4 oder CD8 vor: CD4-positive T-Lymphozyten (z. B. T-Helferzellen) erkennen Peptide im Komplex mit HLA-Klasse II, während CD8-positive, zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) Peptide nur im Zusammenhang mit HLA-Klasse I erkennen (Allison et al, 1987).

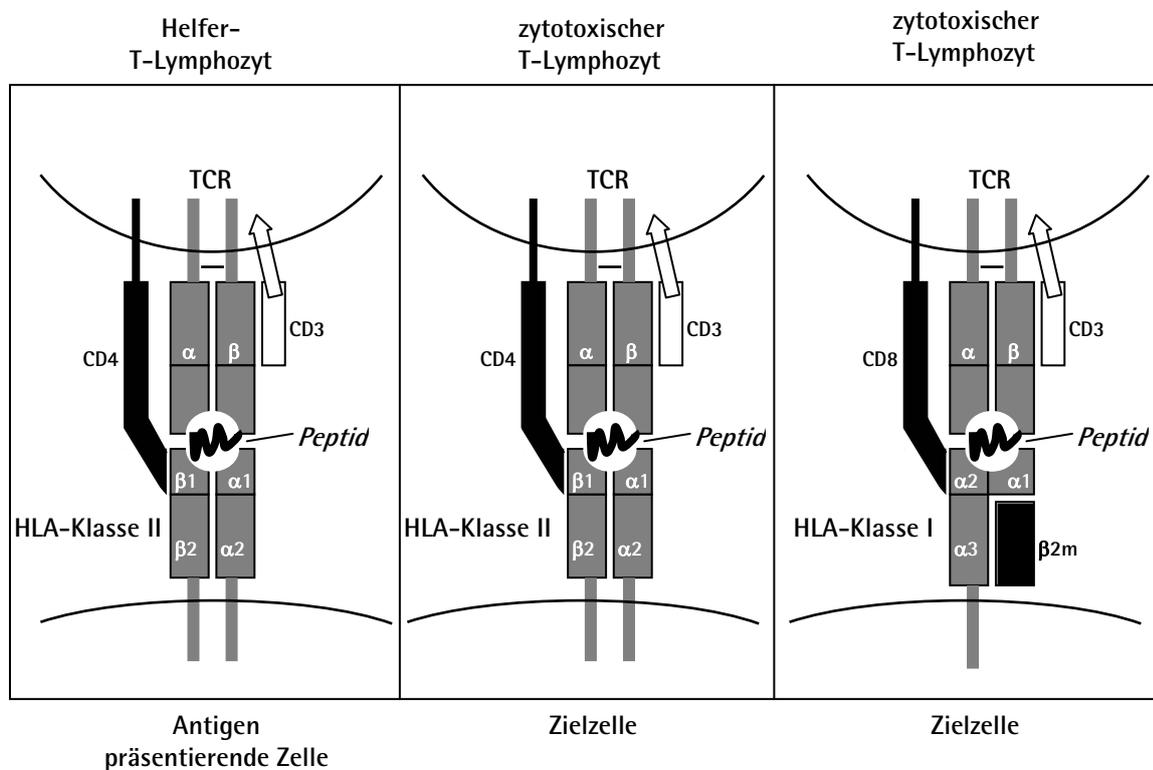


Abb. 2:
Schematische Darstellung des Modells der Antigenpräsentation durch HLA-Klasse-I und Klasse-II Moleküle an den T-Zell-Rezeptor. Erklärungen im Text.

1.2 Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (HSCT)

Eine Leukämie ist eine maligne Entartung von lymphoiden oder myeloiden Vorläuferzellen des Blutes, deren Ursache oftmals in chromosomalen Aberrationen, viralen Infektionen oder Chemikalien- und Strahlenexposition liegt (Mughal T, 2000). Man unterscheidet zwischen chronischen (CLL,CML) und akuten Leukämien (ALL, AML), wobei die chronische lymphatische Leukämie (CLL) in der westlichen Welt die häufigste ist. Die chronische myeloische Leukämie (CML) macht ca. 20% aller Leukämien aus und zeigt eine jährliche Erkrankungsinzidenz von ca. 2 auf 100.000 Einwohnern ohne erkennbare geographische Variation (Faderl et al., 1999). Verknüpft mit der CML ist eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, die zur Bildung des sog. Philadelphia-Chromosoms führt (Novel und Hungerford, 1960). Dabei werden das ABL-Gen auf dem Chromosom 9 und das BCR-Gen auf dem Chromosom 22 durchtrennt und Bestandteile von beiden auf dem Philadelphia-Chromosom zu einem BCR-ABL-Fusionsgen kombiniert. Ein Genprodukt mit der Bezeichnung P210 dieses Fusionsgens konnte ebenso wie eine Präsentation BCR-ABL-spezifischer Peptide über HLA-Moleküle nachgewiesen werden (Kurzrock et al., 1988).

Trotz erheblicher Verbesserungen der chemotherapeutischen Methoden bei der Behandlung von Leukämien bietet sich besonders für die CML die Knochenmarktransplantation (KMT) oder die Transplantation von aus dem peripheren Blut des Spenders gewonnenen Stammzellen (*peripheral blood stem cell transplantation*=PBSCT) als die Behandlungsmethode mit der größten Aussicht auf Heilung des Patienten an (Sawyers CL, 1999). Dabei wird mit einer Hochdosistherapie (Konditionierung) das Knochenmark und damit alle Blut bildenden Zellen des Patienten zerstört und entweder durch eigene zuvor gewonnene Blutstammzellen (autologe Transplantation) oder durch körperfremde Blutstammzellen (allogene Transplantation) ersetzt. Eine allogene Transplantation kann jedoch nur bei HLA-Identität bzw. -Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger durchgeführt werden. Allerdings besteht auch dann noch die Gefahr des Auftretens einer sog. Graft-versus-Host-Reaktion (*graft-versus-host disease*, GvHD), bei der Spender-T-Lymphozyten die Zellen des Empfängers mit potentiell letalem Ausgang angreifen (Ferrara und Deeg, 1991). Dabei sind am häufigsten die Haut, der Gastrointestinaltrakt und die Leber von der GvHD betroffen. Als weitere Faktoren, die den klinischen Verlauf der KMT/PBSCT beeinflussen, spielen die Art und das Stadium der Erkrankung, der CMV-Status sowie das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation eine Rolle (Bensinger et al., 2001).

Die Stärke der GvH Reaktion wird in Schweregrade von 0 bis IV eingeteilt, wobei Grad II bis IV als klinisch relevante GvHD bezeichnet wird. Zusätzlich wird zwischen akuter GvHD (aGvHD) bei

Auftreten innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation und chronischer GvHD (> 100 d nach TX) unterschieden.

Werden durch T-Zell Depletion die Spender-T-Lymphozyten aus dem Transplantat entfernt, vermindert sich das Risiko einer GvHD. Allerdings erhöht sich somit auch die Rezidivrate, da ein sog. Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL-Effekt) durch alloreaktive T-Lymphozyten des Spenders gegen die leukämischen Zellen des Patienten ausbleibt (Horowitz et al., 1990; Marmont et al., 1991; Elmaagacli et al., 1999; Beelen et al., 2000).

1.3 minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHag)

Die Beschreibung erster minor Histokompatibilitäts-Antigene in Mäusen erfolgte bereits vor ca. 50 Jahren. Damals konnten außerhalb des MHC liegende Gene mit der Abstoßung allogener Transplantate, insbesondere der Haut, in Verbindung gebracht werden (Snell GD, 1948; Counce et al., 1956).

Jahrzehnte später zeigten klinische und experimentelle Daten, dass bei Patienten nach allogener HSCT trotz genotypischer HLA-Identität des Spenders in 20-40% der Fälle eine Graft-versus-Host Reaktion auftreten kann (Beatty und Hervé, 1990; Bortin et al., 1991). Bei HLA-Identität zwischen Spender und Empfänger verbleibt somit die Aminosäuresequenz-Variation in den präsentierten Peptiden als allogene Differenz (vgl. Abb. 2), weshalb die allelischen Ausprägungen dieser Peptide als minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHag) bezeichnet werden. Dieser mHag-Polymorphismus ist nach neueren Daten mit der Auslösung einer akuten GvH-Reaktion assoziiert (den Haan et al., 1995). Erfolgt eine isogene Blutstammzell-Transplantation, entwickelt der Patient keine aGvHD, da neben der HLA-Identität auch keine mHag-Differenzen vorliegen, die eine T-Zell-Antwort erzeugen könnten.

1976 wurden erstmals spezifische zytotoxische T-Lymphozyten gegen das auf dem Y-Chromosom kartierende mHag H-Y in Patienten nach HLA-identischer allogener KMT nachgewiesen (Goulmy et al., 1976). Spätere Arbeiten beschreiben weitere auch autosomal lokalisierte mHag mit unterschiedlicher Immundominanz (Irle et al., 1985; Goulmy E, 1988; van Els et al., 1990).

Die Anzahl und biologische Relevanz von humanen mHag für die allogene Blutstammzell-Transplantation sind bislang unbekannt; allerdings sind einige mHag auf molekularer Ebene bereits charakterisiert und mit einer vorläufigen Nomenklatur belegt (Tab. 1).

Bei dem mHag HA-1 handelt es sich um ein diallelisches Peptid, das durch zwei Exons auf Chromosom 19p kodiert wird (Abb. 3) und einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin aufweist (Tseng et al., 1998; Wilke et al., 1998). Dieser HA-1 H/R Polymorphismus wurde durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten charakterisiert, die das HA-1-Peptid präsentiert durch HLA-A*0201 erkennen. HA-1 wird als ein *major* mHag mit hoher Immundominanz gegenüber anderen mHag bezeichnet (Goulmy E, 1997). Minor Histokompatibilitäts-Antigene mit unterschiedlicher Immundominanz wurden kürzlich auch bei Mäusen beschrieben (Choi et al., 2001, 2002).

HA-1 weist eine Allelfrequenz von 44% (HA-1 H) zu 56% für HA-1 R in der kaukasischen Bevölkerung auf und wird ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen exprimiert (de Bueger et al., 1992). Die zwei Allele werden durch zwei Basenaustausche in der HA-1 Sequenz codiert (TTGCG zu CTGCA), zu deren Detektion mit PCR-RFLP, PCR-SSP, RT-PCR, RSCA oder *Light-Cycler*-PCR unterschiedliche Methoden angewendet werden (Tseng et al., 1998; Wilke et al., 1998; Brossart et al., 1999; Aróstegui et al., 2000; Kreiter et al., 2000). Der HA-1 Genort, über den bisher nur Informationen in Form einer nicht näher definierten cDNA KIAA0223 verfügbar waren, wurde kürzlich als Locus von etwa 16 kb Größe und unterteilt in 23 Exons auf Chromosom 19p13.3 in enger Nachbarschaft mit dem Gen des Transportermoleküls ABCA7 genauer charakterisiert (Kaminski et al., 2000). Danach können die das HA-1 Peptid kodierenden Bereiche als Exon 2 und Exon 3 dem HA-1 Genort zugeordnet werden.

Mommaas et al. (2002) konnten kürzlich ein über HLA-B60 präsentiertes Peptid über spezifische zytotoxische T-Lymphozyten beschreiben. Somit gibt es Hinweise auf weitere immunogene Peptide, die vom HA-1 Genort exprimiert werden und als mHag wirken können.

CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1) wird vornehmlich auf Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten und auch auf einigen T-Zell-Untergruppen exprimiert (Kirschbaum et al., 1994). Besonders hoch ist die Moleküldichte an den interzellulären Verbindungen zwischen Endothelzellen. Als biologische Funktionen des Moleküls wurden bisher die Transendothel-Migration von Leukozyten, die Angiogenese und die Aktivierung von Integrinen beschrieben (Newman PJ, 1997). Allerdings ist die ursprüngliche Zuordnung von CD31 zu der Familie der Ig-CAMs (*Ig-like cell adhesion molecules*) aufgrund der Sequenzähnlichkeit der extrazellulären Immunoglobulin-Domänen mit denen anderer Adhäsionsmoleküle heute nicht mehr haltbar. Nach neueren Daten muss CD31 zu der Familie der Ig-ITIMs gezählt werden (Newman PJ, 1999), da hier eine höhere Übereinstimmung mit der Funktion des Moleküls, dem Vorkommen des ITIM-Motives (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) und der Genstruktur zu anderen Mitgliedern dieser Familie besteht (z. B. KIR, FcγRIIb oder CD22).

Die Funktion von CD31 als inhibierender Rezeptor scheint bedeutender gegenüber der Rolle, die das Molekül bei der Zelladhäsion spielt.

Für CD31, das auf Chromosom 17q23 kartiert (Gumina et al., 1996), sind in der japanischen Bevölkerung fünf Haplotypen beschrieben, die auf Dimorphismen in den Exons 3 (Codon 80 und 125), Exon 8 (Codon 563) und Exon 12 (Codon 670) beruhen (Abb. 3). Dabei wurde ein putatives Nonamer beschrieben, welches den AS-Austausch Arginin zu Glycin an Position 670 beinhaltet und von HLA-Molekülen des HLA-B44 Supertyps präsentiert werden kann (Maruya et al., 1998). Besonders für den Dimorphismus an Position Codon 125 in Exon 3 sind jedoch widersprüchliche Daten bezüglich einer erhöhten aGvHD bei HLA-identischen Spender/Empfängerpaaren nach KMT/PBSCT vorhanden (Behar et al., 1996; Maruya et al., 1998; Tseng et al., 1999; Murata et al., 2000; Balduini et al., 2001; Kögler et al., 2002).

mHag	Herkunft der Nonamere (Gen/Chromosom)	Funktion, Expression der Genprodukte	Präsentation durch HLA-
HA-1	KIAA0223 (Chr. 19p13.3)	?	A*0201
HA-2	MYO1G (Chr. 7p)	Klasse I Myosin	A*0201
HA-3	Lbc	Onkogen	A*0101
HA-4	?	?	A2
HA-5	?	?	A2
HA-8	KIAA0020 (Chr. 9)	?	A*0201
H-Y	SMCY/UTY/DFFRY/ DBY (Chr.Y)	Transkriptionsfaktor (SMCY)	A1,A2,B7,B8 DQ5
CD31	CD31 (Chr. 17q23)	Adhäsion, Signaltransduktion	B44-Supertyp ¹
CD62L	CD62L (Chr. 1q23-25)	L-Selektin	A3-Supertyp ²
HPA-5	CD49b (Chr. 5q31)	Adhäsion, Aggregation	A3-Supertyp ²

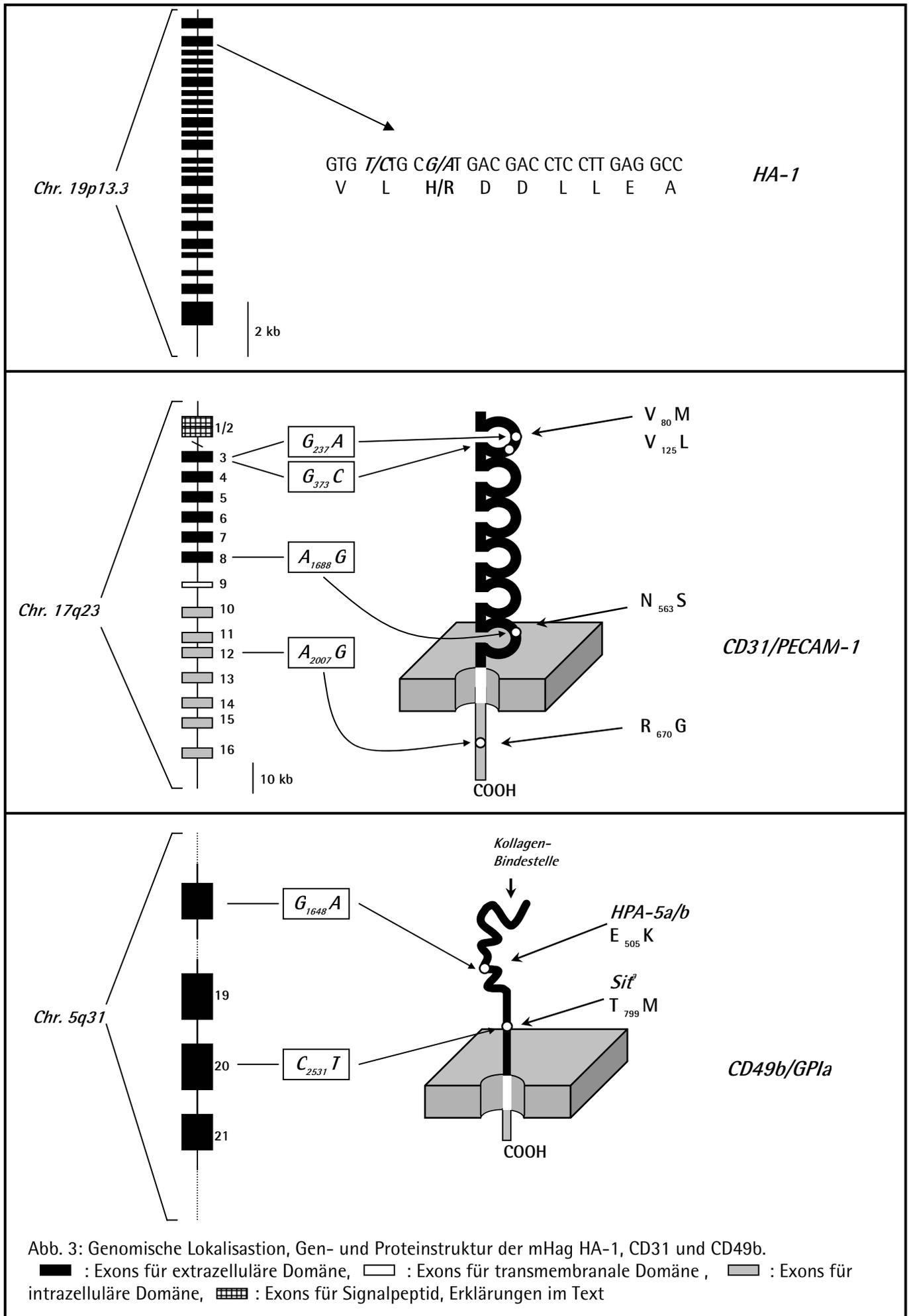
Tab. 1: Übersicht humaner minor Histokompatibilitäts-Antigene, HA-1 bis HA-5, H-Y (Goulmy et al., 1997; Pierce et al., 2001; Spierings et al., 2003); HA-8 (Brickner et al., 2001); SMCY (Wang et al., 1995); UTY (Warren et al., 2000); DFFRY (Vogt et al., 2000); DBY (Vogt et al., 2002); CD31, CD62L, CD49b (Maruya et al., 1998)

¹ HLA-B37, B41, B44, B45, B47, B49, B50, B60, B61; ² HLA-A3, A11, A31, A33, A*6801

Thrombozytenantigene (auch als Integrine bezeichnet) sind Glykoproteine, deren Hauptfunktion in der Adhäsion von Blutplättchen an der extrazellulären Matrix und der anschließenden Thrombozyten-Aggregation liegt (Kunicki und Newman, 1992). Daneben wirken die ca. 30 unterschiedlichen teilweise polymorphen Integrine auch als spezifische Immunorezeptoren. Mutationen in den Genen der Integrine wurden mit kardiovaskulären Erkrankungen und besonders mit der Thrombozytopenie assoziiert (Santoso et al, 1999; Bray PF, 2000; Santoso S, 2000, Kroll et al, 2000).

CD49b bildet zusammen mit CD29 den Komplex Glykoprotein Ia/IIa, der auch als $\alpha 2\beta 1$ -Integrin oder VLA-2 bezeichnet wird. Beide Untereinheiten sind in der Zellmembran verankerte Proteine, an deren extrazellulären Domänen Liganden binden, im Falle des CD49b Kollagen (Takada und Hemler, 1989). Für CD49b sind zwei Polymorphismen beschrieben, die zu Aminosäure-Austauschen an den AS-Positionen 505 (Glutaminsäure zu Lysin durch einen Basenaustausch G nach A an Nukleotid-Position 1648 in einem 144 bp großen Exon) und 799 (Threonin zu Methionin durch Basenaustausche an Nukleotid-Position 2531) führen (Abb. 3). Der Glu₅₀₅-Lys-Polymorphismus, der auch HPA-5 a/b oder Br^a/Br^b bezeichnet wird, kommt mit einer Häufigkeit von ca. 10% bei Kaukasiern vor (Santoro und Zuttler, 1995; Kroll et al., 2000). Der zweite Dimorphismus Thr₇₉₉-Met (oder auch Sit^a) ist mit einer Allelfrequenz von 0,25% dagegen selten (Santoso et al., 1999).

Neben weiteren stillen GPIa-Mutationen, die die Funktion des Moleküls oder seine Expressionsdichte auf der Zelloberfläche beeinflussen (Kunicki et al., 1997; Kritzik et al., 1998; Corral et al., 1999), konnte für den HPA-5 Polymorphismus eine verringerte Überlebensrate nach KMT oder eine erhöhte aGvHD-Rate bei Vorliegen eines *Mismatches* gezeigt werden (Juri et al., 1999; Rozman et al., 2003).



1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine molekulargenetische Analyse der minor Histokompatibilitäts-Antigene HA-1, CD31 und CD49b im Kontext der allogenen Blutstammzell-Transplantation (HSCT). Geplant wurde dazu, eine Korrelation zwischen mHag-Inkompatibilität und aGvHD-Inzidenz in einer homogenen Patientengruppe mit ihren HLA-identischen Geschwisterspendern (*identical sibling donor*, ISD) bzw. HLA-kompatiblen Fremdspendern (*matched unrelated donor*, MUD) zu untersuchen. Damit sollten erstmalig unter Anwendung einer einheitlichen PCR-SSP-Methodik mehrere mHag gemeinsam an einer klar definierten Patientenkohorte untersucht werden, da bisher publizierte Daten widersprüchliche Ergebnisse unter unterschiedlichen Studienbedingungen gezeigt haben. In Kooperation mit der Klinik für Knochenmarktransplantation (Universitätsklinikum Essen, Direktor: Prof. Dr. U. W. Schaefer) sollten retrospektiv in den Jahren 1993 bis heute an CML in erster chronischer Phase erkrankte und transplantierte Patienten für die mHag HA-1, CD31 und CD49b molekulargenetisch charakterisiert und mit der Inzidenz bzw. dem Schweregrad der aGvH-Reaktion korreliert werden.

Weiterhin wurde in einem populationsgenetischen Ansatz geplant, durch die Analyse von Normalpersonen (n=200) eine Aussage über die Verteilung der unterschiedlichen Dimorphismen von HA-1, CD31 und CD49b in der kaukasischen Bevölkerung zu machen, da bisher für CD31 (Kodons 80, 563 und 670) nur Daten aus der japanischen Bevölkerung publiziert sind. Ergänzt und validiert sollten diese Untersuchungen durch Segregationsanalyse der mHag-Allele in Familien, die am Institut für Immunologie als EBV-transformierte Zelllinien oder in Form von isolierter DNA vorhanden sind.

Abschließend war geplant, die genetische Herkunft des mHag HA-1, über die bisher wenig Informationen vorlagen, durch eine entsprechende Sequenzierungsstrategie weiter aufzuklären und die aus der Sequenz der cDNA KIAA0223 abgeleitete Proteinabfolge in diese Analysen mit einzubeziehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Zur Etablierung der PCR-SSP-Testung der CD31-Polymorphismen wurden in dieser Arbeit zwei EBV transformierte Zelllinien (JSS und SJ) zur Hilfe genommen, die freundlicherweise von Prof. C. Grumet (Stanford University, Palo Alto, CA, USA) zu Verfügung gestellt wurden. Sie wiesen folgende Merkmale auf:

JSS: CD31 Kodon 125 „G“ homozygot, HLA-A2,11; HLA-B37,50; Bw4, Bw6

SJ: CD31 Kodon 125 „C“ homozygot, HLA-A3,25; HLA-B7,18; Bw4, Bw6

Zur Segregationsanalyse der untersuchten mHag-Allele wurden im IFI als LCLs angelegte ECBR-Familien verwendet, ergänzt durch Familien aus der Familienspendersuche (ECBR: *European Collection for Biomedical Research*).

2.1.2 Patienten

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 163 Patienten vor HSCT mit ihren HLA-identischen Geschwisterspendern (ISD) bzw. HLA-A, B, C, DR und DQ kompatiblen Fremdspendern (MUD) auf ihre HA-1, CD31 und CD49b Genotypen untersucht. Die Patientenkohorte wurde nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Erkrankung der Patienten: Chronische myeloische Leukämie in erster chronischer Phase
- identische myeloablative Konditionierung (TBI mit 4x 2.5 Gy + Endoxan-Gabe)
- allogene KMT oder PBSCT zwischen 1992 und 2000 (minimaler follow up > 3 Monate)
- Gabe von Methotrexat und Cyclosporin A zur GvHD-Prophylaxe

Die HLA-Testung von Patienten und deren ISD erfolgte serologisch bzw. molekulargenetisch niedrig auflösend für HLA Klasse I (HLA-A und -B) und molekulargenetisch hoch auflösend für Klasse II (HLA-DRB1 und -DQB1). Patienten und ihre MUD wurden ausschließlich molekulargenetisch HLA-A, -B und -C niedrig auflösend sowie HLA-DRB1 und -DQB1 hoch auflösend HLA getestet.

Zusätzlich wurden 201 Normalpersonen (IFI) und 20 Familien mit insgesamt 119 Familienmitgliedern zur Segregationsanalyse auf ihre mHag-Verteilung getestet.

2.1.3 DNA-Sequenzen

Quelle aller zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten Sequenzen ist die DNA Sequenz-Datenbank GenBank des NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, Bethesda, MD, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), erreichbar über den *Entrez Nucleotide Browser* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

Die folgende Tabelle 2 zeigt alle Sequenzen mit ihren zugehörigen Nummern (*Accession numbers*):

Accession Nr.	Genort	Chr.	Beschreibung	Variante
L34637	CD31	Chr. 17	Humanes CD31/PECAM-1 Exon 3 und 4 mit umgebenden Intron-Sequenzen	
L34640	CD31	Chr. 17	Humanes CD31/PECAM-1 Exon 7, 8 und 9 mit umgebenden Intron-Sequenzen	
L34944	CD31	Chr. 17	Humanes CD31/PECAM-1 Exon 12 mit umgebender Intron-Sequenz	
AC004151		Chr. 19	Cosmid R28738, 35 kb, Chr. 19p13.3,	
AF079488	HA-1	Chr. 19	HA-1 Gen, 553 bp Intron Sequenz	
AF092537	HA-1	Chr. 19	HA-1 Gen, 74 bp Exon Sequenz, 377 bp Intron Sequenz	
D86976	HA-1	Chr. 19	mRNA Sequenz von cDNA KIAA0223, 3.500 bp einer myeloblasten Zelllinie	
S72155	CD49b	Chr. 5	GPIa, 144 bp Exon mit Br/HPA5 Polymorphismus A zu G, Var. G	HPA5a
S72131	CD49b	Chr. 5	GPIa, 144 bp Exon mit Br/HPA5 Polymorphismus A zu G, Var. A	HPA5b
Z97370	HLA-A	Chr. 6	HLA-A Gen, komplette Sequenz	IC-1 / IC-2
M13438	HGH		<i>Human Growth Hormone</i> , komplette Sequenz	HGH-1 / HGH-2

Tab. 2: Verwendete DNA-Sequenzen

2.1.4 Oligodesoxynukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide (im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Primer bezeichnet) zur Testung der mHag mittels PCR-SSP (Tab. 3) und zur mHag-Sequenzierung (Tab. 4) sowie die Primer der internen Kontrollen (Tab. 5) wurden bei unterschiedlichen Firmen bezogen:

- Sigma-Genosys Ltd, Cambs, UK
- Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
- Eurogentec Deutschland GmbH, Köln

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße (bp)	Annealing-Temp. (°C)	Funktion
<i>CD31e8a</i>	TTT GCT CAG TGT GAA TCC T	550 bp	54°C	gen. 5'-Primer
<i>CD31e8a4</i>	ATT GGA ACG ATG TGA CAT TCT C		62°C	gen. 3'-Primer
<i>CD31e8a7x</i>	CY 5.0-CTG TGA ATG AAG GAT CTG TGC		62°C	5'-Sequenz.-Pr.
<i>CD31e8a3x</i>	CY 5.0-TTC AGT CAC ATA AGC TAG ACT C		62°C	3'-Sequenz.-Pr.
<i>CD31e12a4</i>	ACA CTA GAT AGC ATC TCT GGT	361 bp	60°C	gen. 5'-Primer
<i>CD31e12a8</i>	AGT GCT GGT TGT CAC TAC AC		60°C	gen. 3'-Primer
<i>CD31e12a1</i>	ACA CTA GAT AGC ATC TCT GGT	521 bp	60°C	gen. 5'-Primer
<i>CD31e12a4</i>	AAG AAA CTA TAT TCA GGC CAG		60°C	gen. 3'-Primer
<i>CD31e12a1x</i>	CY 5.0-CAC TGA ATA AAT CAG GCT TGA C		62°C	5'-Sequenz.-Pr.
<i>CD31e12a3x</i>	CY 5.0-AAT TAT CCA CAG TCC TTC AAG		58°C	3'-Sequenz.-Pr.
<i>HA-1 P8</i>	TCA TCG AGA CTC TCA TCG TCC	2.552 bp	64°C	gen. 5'-Primer
<i>HA-1 P11</i>	GCC TCC AGC TGC TCC TCA C		64°C	gen. 3'-Primer
<i>HA-1 P13Seq</i>	CY 5.0-CTT GGC CTC CTG AAG TGC TG		64°C	5'-Sequenz.-Pr.
<i>HA-1 P18Seq</i>	CY 5.0-TGA ATG AGT AGC TCA TAG GTG		60°C	3'-Sequenz.-Pr.
<i>HA-1 P19</i>	GAC CAT CAG ATC TTG TGA AAC C	1.048 bp	64°C	gen. 5'-Primer
<i>HA-1 P22</i>	CAT CCA CAC AGC CCT GTG G		62°C	gen. 3'-Primer

Tab. 4: Verwendete Primer zur mHag-Sequenzierung (in 5'→ 3'-Richtung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Fragment- größe (bp)	Annealing- Temp. (°C)	Funktion
<i>CD31e3a</i>	GGA CTC AAT ACT GCA TAG GAT G	282 bp	68°C	5'-Primer
<i>CD31e3b</i>	GAG GAG ATG TTG TAA AAC AGC AT		64°C	3'-SSP
<i>CD31e3c</i>	AGG AGA TGT TGT AAA ACA GCA C	282 bp	62°C	3'-SSP
<i>CD31e3d</i>	GAC TCA CCT TCC ACC AAC AC	414 bp	64°C	3'-SSP
<i>CD31e3e</i>	GAC TCA CCT TCC ACC AAC AG	414 bp	64°C	3'-SSP
<i>CD31e8a2</i>	GCC TGG AGG ACA TTA CTC TC	249 bp	62°C	3'-Primer
<i>CD31e8b1</i>	TTG GAC CAA GCA GAA GGC TAA		62°C	5'-SSP
<i>CD31e8c1</i>	TGG ACC AAG CAG AAG GCT AG	248 bp	62°C	5'-SSP
<i>CD31e12a4</i>	ACA CTA GAT AGC ATC TCT GGT	238 bp	60°C	3'-Primer
<i>CD31e12b2</i>	TAG GTC ACA ATG ACG ATG TCA		60°C	5'-SSP
<i>CD31e12c2</i>	AGG TCA CAA TGA CGA TGT CG	238 bp	60°C	5'-SSP
<i>HPA5</i>	AAA ATG GCA GTA CAC TAT ACA TTC A	254 bp	66°C	5'-Primer
<i>HPA5a</i>	GAA GAG TCT ACC TGT TTA CTA TCA AAG		74°C	3'-SSP
<i>HPA5b</i>	GAA GAG TCT ACC TGT TTA CTA TCA AAA	254 bp	72°C	3'-SSP
<i>HPArev</i>	ATT GGC TCC TAT TTT GGT AGT G	178 bp	62°C	3'-Primer
<i>HPAreva</i>	ATT AGT TTA TTT TTT TTT TTT TAC CTC		60°C	5'-SSP
<i>HPArevb</i>	TAT TAG TTT ATT TTT TTT TTT TTA CCT T	179 bp	60°C	5'-SSP
<i>HPASit</i>	GTG GTG AGG ATG GAC TTT GC	630 bp	62°C	gen. 5'-Primer
<i>HPASitrev</i>	TAC CGG TAG GGA GAA TGA TGC		64°C	gen. 3'-Primer
<i>HA-1 P1</i>	GTG CTG CCT CCT GGA CAC TG	190 bp	66°C	5'-Primer
<i>HA-1 P2</i>	TGG CTC TCA CCG TCA TGC AG		64°C	3'-SSP
<i>HA-1 P3</i>	TGG CTC TCA CCG TCA CGC AA	190 bp	64°C	3'-SSP
<i>HA-1 P4</i>	GCA TTC TCT GTT TCC GTG TT	351 bp	58°C	3'-Primer
<i>HA-1 P5</i>	CTT AAG GAG TGT GTG CTG CA		60°C	5'-SSP
<i>HA-1 P6</i>	CTT AAG GAG TGT GTG TTG CG	351 bp	60°C	5'-SSP

Tab. 3: Verwendete Primer zur mHag-Testung (in 5'→3'-Richtung)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße (bp)	Annealing-Temp. (°C)	Herkunft
IC-1	CTC CCG GGC TGG CCT CCC ACA	120 bp	74°C	HLA-A Intron
IC-2	GAG CAG GGC CGA ACC TCA GA		66°C	"
HGH-1	GCC TTC CCA ACC ATT CCC TT	425 bp	62°C	HGH
HGH-2	TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C		62°C	"

Tab. 5: Verwendete Primer für interne Kontrollen (in 5'→3'-Richtung)

Für PCR und Sequenzierung verwendete Geräte:

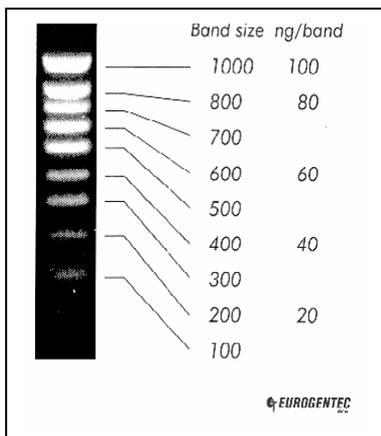
- PTC-200 / PTC-100 Thermal Cycler, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA
- MicroGene Clipper / UV Gel Polymerizer / OpenGene Software, Visible Genetics, Toronto, Ontario, Canada

2.1.5 DNA-Fragmentlängenmarker

SmartLadder SF

100bp

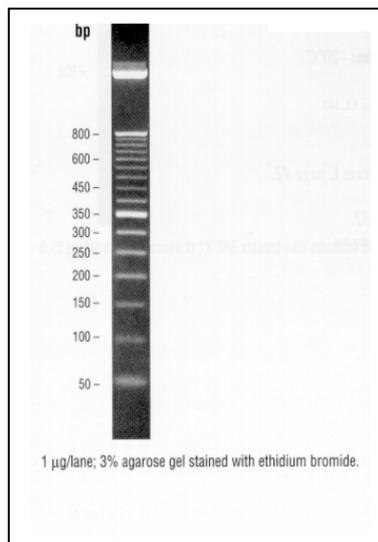
(Eurogentec; MW-1800-02)



DNA ladder

50 bp

(Gibco BRL, 10416-014)



pGEM DNA Marker

(Promega, G1741)

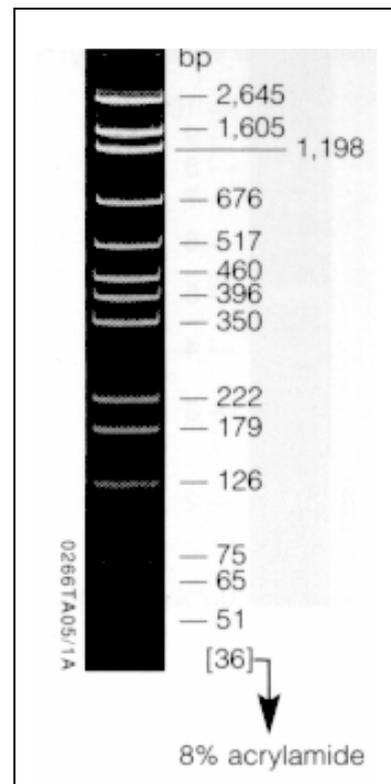


Abb. 4: Verwendete DNA-Fragmentlängenmarker

Die verwendeten DNA-Fragmentlängenmarker (Abb. 4) unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung anhand der unterschiedlich großen DNA-Fragmente. Daher kann je nach zu erwartender Größe der auf das Gel aufgetragenen Probe der geeignete Marker verwendet werden.

2.1.6 Enzyme und Chemikalien

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden unterschiedliche Enzyme verwendet (Tab. 6).

Enzym	Erkennungssequenz	Vertrieb
Restriktionsenzym <i>Mae</i> III	5'- • GTNAC-3'	Roche, Mannheim
Qiagen Proteinase K		QIAGEN, Hilden
<i>Taq</i> DNA-Polymerase		Gibco BRL Life Technologies , Karlsruhe QIAGEN, Hilden
ThermoSequenase [®]		Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA Visible Genetics, Toronto, Ontario, Canada

Tab. 6: Verwendete Enzyme, N= A,T,G,C, •= Ort der Hydrolyse

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden mit Ausnahme der gesondert aufgeführten von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim) und GibcoBRL (Karlsruhe) bezogen.

2.1.7 Verwendete kommerziell erhältliche Komplettsysteme (*Kits*)

Sequenzierkits

Für die in der Arbeit durchgeführten Sequenzierreaktionen wurden zwei unterschiedliche Sequenzier-Kits verwendet:

- 1) Thermo Sequenase[®] Primer Cycle Sequencing Kit (25-2438-01, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)
- 2) HLA Class I A locus GeneKit (VG30101, Visible Genetics, Toronto, Ontario, Canada)

Aufreinigung von PCR-Produkten

QIAquick PCR Purification Kit (50) (Qiagen, Hilden, Kat. Nr. 28104)

DNA-Isolation aus Vollblut bzw. LCLs

QIAamp Blood Kit (50) (Qiagen, Hilden, Kat. Nr. 29104)

QIAamp Blood Midi Kit (100) (Qiagen, Hilden, Kat. Nr. 51185)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von humanen lymphoblastoiden Zelllinien (LCL)

Im Institut für Immunologie werden KMT/PBSCT-Patienten und deren Spender sowie die Mitglieder rekombinanter Familien in Form von LCLs in Kultur genommen und anschließend als Zelllinie in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wird wie folgt vorgegangen:

Periphere Blut-Lymphozyten werden in einer Konzentration von 2×10^6 pro 0,4 ml Medium aufgenommen und mit 1 ml eines Epstein-Barr-Viren enthaltenden Kulturüberstandes versetzt und anschließend für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 1 ml frisches Medium, das 4 µg Cyclosporin A (hemmt das Wachstum der T-Zellen) und 16% FCS (*fetal calf serum*) enthält, für eine Inkubationsdauer von 6 Tagen zum Kulturansatz gegeben. Dann muss dieser Schritt mit einer Konzentration von 2 µg Cyclosporin einmal wiederholt werden. Danach werden die Zellen nach Bedarf mit Normalmedium gefüttert und in Aliquots von 10^6 Zellen eingefroren.

Für die vorliegende Arbeit wurden LCLs von Familien zur Segregationsanalyse sowie von KMT/PBSCT-Patienten und deren Spendern für die mHag-Testung verwendet.

Standard-Medium: RPMI 1640 Medium (enthält 25 mM HEPES Puffer und L-Glutamin)

2.2.2 DNA-Präparationsmethoden

Zur DNA-Präparation wurden Verfahren ausgewählt, die einen hohen Reinheitsgrad bei relativ hoher Ausbeute und schneller Durchführbarkeit ermöglichen. Diese Bedingungen erfüllten kommerziell erhältliche Kits unter Anwendung leicht modifizierter Protokolle. Die DNA-Isolation erfolgte mit Hilfe einer in Säulen lokalisierten Matrix, deren DNA-Affinität pH abhängig reguliert werden kann. Gesundheitsschädliche Phenol-Chloroform-Extraktionen finden bei derartigen Verfahren keine Anwendung mehr. Dabei bindet die geladene Matrix in den Säulen die DNA, Proteine jedoch können leicht abgewaschen werden. Je nach Größe der zu präparierenden Probe oder nach zu erwartender DNA-Menge können unterschiedlich große Säulen verwendet werden.

Für maximale DNA-Ausbeute bot sich die Zentrifugation der Blutprobe (im 10 ml Probenröhrchen) bei 2.000 UPM ($900 \times g$) für 20 min in der Standzentrifuge (Varifuge ST, Heraeus Sepatech, Osterode) an. Nach ungebremstem Auslaufen der Zentrifuge bildet sich eine Schichtung im Probenröhrchen, dabei enthält die mittlere Schicht die kernhaltigen Leukozyten (*buffy coat*) ober-

halb der Erythrozythenschicht und unterhalb des Blutplasmas. Mit der Pipette wurde der *buffy coat* entnommen und zur DNA-Isolation eingesetzt.

2.2.2.1 DNA-Präparation aus Blut/LCLs (QIAGEN)

Zur Präparation von DNA aus kleineren Blutmengen oder LCLs erschien die Verwendung eines QIAamp Blood Kits (QIAGEN, Hilden) geeignet.

Bevor aus flüssigem Stickstoff entnommene LCLs präpariert werden konnten, mussten die Zellen von ihrem Medium befreit werden. Dazu wurde die Probe in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei 8.000 UPM (6.000 x g) in der Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C) bei RT abzentrifugiert. Anschließend waren die Zellen mindestens viermal in isotonischer Kochsalz-Lösung zu resuspendieren und jeweils abzuzentrifugieren. Abschließend erfolgte die Resuspension der Lymphozyten in 200 µl PBS. So konnten sie wie die entsprechende Menge Vollblut präpariert werden. Zu 200 µl Ausgangsvolumen (Vollblut oder Lymphozyten-Suspension, max. 10^7 Zellen) pipettierte man 25 µl QIAGEN Protease Stammlösung, vortexte und gab anschließend 200 µl Puffer AL dazu. Nach erneutem Vortexen und einer Inkubation von 10 min bei 70°C im Wasserbad wurden 210 µl 100% Ethanol hinzu gegeben und die Probe gemischt. Anschließend wurde die Probe auf die Säule aufgetragen, die sich in einem Sammelgefäß befand, und bei 8.000 UPM (6.000 x g) für eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, bevor zweimal nacheinander 500 µl Puffer AW auf die Säule gegeben wurden und eine Zentrifugation bei 8.000 UPM (1 min) erfolgte. Dabei war das Sammelgefäß jeweils zu verwerfen. Nach abschließender Zentrifugation bei 13.000 UPM (3 min) verblieb die geöffnete Säule ca. 5 min bei RT, damit keine Ethanol-Rückstände auf der Säule zurückbleiben. Die Elution der DNA-Lösung erfolgte abschließend nach Zugabe von 100 - 200 µl auf 70°C erhitztem bidestilliertem Wasser und einer Wartezeit von 5 min durch Zentrifugation bei 13.000 UPM (3 min).

Mit dieser Methode wurden, je nach Ausgangsmaterial, in etwa 5 - 8 µg reine DNA erhalten (Konzentration ca. 50 ng/µl).

isotonische Kochsalzlösung: 0,15 M NaCl

PBS-Puffer: 1 l enthält 8,67 g NaCl, 1,15 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4

2.2.2.2 DNA-Präparation aus Blut (QIAamp Midi Kit)

Zur Präparation von DNA aus größeren Blutmengen bot sich die Verwendung eines QIAamp Blood Midi Kits (QIAGEN) an. Alle Zentrifugationsschritte wurden ebenfalls bei RT in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Biofuge 17, Heraeus Sepatech, Osterode) und Aufnahme für 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Greiner) durchgeführt.

Das Ausgangsvolumen (Vollblut oder Lymphozyten-Suspension, max 10^7 Zellen pro ml) betrug bei dieser Methode 2 ml. Dazu pipettierte man 200 μ l QIAGEN Protease Stammlösung, vortexte und gab anschließend 2,4 ml Puffer AL dazu. Nach erneutem Vortexen und einer Inkubation von 10 min bei 70°C im Wasserbad wurden 2 ml 100% Ethanol zugegeben und die Probe gemischt. Danach wurde die Probe Portionsweise (jeweils max. 2,5 ml) auf die Säule gegeben und jeweils bei 3.000 UPM (1.850 x g) für 2 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde anschließend jeweils verworfen, bevor 2 ml Puffer AW1 auf die Säule gegeben wurden und eine Zentrifugation bei 5.000 UPM (3.000 x g, 1 min) erfolgte. Nach Verwerfen des Filtrats platzierte man die Säule zurück in das Zentrifugenröhrchen und spülte durch Zugabe von 2 ml Puffer AW2 und 15 min Zentrifugation bei 5.000 UPM. Anschließend verblieb die geöffnete Säule ca. 5 min bei RT, damit keine Ethanol-Rückstände auf der Säule zurückbleiben und eventuell anschließende PCR-Ansätze kontaminieren konnten. Die Elution der DNA-Lösung erfolgte abschließend nach Zugabe von 300 μ l auf 70°C erhitztem bidestiliertem Wasser und einer Wartezeit von 5 min durch Zentrifugation bei 5.000 UPM (5 min).

Mit dieser Methode wurden aus Vollblut maximal 100 μ g reine DNA erhalten.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde im Spektralphotometer (Gene Quant, Pharmacia, LBK Biochrome, England) bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm gemessen. Dabei absorbiert die DNA Licht der Wellenlänge 260 nm, die Messung bei 280 nm dient der Kontrolle des Reinheitsgrades, da bei dieser Wellenlänge Proteine ihr Absorptionsmaximum haben. Der Wert E_{280} sollte möglichst unter der Hälfte des Wertes E_{260} liegen, der Quotient aus beiden Messwerten gibt den Reinheitsgrad der Präparation an (die *Ratio*).

Eine direkte Messung der Konzentration ohne Verdünnung der Probe erfolgte in einer Spezialküvette, deren maximales Volumen 10 μ l entspricht.

2.2.4 Restriktionsspaltung von DNA

Für die Analyse des *Sit^a*-Polymorphismus im CD49b-Gen wurde ein RFLP Verfahren angewendet (Botstein et al., 1980). Der Verdau des generischen DNA-Amplifikates mit dem Enzym *Mae* III erfolgte dazu in einem Volumen von 20 µl in 200 µl Reaktionsgefäßen. Restriktionsenzyme sind in einem glycerinhaltigen Puffer gelagert, daher sollte ihr Anteil 10% der Gesamtansatzmenge nicht überschreiten. Hinzugefügt wurde ein 5x-Reaktionspuffer, der speziell auf das Enzym *Mae* III abgestimmte Reaktionsbedingungen schafft.

Zusammensetzung der Spaltungsansätze:

	eingesetzte Menge
generisches Amplifikat	5 µl
2 x Reaktionspuffer	10 µl
Enzym <i>Mae</i> III	1 µl (1,5 U)
bidestilliertes Wasser	4 µl
	20 µl
	→ mit Öl überdecken
	→ Inkubation ü.N. bei 55°C

2.2.5 Aufreinigung von DNA

Ethanol-Fällung:

Wurde eine höhere DNA-Konzentration benötigt als verfügbar, konnte eine Ethanol-Fällung durchgeführt werden. Dazu wurden zu der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3M NaAc pH 5.2 und 2,5x Volumen 100% Ethanol gegeben, kurz invertiert und ü. N. bei -20°C die DNA ausgefällt. Anschließend zentrifugierte man 15 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und abschließend das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen sowie unter dem Abzug getrocknet. Alternativ konnte auch eine Trocknung bei 37°C erfolgen. Die Resuspension der DNA erfolgte schließlich in max. 10-50 µl bidestilliertem Wasser.

Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen (QIAGEN):

Nachfolgende Sequenzierreaktionen eines generischen PCR-Produktes machten eine Aufreinigung notwendig, bei der überschüssige Primer, Nukleotide, *Taq*-Polymerase und Salze aus dem

Ansatz entfernt wurden. Dazu bot sich die Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) an. Eventuell vorhandenes Öl auf dem PCR-Ansatz musste dabei nicht entfernt werden.

Zunächst gab man das fünffache Volumen an Puffer PB im Verhältnis zum Ausgangsvolumen der Probe zu dieser hinzu, mischte gut und lud die Probe auf eine in einem Sammelgefäß platzierte QIAquick Säule. Nach einem Zentrifugationsschritt in der Tischzentrifuge bei 13.000 UPM (10.000 x g) für 1 min wurde das Filtrat verworfen und 750 µl Puffer PE auf die Säule pipettiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 UPM für 1 min, bevor anschließend eventuelle Ethanolrückstände durch Zentrifugation (13.000 UPM, 2 min) der Säule in einem leeren Sammelgefäß entfernt wurden. Die Elution der DNA-Lösung in ein sauberes Sammelgefäß erfolgte nach Zugabe von 30 - 50 µl auf 70°C erhitztem bidestilliertem Wasser und einer Wartezeit von 5 min durch erneute Zentrifugation bei 13.000 UPM (2 min).

Abschließend wurde die Konzentration der eluierten DNA gemessen.

2.2.6 Gelelektrophorese

2.2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen und sie nach Färbung sichtbar zu machen (nach Sambrook et al., 1989).

Das Verfahren beruht auf der Eigenschaft der DNA, die aufgrund ihrer Phosphodiester-Brücken eine vornehmlich negative Ladung trägt, in einem elektrischen Gleichspannungsfeld von Kathode in Richtung der Anode zu wandern. Erfolgt diese Wanderung in einer Gelmatrix, so trennen sich verschiedene Fragmentgrößen wegen der größenabhängigen unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten in der Matrix auf.

Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose (GibcoBRL; Biozym) in 0,5 x TBE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Daraufhin übertrug man die erhitzte Agarose in die zuvor vorbereiteten Gelträger. Die in Gel-Ladepuffer aufgenommene DNA wurde in die Taschen des erkalteten und verfestigten Gels mit einem DNA-Fragment Marker (2.1.5) aufgetragen, nachdem die Kämme entfernt und das Gel in eine mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Laufkammer eingelegt worden ist. PCR-Ansätze, die den Farbstoff Cresol-Red bereits enthielten, konnten ohne eine weitere Zugabe eines Gel-Ladepuffers auf das Gel aufgetragen werden. Zur Beschleunigung des Verfahrens erfolgte die Färbung des Gels automatisch während des Gellaufs durch bereits der Agarose zugefügtes Ethidium Bromid (EtBr). Dabei interkaliert das EtBr in die

DNA und kann dort als Fluoreszenz-Farbstoff durch UV-Licht (302 nm) angeregt auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte abschließend mit Kamera und Fotodrucker.

Je nach Größe der Fragmente wurden unterschiedliche Gelkonzentrationen und Spannungen verwendet (Tab. 7).

Konzentration (w/v Agarose)	auftrennbare Fragmente (bp)	Spannung (V)	Laufzeit
0,8%	500 - 10.000	200	45 min
1,0%	500 - 2.000	250	30 - 45 min
2,0%	100 - 1.000	250 - 280	20 min

Tab. 7: Laufbedingungen der Agarose-Gele

10 x TBE-Puffer: 0,98 M TrisCl pH 8.0, 0,98 M Borsäure, 200 mM EDTA pH 8.7

Gel-Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau, 15% Ficoll, 10 mM EDTA

oder alternativ 30% Glycerin in bidest. H₂O mit 250 mg/100 ml Xylen Cyanol

2.2.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamid-Gele sind etwas aufwändiger herzustellen als die in der Handhabung unkomplizierten Agarose-Gele. Erstere bieten allerdings einige Vorteile: Zunächst ist das Auflösungsvermögen der PAGE hoch, was eine Unterscheidung von 0,2% in der Länge der aufgetrennten DNA Molekülen ermöglicht (1 bp bei 500 bp Länge). Weiterhin können auch große DNA-Mengen problemlos ohne ein Auftreten von Unschärfen sauber aufgetrennt werden.

Für die Auftrennung von DNA werden nicht denaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet (nach Sambrook et al., 1989). Allerdings muss beachtet werden, dass doppelsträngige DNA aufgrund von Schleifenbildung ein von ihrer Basenzusammensetzung abhängiges Laufverhalten zeigt. Dabei können die Laufgeschwindigkeiten von DNA-Fragmenten gleicher Länge bis zu 10% differieren (Tab. 8).

Deshalb werden für die Auftrennung einzelsträngiger DNA aus Sequenzierreaktionen auch denaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet, die durch Zugabe eines denaturierenden Reagents (Urea oder Formamid) die Bildung von Basenpaarungen verhindern.

Konzentration (w/v Acrylamid)	auftrennbare Fragmente (bp)	Xylene Cyanol ³	Bromphenol Blau ⁴
5,0%	80 – 1.000	260	65
8,0%	60 – 400	160	45
12,0%	40 – 200	70	20

Tab. 8: Laufbedingungen für PAGE, ^{3,4} Die Zahlen geben die ungefähre Größe (in bp) von Fragmenten doppelsträngiger DNA an, mit denen der Marker-Farbstoff komigriert.

Für die Auftrennung doppelsträngiger DNA wurde eine vertikal angeordnete Laufkammer (V16, BRL, Neu Isenburg) verwendet, die Gele von etwa 20 x 20 cm Größe aufnehmen kann. Alle für die Präparation des Gels notwendigen Utensilien (*Spacer*, Glasplatten und Kamm) mussten vor Benutzung sorgfältig mit EtOH gereinigt werden, da Verschmutzungen sowie mögliche Sauerstoffzufuhr durch Undichtigkeiten ein Auspolymerisieren des Acrylamids inhibieren. Anschließend wurde mit Hilfe von Klammern die Apparatur zusammengesetzt und mit flüssiger Agarose (1% w/v) an den Ecken abgedichtet.

Bei Anwesenheit freier Radikale, welche durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat und stabilisiert durch die Zugabe von TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamid) in der Lösung zur Verfügung stehen, bildet Acrylamid lange Ketten von Polyacrylamid. Die Polyacrylamid-Ketten werden durch Zugabe des *cross-linkers* Bisacrylamid miteinander verknüpft.

Je nach Verwendungszweck wurden unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid-Lösungen hergestellt, die 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) direkt vor Gebrauch frisch angesetzt (Tab. 9).

Reagentien	Polyacrylamid-Konzentration		
	5%	8%	12%
30% Acrylamid-Lsg.	4,15	6,7	10
2% Bisacrylamid-Lsg.	2,08	3,35	5
10 x TBE	2,5	2,5	2,5
10% APS	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,01	0,01	0,01
bidestilliertes Wasser	16,06	12,25	7,3
	25	25	25

Tab. 9: Mengenangaben für die Herstellung von Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Konzentrationen (in ml)

Die gut gemischte Polyacrylamid-Lösung wurde luftblasenfrei in die Apparatur gegossen, der Kamm eingesetzt und das Gel ca. 60 min bei RT zur Polymerisation stehengelassen.

Anschließend erfolgte das Einspannen des Gels nach Entfernen der unteren Abdichtung (*Spacer*) in die Laufkammer und die Abdichtung mit flüssiger Agarose. Beide Pufferkammern füllte man mit jeweils 0,5 l 1 x TBE. Nach Entfernen des Kamms spülte man die Taschen des Gels gründlich mit einer Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz), da nicht auspolymerisierte Reste an Acrylamid sich nachträglich in den Taschen verfestigen können. Weiterhin war ein Ausblasen mit Puffer vorhandener Luftblasen an der Unterseite des Gels notwendig. Die in Gel-Ladepuffer aufgenommene DNA wurde anschließend in die Taschen des Gels zusammen mit einem DNA-Fragment Marker aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 200V für ca. 2 - 3h, wobei die Position der Markerfarbstoffe kontrolliert wurde. Die Färbung der DNA-Fragmente erfolgte abschließend im Färbebad durch EtBr, die Dokumentation mittels Kamera und Fotodrucker.

2.2.7 Kontrolle der Primer

Nach Eingang der lyophilisierten Primer wurden sie mit 500 µl bidestiliertem Wasser bei 37°C im Schüttler für 30 min resuspendiert und anschließend zu Stammlösungen von 10-20 pmol/µl verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte dazu im Photometer (Pharmacia GeneQuant). Sequenzierprimer wurden auf 5 pmol/µl verdünnt. Je nach Verwendungszweck der Primer konnten weitere Verdünnungen notwendig werden.

Zur Kontrolle der Primer wurden definierte Mengen auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und anhand ihres Laufverhaltens im Gel die Reinheit der Synthese beurteilt.

2.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Methode ermöglicht die beliebige Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes von einer DNA-Matrize (Saiki et al., 1985). Für die Amplifikation eines solchen spezifischen Fragmentes verwendet man das gewünschte Fragment flankierende Primer, die an den äußeren Enden des Fragmentes zu der DNA komplementär sind. Diese Primer lagern sich nach Denaturieren der doppelsträngigen DNA an die Einzelstränge an (*Annealing*) und eine DNA-Polymerase kann am freien 3'-OH-Ende der Primer mit der Synthese des Komplementärstranges durch Anfügen passender dNTPs beginnen. Die *Annealing*-Temperatur wird nach der 2 + 4-Regel grob berechnet: Für jede Base A oder T 2°C, für jede Base G oder C 4°C, die Summe entspricht der optimalen Temperatur. Zyklisches Denaturieren der DNA bei 92-96°C erfordert eine hitzestabile DNA

Polymerase, welche in der aus einem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus*) gewonnenen *Taq*-Polymerase zur Verfügung steht.

2.2.8.1 PCR-SSP für die mHag-Testung

Herkömmliche *Taq*-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Ohne diese Korrekturleseaktivität verhindert ein Basen-*Mismatch* am 3'-Ende des Primers unter geeigneten Reaktionsbedingungen die Elongation des Primers durch die *Taq*-Polymerase. Dieses Prinzip erlaubt die Detektion einer Punktmutation durch ein einfaches PCR-Experiment, d. h. ein spezifisches Amplifikat ist vorhanden oder fehlt, und in einem diallelischen System die Darstellung aller drei möglichen Genotypen mit nur zwei sequenzspezifischen PCR-Experimenten. Allerdings stellen diese Experimente hohe Anforderungen an die Spezifität der PCR (Sommer et al., 1992).

Die mHag PCR-SSP-Testung wurde mit 1 x PCR-Puffer durchgeführt, der auch für die routinemäßige HLA Klasse I- und Klasse II-Testung im IFI verwendet wird, alle PCRs wurden mit speziell abgestimmten Primer- und DNA-Konzentrationen sowie Amplifizierungsprogrammen durchgeführt (Tab. 10 und Tab. 11):

- 1 x PCR-Puffer (HLA-Routine)
- SSP-Primer (je 25 pmol/μl, vgl. Kapitel 2.1.4)
- QIAGEN *Taq*-Polymerase (rekombinante 94-kDa DNA Polymerase, exprimiert in *E.coli*)
Konz. 5U/μl
- 25-50 ng genomische DNA pro Ansatz (25μg/μl)
- Mix interner Kontrollprimer (je 25 pmol/μl, IC-1 + IC-2 oder HGH-1 + HGH-2)
- Volumen der Ansätze: 20 μl, ohne Öl überdeckt

1 x PCR-Puffer (HLA-Routine): 2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 60 mM TrisCl, 2,5 mM je dNTP, Cresol-Red Markerfarbstoff

mHag	Kodon/AS	Taq	gem. Pr.	SSP	IC (Mix)	DNA	1x PCR-P.	PCR Progr.
CD31	80, M	0,1	0,75	0,25	0,1 (IC1/2)	1	17,8	SSP-1
Exon 3	80, V	0,1	0,75	0,25	0,1 (IC1/2)	1	17,8	SSP-1
CD31	125, V	0,1	1	0,5	0,1 (IC1/2)	1	17,3	SSP-1
Exon 3	125, L	0,1	1	0,5	0,1 (IC1/2)	1	17,3	SSP-1
CD31	563, N	0,1	1	1	0,1 (IC1/2)	1	16,8	SSP-1
Exon 8	563, S	0,1	1	0,5	0,1 (IC1/2)	1	17,3	SSP-1
CD31	670, R	0,1	0,5	0,5	0,1 (IC1/2)	1	17,8	SSP-1
Exon 12	670, G	0,1	0,5	0,5	0,1 (IC1/2)	1	17,8	SSP-1
HA-1	HA-1 H	0,05	0,25/1	0,25/1	0,1 (IC1/2)	1	18,35/16,85	SSP-2
	HA-1 R	0,05	0,25/1	1/1	0,1 (IC1/2)	1	17,6/16,85	SSP-2
CD49b	HPA-5a, E	0,2	0,2	0,1	0,1 (HGH)	2	17,4	SSP-2
		0,2	0,5	0,75	0,1 (HGH)	1 ⁵	17,45	SSP-3
	HPA-5b, K	0,2	0,2	0,1	0,1 (HGH)	2	17,4	SSP-2
		0,2	0,5	0,75	0,1 (HGH)	1 ⁵	17,45	SSP-3

Tab. 10: Zusammensetzung der Reaktionsgemische pro Ansatz für die mHag PCR-SSP (20 µl), alle Angaben in µl, ⁵ DNA-Konzentration 100 ng/µl, gem. Pr.: gemeinsamer Gegenstrang-Primer, SSP: sequenzspezifischer Primer, 1x PCR-P.: PCR-Reaktionspuffer

2.2.8.2 PCR-Bedingungen für *Sit^a* RFLP-Testung

Für die Testung des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) *Sit^a* im CD49b-Gen wurde eine generische PCR wie folgt durchgeführt:

In 50 µl Ansätzen wurden 1 µl (25 ng) genomische DNA, 5 µl QIAGEN 10x Puffer (enthält 2,5 mM je dNTP), jeweils 0,5 µl Primer HPASit und HPASitrev, 0,1 µl *Taq*-Polymerase mit 43 µl destilliertem Wasser vermischt und im Thermocycler mit dem Programm RFLP (Tab. 12) amplifiziert.

Anschließend erfolgte eine Spaltung des Amplifikates unter der Verwendung des Enzyms *Mae* III (2.2.4), inkubiert wurde bei 55°C ü. N. Zum Abschluss erfolgte eine Analyse der Spaltungsprodukte auf einem 8%igen Polyacrylamid-Gel (2.2.6.2). Dazu wurde das gesamte Probenvolumen aufgetragen.

PCR-Programm	SSP-1		SSP-2		SSP-3	
Reaktion						
initiale Denaturierung	96°C	2:00	96°C	2:00	96°C	2:00
Denaturierung	96°C	0:25	96°C	0:30	96°C	0:20
Annealing	68°C	0:45	65°C	1:00	68°C	0:45
Elongation	72°C	0:45			72°C	0:45
Denaturierung	96°C	0:25	96°C	0:30	96°C	0:20
Annealing	65°C	0:50	63°C	1:30	63°C	0:45
Elongation	72°C	0:45			72°C	0:45
Denaturierung	96°C	0:25	96°C	0:30		
Annealing	55°C	1:00	62°C	1:00		
Elongation	72°C	2:00	72°C	0:45		
finale Polymerisation	72°C	5:00	72°C	5:00	72°C	5:00
Pause	10°C	10:00	10°C	10:00	10°C	10:00

Tab. 11: Für die mHag-Testung verwendete Amplifizierungsprogramme

PCR-Programm	RFLP	
Reaktion		
initiale Denaturierung	96°C	2:00
Denaturierung	96°C	0:20
Annealing	68°C	0:45
Elongation	72°C	0:30
Denaturierung	96°C	0:20
Annealing	65°C	0:45
Elongation	72°C	0:45
finale Polymerisation	72°C	5:00
Pause	10°C	10:00

Tab. 12: Amplifizierungsprogramm zur *Sit^a*-RFLP-Testung

QIAGEN 10 x Puffer: enthält 15 mM MgCl₂, KCl, (NH₄)₂SO₄, TrisCl, pH 8.7

2.2.8.3 Sequenzierungen

In dieser Arbeit wurden im CD31-Gen die Dimorphismen an den Positionen Kodon 563 und Kodon 670 sowie im HA-1 Gen das Exon 22 direkt sequenziert. Dazu kamen unterschiedliche Systeme zur Anwendung (2.1.7), deren Basis die Polymerase-Kettenabbruch-Methode durch Verwendung von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) ist (Sanger et al., 1992). Beide Systeme verwenden ein *Cycle sequencing*-Verfahren nach Amplifizierung eines generischen Fragmentes von genomischer DNA durch ein herkömmliches PCR-Programm. Für die Sequenzierungen werden mit Cyanin (Cy 5.0) markierte Primer statt beispielsweise radioaktiv markierter dNTPs verwendet. Mit den angewendeten Kits wird eine thermostabile ThermoSequenase[®] DNA *Taq* Polymerase geliefert, die sich durch die Bildung von Sequenzdaten mit besonders homogener Intensität auszeichnet. Pyrophosphat (PPi), welches als Nebenprodukt bei der DNA-Polymerisation auftritt, kann die 5'-3'-Bindung zwischen vorletztem dNTP und letztem ddNTP lösen. So kann es zu einer weiteren Kettenverlängerung kommen. Dieses wird durch eine Pyrophosphatase-Aktivität der ThermoSequenase[®] verhindert, was die Genauigkeit der Sequenzdaten zusätzlich erhöht.

Die Amplifikation genomischer DNA erfolgte unter folgenden Bedingungen:

in 50 µl Ansätzen wurden 2 µl (50 ng) genomische DNA, 5 µl QIAGEN 10x Puffer, jeweils 1 µl generischer Sequenzier-Primer und 0,2 µl *Taq*-Polymerase (1 U) mit 41 µl destilliertem Wasser vermischt und im Thermocycler mit den Programmen genSEQ1 (CD31 Exon 8 + 12) und genSEQ2 (HA-1) amplifiziert (Tab. 13).

Die Amplifikate wurden auf einem Agarosegel (2% w/v) kontrolliert und anschließend mit dem QIAquick System aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Sequenzierreaktion entsprechend folgendem Verfahren:

Alle Schritte zur Sequenzierung der generischen Amplifikate wurden auf Eis durchgeführt. Beiden verwendeten Systemen gemeinsam war zunächst eine Verteilung von je 3 µl der A-, C-, G- und T-Terminationsmischungen in die entsprechend beschrifteten 200 µl Reaktionsgefäße sowie die Präparation eines Mastermixes. Allerdings enthielten die Terminationsmischungen von Pharmacia schon DMSO, ThermoSequenase[®] und Pufferkomponenten. Die VG-ThermoSequenase[®] musste zunächst in einem speziellen Puffer 1/10 verdünnt werden. Anschließend wurden 5 µl (VG) bzw. 3 µl (Pharmacia) des Mastermixes in die Terminationsmischungen gegeben, gut vermischt, mit einem Tropfen Öl überdeckt und im Thermocycler amplifiziert (Tab. 14).

PCR-Programm	genSEQ1		genSEQ2	
Reaktion				
initiale Denaturierung	94°C	5:00	96°C	1:30
Denaturierung	94°C	0:30	96°C	0:25
Annealing	60°C	0:30	66°C	1:00
Elongation	72°C	1:00	72°C	1:30
Denaturierung			96°C	0:25
Annealing			60°C	1:00
Elongation			72°C	2:00
finale Polymerisation	72°C	5:00	72°C	5:00
Pause	10°C	10:00	10°C	10:00

Tab. 13: Programme zur generischen Amplifizierung (Sequenzierung)

Reagentien	VG-System	Pharmacia-Kit
Sequenzier-Puffer	2,5 µl	-
100% DMSO	3,5 µl	-
Sequ. Primer (Cy 5.0, 3 pmol/µl)	2,5 µl	1 µl
gen. Amplifikat	50 ng	100 ng
ThermoSequenase ^{® 6}	3,0 µl	-
Gesamtvolumen (mit bidest. H ₂ O aufgefüllt)	22 µl	13 µl
Amplifizierungsprogramm	SEQ1	SEQ2

Tab. 14: Präparation der Mastermixe (pro Sequenzierreaktion)⁶ im VG-System verdünnte ThermoSequenase[®]

Die Amplifizierung nach dem *Cycle-sequencing*-Prinzip bedeutet, dass ein herkömmliches PCR-Programm verwendet wird. Die Dauer der Sequenzierreaktion verkürzt sich dabei auf ca. 2,5 h im Gegensatz zu der traditionellen Sequenzierung bei gleich bleibend niedriger Temperatur über Nacht. Zur Absicherung der Sequenzierergergebnisse erfolgte die Sequenzierung der Proben sowohl in 5'-Richtung (*forward*) als auch in 3'-Richtung (*reverse*). Auf diese Weise konnten heterozygote Positionen sicher erkannt werden.

In dieser Arbeit kam das Amplifizierungsprogramm SEQ1 zur Sequenzierung der CD31 Genorte Exon 8 und 12 sowie das Programm SEQ2 zur Sequenzierung des Exon 22 im HA-1-Gen zur Anwendung (Tab. 15).

PCR-Programm	SEQ1		SEQ2	
Reaktion				
initiale Denaturierung	94°C	2:00	95°C	3:00
Denaturierung	94°C	0:20	95°C	0:30
Annealing	60°C	0:45	62°C	0:30
Elongation	72°C	1:00	72°C	1:00
		} 15 x		} 25 x
Denaturierung	94°C	0:20		
Annealing	62°C	0:45		
Elongation	72°C	1:00		
		} 15 x		
Denaturierung	94°C	0:20		
Annealing /Elongation	66°C	1:30		
		} 10 x		
Pause	10°C	10:00	10°C	10:00

Tab 15: Amplifizierungsprogramme zur direkten Sequenzierung

Nach erfolgter Sequenzier-PCR wurden die Proben mit 6 µl Stop-Lade-Puffer (enthält Formamid) versetzt und direkt vor der Beladung des Gels bei 85 - 95°C (3 min) denaturiert.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Sequenzierreaktionen wurde ein *SureFill*[®]-System (Visible Genetics) verwendet, welches aufwendiges Ansetzen von Polyacrylamid-Lösungen vermeidet. Dazu wurde eine auf RT gebrachte Fertiggelkassette (*MicroGel*[®]) mit einer fertig gemischten Lösung gefüllt und in ca. 5 min unter UV-Licht auspolymerisiert (UV Gel Polymerizer, Visible Genetics). Anschließend setzte man die Kassette mit 16 *Slots* nach sorgfältiger Reinigung der Glasoberflächen in den Sequenzierautomat (*MicroGene Clipper*[®], Visible Genetics) und startete einen Vorlauf bei 53°C und 1.300 V (10 min).

Es folgte die Beladung des Gels mit je 2 µl der Probengemische, dabei konnten maximal 4 Proben gleichzeitig analysiert werden. Schließlich wurde der Lauf bei 53°C/1.300V für 40 min fortgesetzt. So konnten maximal 400 bp auswertbare Sequenzen mit den ca. 18 x 18 cm großen Gelen erzeugt werden. Die Analyse und gegebenenfalls die Editierung der Sequenzen erfolgte abschließend mit der *OpenGene*[®]-Software (Visible Genetics).

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme *GraphPad Prism 3.0 for Windows*[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

und *SPSS 9.0 für Windows*[®] (SPSS GmbH, München). Zur Sequenzanalyse wurde das Software-Paket *DNASTAR* (DNASTAR Ltd. London, England) angewendet. Berechnet wurden mHag-Allelfrequenzen und Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Bei zwei kodominant exprimierten Allelen in einer großen Population ohne Selektion folgt die Verteilung der Allele der Binominalfunktion $p^2 + 2pq + q^2$, wobei p und q den jeweiligen Allelfrequenzen entspricht. Die Berechnung der Assoziationen von mHag-Inkompatibilität zu erhöhter aGvHD erfolgte im Vierfeldertest. Die Stärke der Assoziation wurde durch das Kreuzprodukt (OR, *odds ratio*) der Vierfeldertafel ermittelt: Für eine positive Assoziation gilt dabei: $OR > 1$, für eine negative: $OR < 1$. Die Signifikanz der Assoziation von mHag-*Mismatch* zu erhöhter aGvHD wurde anschließend mittels χ^2 -Heterogenitätstest unter Angabe der 95% Konfidenzintervalle beurteilt. Abschließend erfolgte eine Korrektur signifikanter Assoziationen unter Berücksichtigung der Anzahl der durchgeführten Teste (n) gemäß der Formel $P_c = 1 - (1 - P)^n$ (Bonferroni-Korrektur).

Das Alter der Patienten in der untersuchten Kohorte wurde unter Anwendung des *t-test* ausgewertet. Zur Durchführung einer multivariaten Analyse (lineare, stufenweise Cox-Regression) der in dieser Studie gewonnenen Daten in Kombination mit etablierten, den klinischen Verlauf der Patienten nach TX beeinflussenden Risikofaktoren, wurde die Entwicklung einer klinisch relevanten aGvHD (Grad II bis IV) als abhängige Variable definiert. Anschließend erfolgte die Analyse gegen sechs unabhängige Variablen: *Mismatches* bei den untersuchten mHag in GvH-Richtung (unterschieden nach HA-1, CD31 und CD49b), Vorliegen eines *Sex-Mismatches*, das Patientenalter und das Spenderalter. Zusätzlich erfolgte eine Berechnung mit nur vier unabhängigen Variablen, bei der die einzelnen getesteten mHag nicht unterschieden, sondern zu der Variable „mHag-*Mismatch* in GvH-Richtung vorhanden“ zusammengefasst wurden.

Potentielle Bindungen von Peptid-Nonameren in bestimmten HLA-Allelen wurden unter Verwendung des im Internet unter der Adresse <http://www.bimas.cit.nih.gov/> verfügbaren Programms *HLA Peptide Predictions* ermittelt. Die Angabe der Bindungsaffinität erfolgte dabei unter Berücksichtigung der Dissoziationsrate der Nonamere von den ausgewählten HLA-Spezifitäten in einheitenlosen Zahlenangaben von 10 (geringe Bindung) bis 1.000 (sehr hohe Bindung, Parker et al., 1994).

Zur Aufklärung von proteasomalen Schnittstellen in Proteinsequenzen wurde das im Internet unter <http://www.paproc.de> verfügbare Programm *PaProC* herangezogen, das intrazelluläre Prozessierung vorhersagen kann (Kuttler et al., 2000; Nussbaum et al., 2001).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der PCR-SSP-Methode zur allelspezifischen mHag-Testung

Die PCR-SSP-Methode ermöglicht eine zuverlässige und schnelle Testung genetischer Polymorphismen durch sequenzspezifische Amplifikation der relevanten Bereiche direkt von genomischer DNA (Sommer et al., 1992). Dabei werden zeitaufwendige generische Amplifikationsschritte und eventuelle Restriktionsspaltungen, wie sie bei der PCR-RFLP-Methode notwendig sind, vermieden.

3.1.1 Positionen der sequenzspezifischen Primer im CD31-Gen

Zur Etablierung der PCR-SSP für die Testung der CD31-Dimorphismen an den Positionen Kodon 80, 125, 563 und 670 wurden unterschiedliche Primer-Kombinationen getestet (Abb. 5). Allelspezifische Amplifikate waren mit folgenden Primer-Kombinationen unter den in Kapitel 2.2.8.1 beschriebenen Bedingungen möglich (in Abb. 5 schwarz dargestellte Balken): Kodon 80 mit CD31e3a und CD31e3b/c, Kodon mit 125 CD31e3a und CD31e3d/e, Kodon 563 mit CD31e8a2 und CD31e8b1/c1 und Kodon 670 mit CD31e12a4 und CD31e12b2/c2. Die Primer CD31e3a, CD31e3d und CD31e3e entsprachen publizierten Primern (Behar et al., 1996). Als Ausgangsmaterial zur Etablierung der CD31 PCR-SSP wurden die von Prof. C. Grumet zur Verfügung gestellten Zelllinien verwendet, die für die CD31 Allele an Kodon 125 jeweils homozygot vortypisiert waren (JSS: V,V bzw. SJ: L,L). Die Präparation der DNA erfolgte wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

Die Abbildungen Nr. 6a bis 6c zeigen die Resultate der CD31-Testung für die Zelllinien JSS und SJ sowie eine heterozygote Konstellation (Normalperson Nr. 15). Dazu wurden aufeinander folgend die PCR-SSP-Ansätze der Positionen Kodon 80 (Spuren 1+2), 125 (Spuren 3+4), 563 (Spuren 5+6) und 670 (Spuren 7+8) aufgetragen.

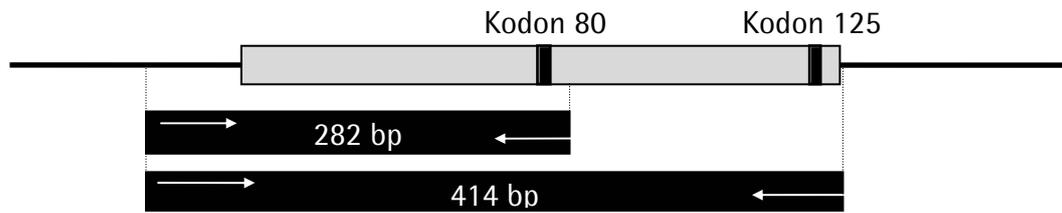
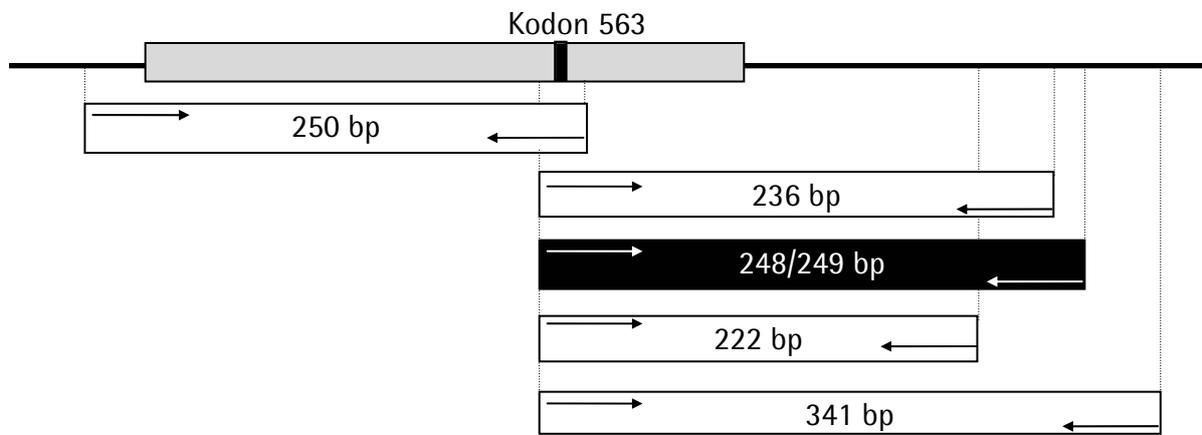
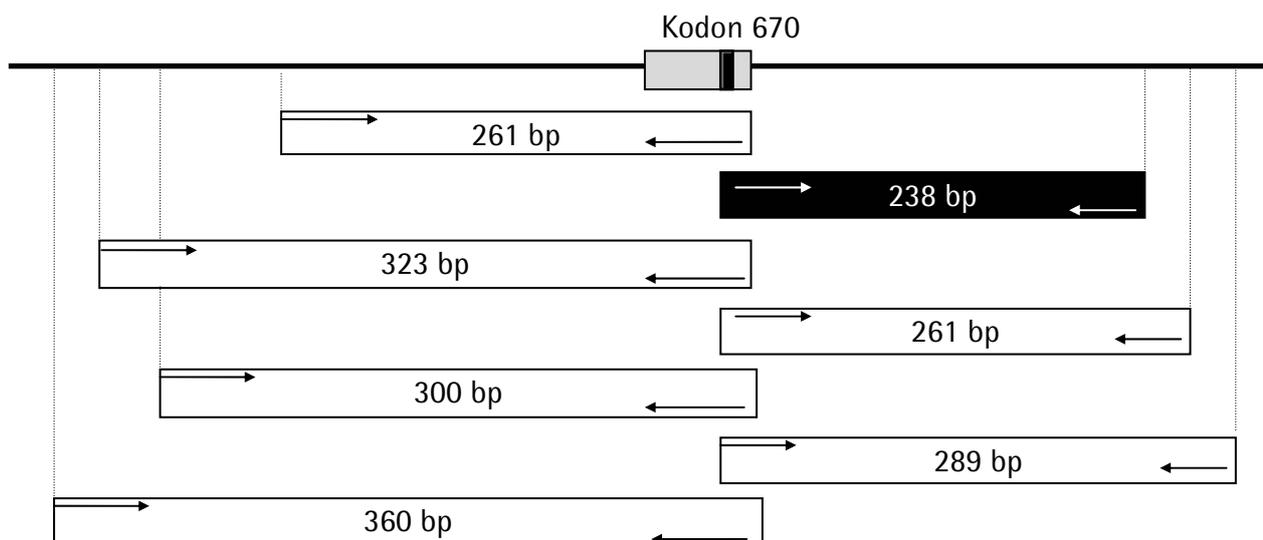
CD31 Exon 3 (Länge 294 bp)*CD31 Exon 8* (Länge 298 bp)*CD31 Exon 12* (Länge 55 bp)

Abb. 5: Position der sequenzspezifischen Primer (Pfeile) und der entsprechenden Amplifikate im *CD31*-Gen (dargestellt in 5' → 3'-Richtung), Erklärungen im Text

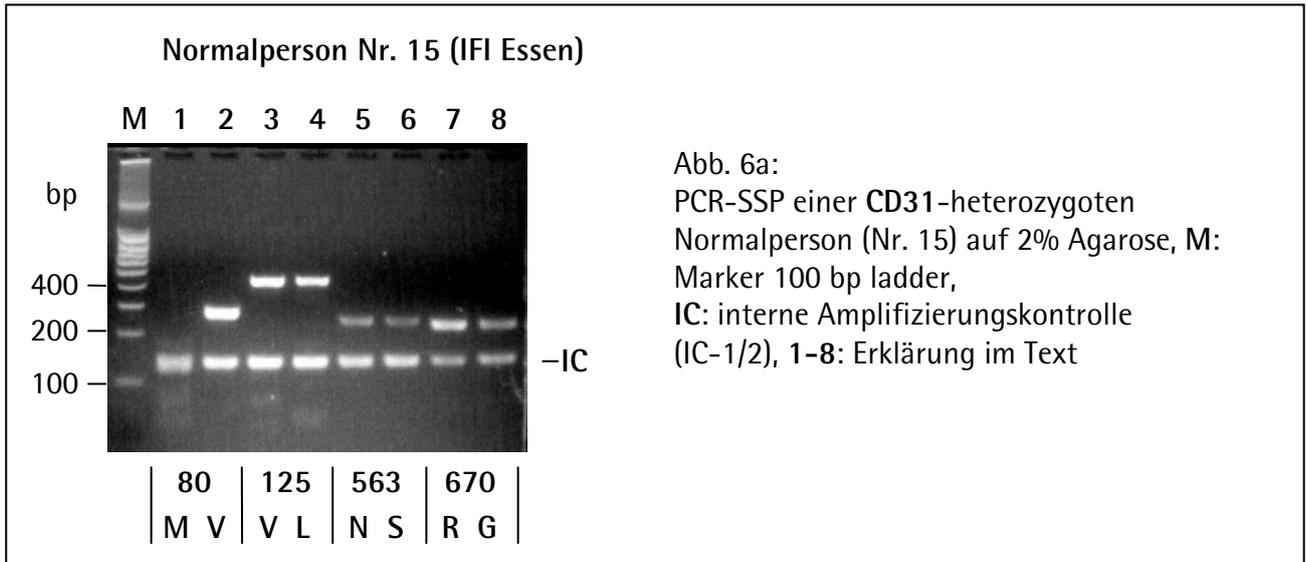


Abb. 6a:
 PCR-SSP einer **CD31**-heterozygoten
 Normalperson (Nr. 15) auf 2% Agarose, M:
 Marker 100 bp ladder,
 IC: interne Amplifizierungskontrolle
 (IC-1/2), 1-8: Erklärung im Text

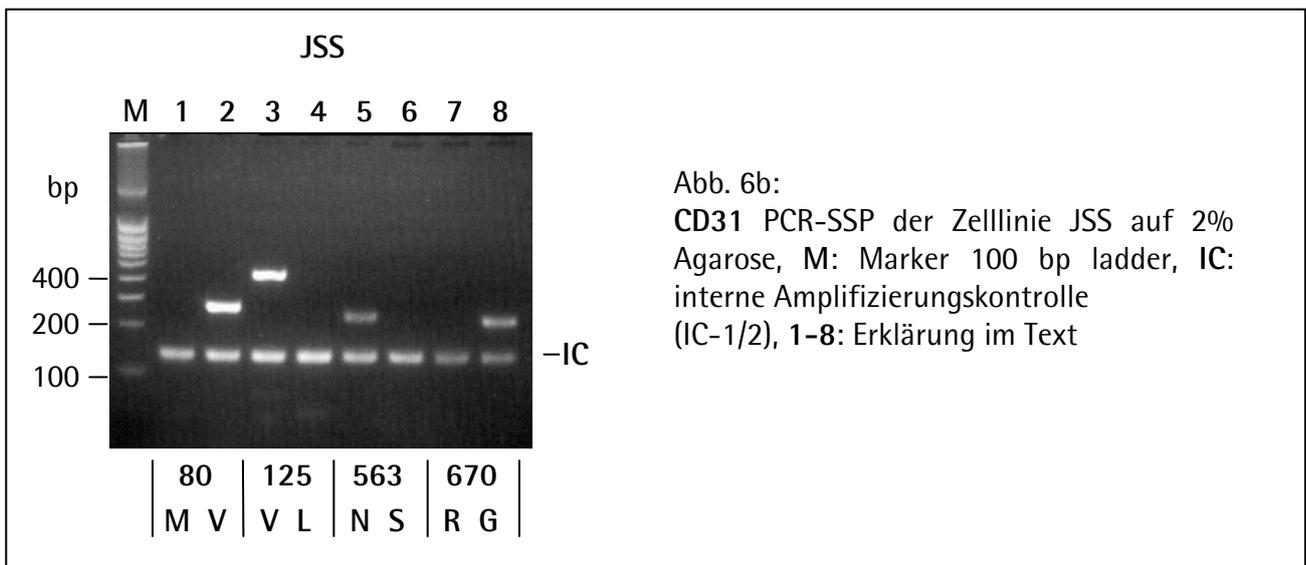


Abb. 6b:
CD31 PCR-SSP der Zelllinie JSS auf 2%
 Agarose, M: Marker 100 bp ladder, IC:
 interne Amplifizierungskontrolle
 (IC-1/2), 1-8: Erklärung im Text

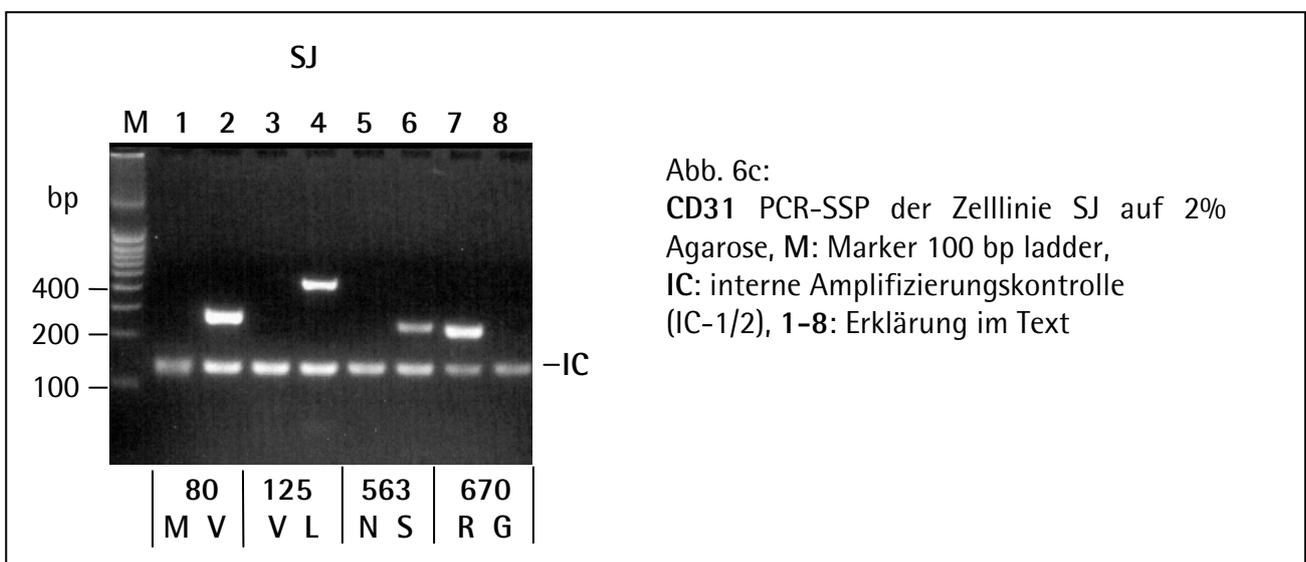


Abb. 6c:
CD31 PCR-SSP der Zelllinie SJ auf 2%
 Agarose, M: Marker 100 bp ladder,
 IC: interne Amplifizierungskontrolle
 (IC-1/2), 1-8: Erklärung im Text

3.1.2 Sequenzspezifische Amplifikation der Allele HA-1 H und HA-1 R

Die Amplifikation der beiden HA-1 Allele nach der in Kapitel 2.2.8.1 beschriebenen Methode erfolgte mit Hilfe sechs unterschiedlicher Primer (HA-1 P1 bis P6, 2.1.4), welche die beiden Basenaustausche im HA-1-Peptid jeweils von der 5'- und von der 3'-Richtung flankieren (Abb. 7). Die verwendeten Primer-Sequenzen sind von Wilke et al. (1998) beschrieben. Dazu wurden die sequenzspezifischen Primer für jede Basenkombination (T mit G bzw. G mit A) in 5'- und in 3'-Richtung gelegt, damit alle vier relevanten Basen von Primern mit einer entsprechenden komplementären Base am 3'-OH-Ende erfasst werden können.

Mit dem beschriebenen Verfahren konnten in vier PCR-Ansätzen die HA-1 Allele zuverlässig dargestellt werden (Abb. 8). Als Ausgangsmaterial zur Etablierung der HA-1 PCR-SSP wurde neben den von Prof. C. Grumet zur Verfügung gestellten Zelllinien auch im IFI vorhandene genomische DNA von Normalpersonen verwendet. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Resultate der HA-1-Testung für die Zelllinie JSS und die Normalpersonen Nr. 5 und 11.

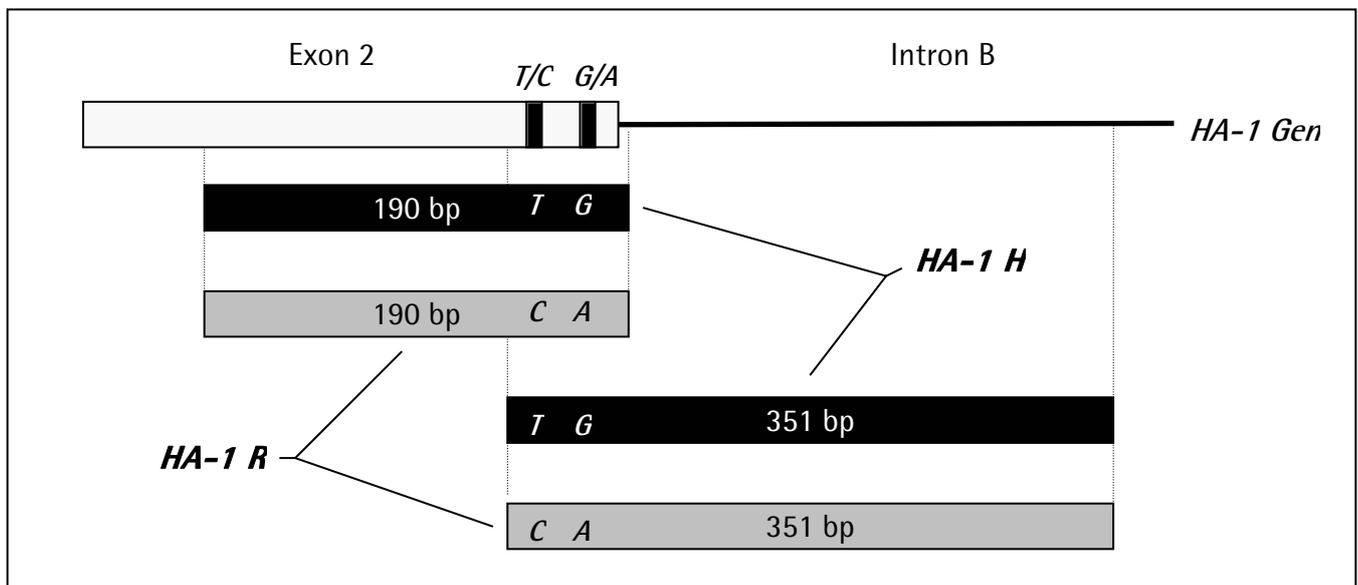


Abb. 7: Position der sequenzspezifischen Primer und der entsprechenden Amplifikate am HA-1 Locus (dargestellt in 5' → 3'-Richtung), schwarze Balken: Amplifikate HA-1 H, graue Balken: Amplifikate HA-1 R, Erklärungen im Text

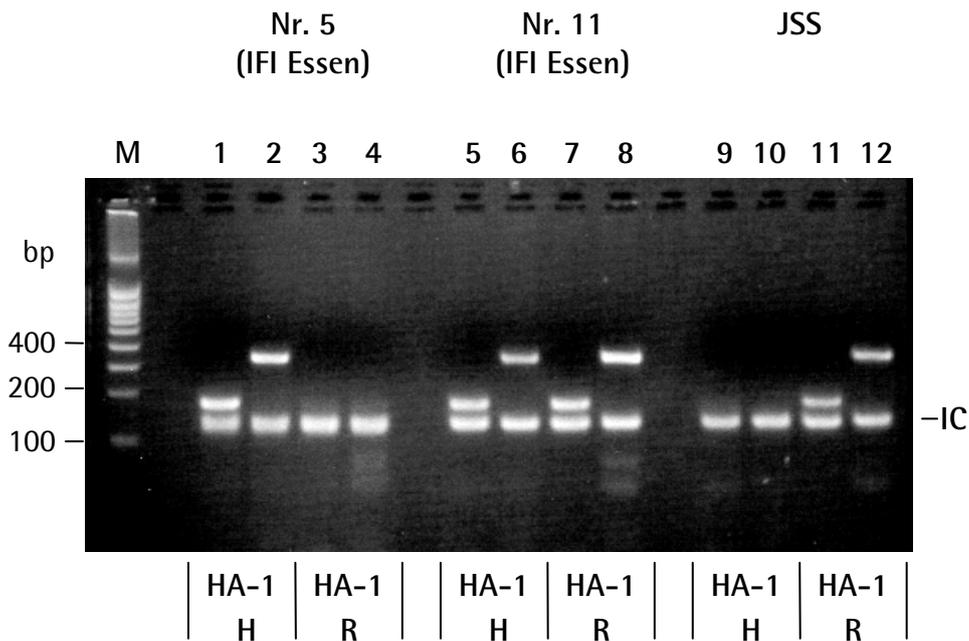


Abb. 8:

HA-1 PCR-SSP der Normalpersonen Nr. 5 (1-4) und Nr. 11 (5-8) sowie der Zelllinie JSS (9-12) auf 2% Agarose, M: Marker 100 bp ladder, IC: interne Amplifizierungskontrolle (IC-1/2), Erklärungen im Text

3.1.3 Sequenzspezifische Amplifikation der CD49b-Allele HPA-5a und 5b

Zur sequenzspezifischen Amplifikation der CD49b-Polymorphismen HPA-5a und HPA-5b nach der in Kapitel 2.2.8.1 beschriebenen Methode wurden Primer eingesetzt, die den Basenaustausch G nach A an Position 1.648 jeweils von 5'- und von 3'-Richtung flankieren (Abb. 9). Als Ausgangsmaterial zur Etablierung der CD49b PCR-SSP wurde neben den von Prof. C. Grumet zur Verfügung gestellten Zelllinien auch im IFI vorhandene genomische DNA von Normalpersonen verwendet.

Abb. 10 zeigt exemplarisch die Resultate der CD49b-Testung unter der Verwendung der Primer HPA5, HPA5a und HPA5b. Dargestellt sind eine heterozygote Konstellation (Normalperson Nr. 28, Spuren 3+4) sowie für beide Allele homozygote Konstellationen (Zelllinie SJ, Spuren 1+2 bzw. Normalperson Nr. 169, Spuren 5+6). Die Primer HPArev, HPAreva und HPArevb (*reverse Primer*) können für die PCR-SSP eingesetzt werden (2.1.4), wenn die Resultate der o. g. Primer-Kombinationen kein eindeutiges Ergebnis zulassen. Allerdings haben die Primer HPAreva und HPArevb durch die Abfolge mehrerer Thymin-Nukleotide ungünstige DNA-

Bindungseigenschaften, weshalb die PCR-SSP-Ansätze mit einer erhöhten Menge genomischer DNA durchgeführt werden müssen (2.2.8.1).

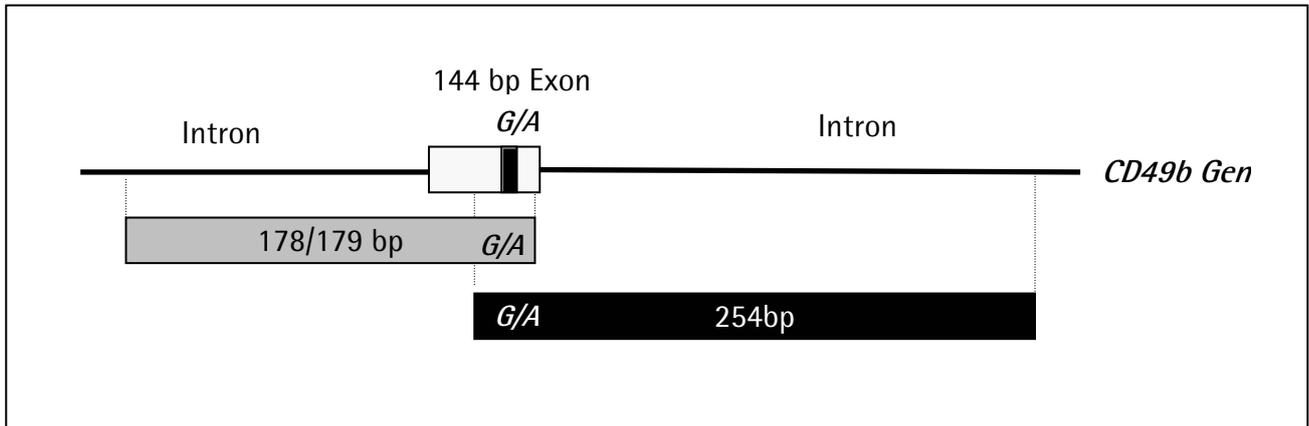


Abb. 9: Position der sequenzspezifischen Primer und der entsprechenden Amplifikate im *CD49b*-Gen (dargestellt in 5' → 3'-Richtung), **schwarzer Balken**: Amplifikate unter Verwendung der Primer HPA5, HPA5a, HPA5b; **grauer Balken**: Amplifikate unter Verwendung der Primer HPA5rev, HPA5reva, HPA5revb, Erklärungen im Text

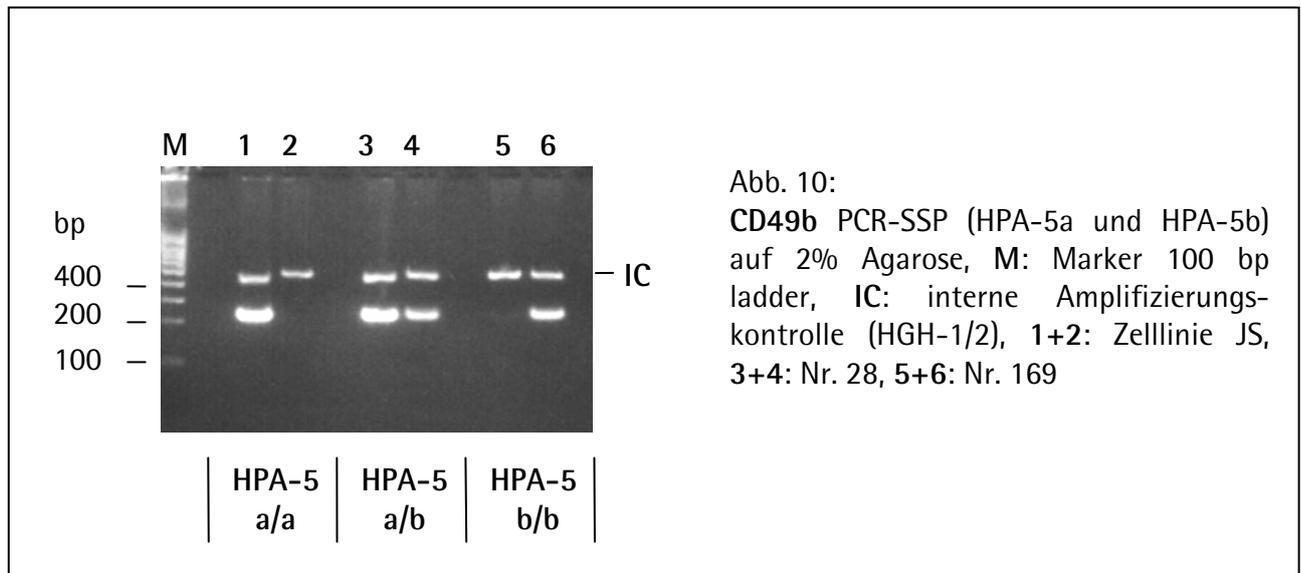


Abb. 10:
CD49b PCR-SSP (HPA-5a und HPA-5b) auf 2% Agarose, M: Marker 100 bp ladder, IC: interne Amplifizierungskontrolle (HGH-1/2), 1+2: Zelllinie JS, 3+4: Nr. 28, 5+6: Nr. 169

3.2 Die Sit^a RFLP-Testung

Die Etablierung der RFLP-Methode zur Bestimmung des Sit^a Polymorphismus im CD49b-Gen erfolgte ebenfalls durch Testung der Zelllinien JSS bzw. SJ und von Normalpersonen. Nach Durchführung einer generischen PCR (2.2.8.2) und anschließender Spaltung des PCR-Produktes mit dem Enzym *Mae* III wurde der Ansatz auf ein Polyacrylamid-Gel (8% w/v) aufgetragen (2.2.6.2). Die Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Testergebnisse der Normalpersonen Nr. 17, 18 und 19. Die Primer HPASit und HPASitrev ermöglichten die Amplifikation eines Fragmentes von etwa 750 bp Größe, wobei eine Abweichung zur publizierten Fragmentgröße von 630 bp vorlag. Das verwendete Restriktionsenzym *Mae* III schneidet die Wildtyp-Sequenz 5'-GTAAC-3', so dass ein 96 bp Fragment von dem generischen Amplifikat abgetrennt wird. Ein DNA-Strang mit der mutierten Sit^a-Sequenz 5'-GTAAT-3' verbleibt ungeschnitten nach *Mae* III-Verdau (vgl. Abb. 12).

Die Testung von fünf Proben ergab für alle homozygot die Wildtyp AS Threonin an Position Kodon 799. Aufgrund der für Kaukasier publizierten geringen Allelfrequenz von 0,25% der Sit^a-Variante und des hohen Arbeitsaufwandes der PCR-RFLP-Methodik wurden keine weiteren Untersuchungen zum Sit^a-Polymorphismus vorgenommen.

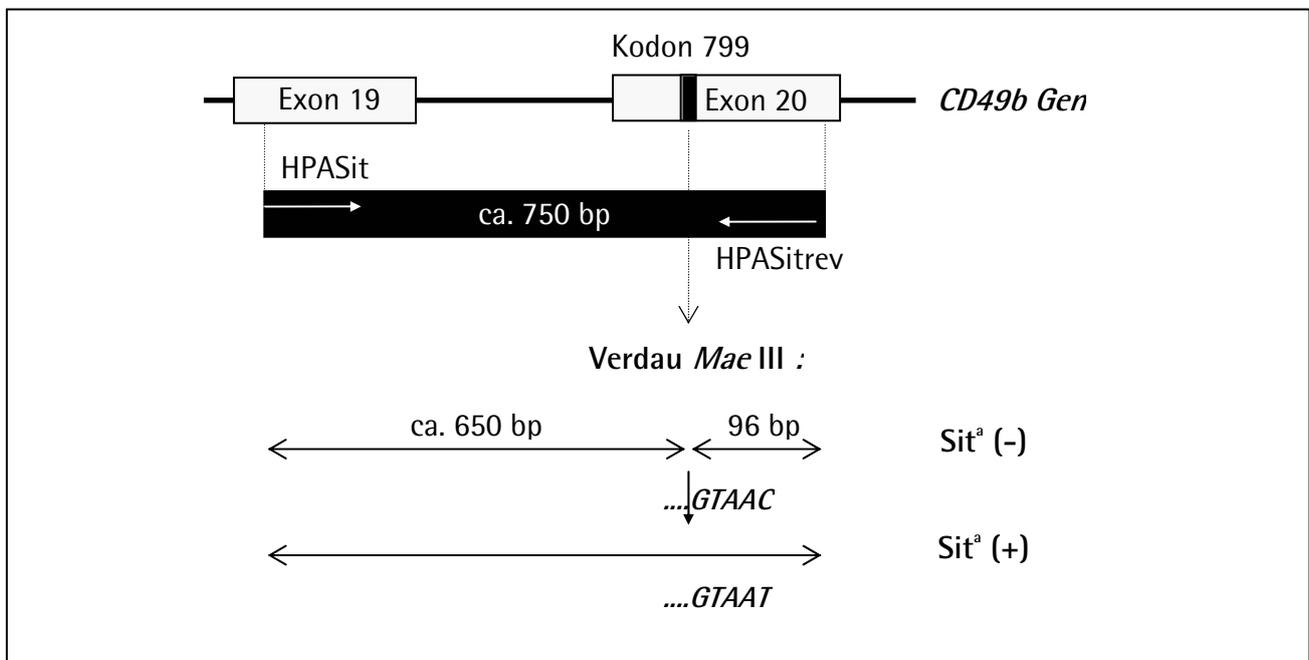
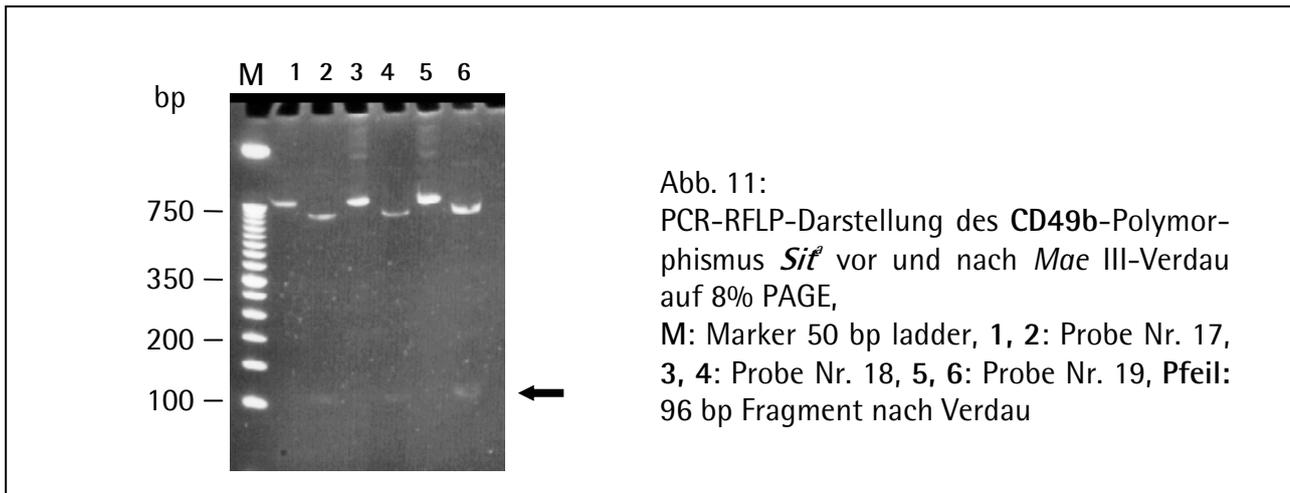


Abb. 12: Position der generischen Primer HPASit bzw. HPASitrev im CD49b-Gen (dargestellt in 5' → 3'-Richtung) und Größe der Fragmente nach *Mae* III-Verdau, schwarzer Balken: generisches Amplifikat, Erklärungen im Text



3.3 Allelverteilungen der untersuchten mHag bei Normalpersonen

Zur Validierung der Test-Methodik wurde am IFI bereits vorhandene oder gemäß den Angaben in Kapitel 2.2.2 präparierte DNA aus Vollblut von Normalpersonen kaukasischen Ursprungs verwendet. Die zur Etablierung der PCR-SSP-Methode verwendeten Zelllinien SJ bzw. JSS wurden zusätzlich für den CD49b-Polymorphismus *Sit^a* getestet (Tab. 16). Nach Testung der CD31-Allele an den Kodons 80, 125, 563 und 670 bzw. den beiden HA-1-Allelen bei 201 Normalpersonen und der Verteilung des CD49b-Polymorphismus HPA-5 (198 Normalpersonen) wurden die Allelfrequenzen der einzelnen Dimorphismen und deren Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg Equilibrium berechnet (2.2.9).

Die CD31-Vortypisierung der Zelllinien SJ und JSS an der Position Kodon 125 konnte bestätigt werden: Die Zelllinie SJ trägt homozygot die CD31-Allele V,V; L,L; S,S; R,R, die Zelllinie JSS homozygot die Allele V,V; V,V; N,N; G,G. Beide Zelllinien sind weiterhin homozygot für die HA-1 Allele R,R bzw. die CD49b-Variante HPA-5a und tragen den *Sit^a* Wildtyp.

3.3.1 Relative Häufigkeit der CD31-Allele

Die Tabelle 17 zeigt die in dieser Arbeit ermittelten relativen Häufigkeiten der CD31-Allele im Vergleich mit in der Literatur vorhandenen Daten.

Probe	CD31								HA-1		CD49b			
	Kodon 80		Kodon 125		Kodon 563		Kodon 670		H	R	HPA-5		Sit ^a	
	V	M	V	L	N	S	G	R			E	K	T	M
SJ	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
JSS	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Nr. 5	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	n. t.	
Nr. 11	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	n. t.	
Nr. 15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	n. t.	
Nr. 17	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Nr. 18	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Nr. 19	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Nr. 28	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	n. t.	
Nr. 169	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	n. t.	

Tab. 16: Ergebnisse der mHag-Testung von bei der Etablierung der mHag-PCR-SSP eingesetzten Proben (Normalpersonen), **Großbuchstaben** charakterisieren die mHag-Allele in Form der exprimierten AS, +: Allel vorhanden, -: Allel nicht vorhanden, n.t.: nicht getestet

CD31 Kodon		IFI Normalpers. (n=201)		jap. Normalpers. ⁷ (n=209)
		Allelverteilung abs.	Allel- Frequenz	Allel- Frequenz
80 (Exon 3)	V	402	1,00	0,99
	M	0		0,01
125 (Exon 3)	L	165	0,41	0,45
	V	237	0,59	0,55
563 (Exon 8)	S	172	0,43	0,52
	N	230	0,57	0,48
670 (Exon 12)	R	172	0,43	0,52
	G	230	0,57	0,48

Tab. 17: Relative Häufigkeiten der CD31-Allele nach Testung von 201 Normalpersonen,

⁷ Maruya et al., 1998

Die CD31 Variante Methionin (M) an Position Kodon 80 konnte in der untersuchten Probandenkohorte nicht nachgewiesen werden.

Zur populationsgenetischen Untersuchung ist die Verteilung der Genotypen von Bedeutung (Tab. 18), da mit ihrer Hilfe Abweichungen vom Hardy-Weinberg Equilibrium erkannt werden können. Dazu wird ein *goodness of fit*-Test durchgeführt (2.2.9).

Die Genotypverteilungen an den CD31-Positionen Kodon 125 ($\chi^2=0,381$; $P=0,827$), Kodon 563 ($\chi^2=0,165$; $P=0,921$) und Kodon 670 ($\chi^2=0,041$; $P=0,980$) befinden sich in Übereinstimmung mit dem HWE.

CD31 Kodon	Allel	Verteilung	<i>goodness of fit</i> (FG=2)
80 (Exon 3)	V,V	201	P=1,000
	V,M	0	
	M,M	0	
125 (Exon 3)	L,L	37	$\chi^2=0,381$, $P=0,827$
	L,V	91	
	V,V	73	
563 (Exon 8)	S,S	39	$\chi^2=0,165$, $P=0,921$
	S,N	95	
	N,N	67	
670 (Exon 12)	R,R	38	$\chi^2=0,041$, $P=0,980$
	R,G	96	
	G,G	67	

Tab. 18: Genotypfrequenzen der CD31-Polymorphismen nach Testung von 201 Probanden, *goodness of fit*: Analyse des HWE

3.3.2 Relative Häufigkeit der HA-1-Allele

Die Tabelle 19 zeigt die in dieser Arbeit ermittelten relativen Häufigkeiten der HA-1-Allele im Vergleich mit in der Literatur vorhandenen Daten.

Auch die Verteilung der HA-1-Genotypen befindet sich in Übereinstimmung mit dem HWE ($\chi^2=0,71$; $P=0,70$).

Genotyp	IFI Normalpers. (n=201)		US Normalpers. ⁸ (n=320)	
	Verteilung	Frequenz	Verteilung	Frequenz
HA-1 H,H	27	0,14	55	0,17
HA-1 H,R	103	0,51	156	0,49
HA-1 R,R	71	0,35	109	0,34
	201	1,00	320	1,00
Allel-Frequenz HA-1 H		0,39	0,44	
Allel-Frequenz HA-1 R		0,61	0,56	
<i>goodness of fit</i>		$\chi^2=0,71$; P=0,70		

Tab. 19: Genotypfrequenzen des HA-1-Polymorphismus nach Testung von 201 Probanden, *goodness of fit*: Analyse des HWE,⁸ Tseng et al., 1998

Genotyp	IFI Normalpers. (n=198)		UK Normalpers. ⁹ (n=339)	
	Verteilung	Frequenz	Verteilung	Frequenz
HPA-5 a,a (E,E)	153	0,773	275	81,1
HPA-5 a,b (E,K)	42	0,212	62	18,3
HPA-5 b,b (K,K)	3	0,015	2	0,6
	198	1,00	339	1,00
Allel-Frequenz HPA-5 a		0,88	0,903	
Allel-Frequenz HPA-5 b		0,12	0,097	
<i>goodness of fit</i>		$\chi^2=0,01$; P=0,99		

Tab. 20: Genotypfrequenzen des CD49b-Polymorphismus HPA-5 nach Testung von 198 Probanden, *goodness of fit*: Analyse des HWE,⁹ Sellers et al., 1999

3.3.3 Relative Häufigkeit der CD49b Varianten HPA-5a und b

Die Tabelle 20 zeigt die in dieser Arbeit ermittelten relativen Häufigkeiten der HPA-5-Allele im Vergleich mit in der Literatur vorhandenen Daten. Die Verteilung der HPA-5-Genotypen befindet sich ebenfalls im Hardy-Weinberg Equilibrium ($\chi^2=0,01$; $P=0,99$).

3.4 Segregationsanalyse der mHag-Haplotypen

Eine Definition möglicher Haplotypen und die Untersuchung eines Kopplungs-Ungleichgewichtes zwischen den untersuchten CD31-Allelen ist durch eine Segregationsanalyse möglich.

Dazu wurde in dieser Arbeit DNA von 20 Familien kaukasischer Herkunft (2.1.2) mit 80 parentalen Haplotypen auf die mHag HA-1 und CD31 hin untersucht und ausgewertet. DNA von 16 dieser Familien diente weiterhin der Segregationsanalyse des CD49b-Polymorphismus HPA-5.

Nach der Segregationsanalyse konnte die Vererbung der untersuchten mHag-Allele in allen Fällen sicher zugeordnet werden.

3.4.1 Definition der CD31-Haplotypen

Die CD31-Testung aller verfügbaren Mitglieder der 20 Familien ergab 5 parentale CD31-Haplotypen mit unterschiedlichen Häufigkeiten (Tab. 21).

Am häufigsten fanden sich die Haplotypen Nr. 1 (V, L, S, R) bzw. Nr. 2 (V, V, N, G) mit Häufigkeiten von 45% bzw. 43%. Die Haplotypen Nr. 3 (V, V, S, R) und Nr. 4 (V, L, N, G) traten in der untersuchte Gruppe von Normalpersonen mit Häufigkeiten von 8% bzw. 3% auf.

Die Segregationsanalyse der CD31-Haplotypen bestätigte, dass sich die Allele an Position Kodon 125 im Kopplungs-Ungleichgewicht mit denen an Kodon 563 und 670 befinden.

In einer der getesteten Familien (Familien Nr. 6404) konnte eine bisher noch nicht beschriebene Kombination der CD31-Allele an Position Kodon 563 und denen an Position Kodon 670 gezeigt werden: Nach Testung aller fünf Familienmitglieder zeigte sich, dass sowohl der Vater (F) als auch einer der Nachkommen (C3) den Haplotyp Nr. 5 (V, L, S, G) tragen (Abb. 13a).

Die Ergebnisse der HA-1- und HPA-5-Testungen der Familie Nr. 6404 zeigten keine weiteren Auffälligkeiten (Abb. 13b und 13c).

Die Familie Nr. 6404 wurde aufgrund einer CML-Erkrankung der Tochter C3 im Rahmen der Familienspendersuche am Institut für Immunologie für die HLA-Merkmale untersucht (Stammbaum Abb. 14).

Haplotyp	Kodon 80 (Exon 3)	Kodon 125 (Exon 3)	Kodon 563 (Exon 8)	Kodon 670 (Exon 12)	Familien (n=20)	Verteilung	jap. Familien (n=28) ¹⁰	Verteilung
1	V	L	S	R	36	0,45	46	0,41
2	V	V	N	G	34	0,43	39	0,35
3	V	V	S	R	7	0,08	21	0,19
4	V	L	N	G	2	0,03	6	0,05
5	V	L	S	G	1	0,01	0	
					80	1,00	112	1,00

Tab. 21: Segregationsanalyse der detektierten CD31-Haplotypen, kursiv: bisher nicht beschriebener CD31-Haplotyp Nr. 5, ¹⁰Maruya et al. (1998)

Familie Nr. 6404 (CD31-Testung)

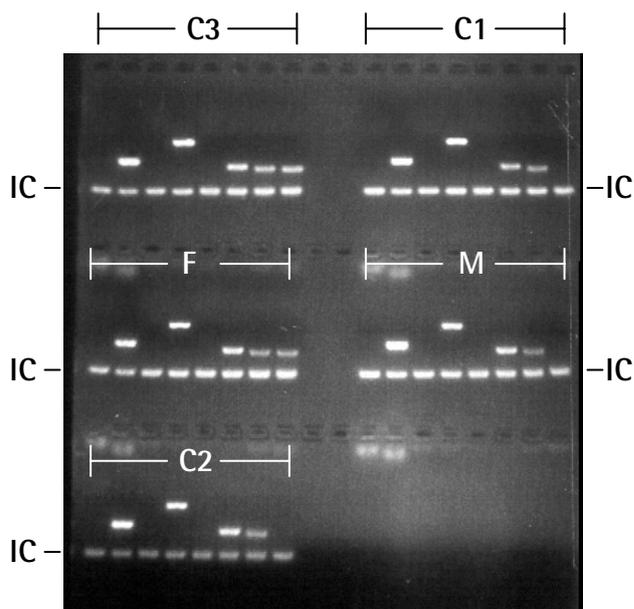


Abb. 13a:
CD31 PCR-SSP der Familie Nr. 6404 auf 2% Agarose,
F: Testergebnis des Vaters,
M: Testergebnis der Mutter,
C1-C3: Ergebnisse der Nachkommen, IC: interne Amplifizierungskontrolle (IC-1/2)

Familie Nr. 6404 (HA-1-Testung)

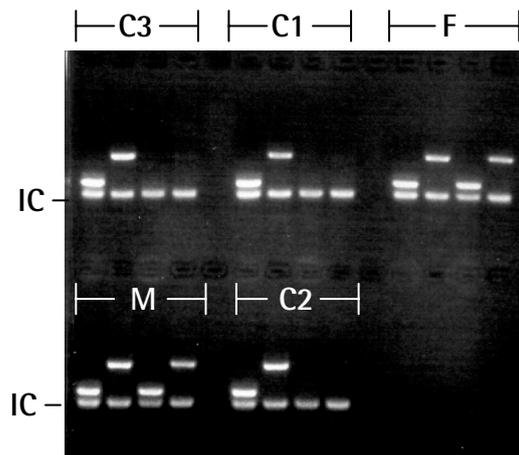


Abb. 13b:
 HA-1 PCR-SSP der Familie Nr.
 6404 auf 2% Agarose,
 F: Testresultat des Vaters,
 M: Testresultat der Mutter,
 C1-C3: Ergebnisse der Nach-
 kommen, IC: interne
 Amplifizierungskontrolle (IC-1/2)

Familie Nr. 6404 (CD49b/HPA-5-Testung)

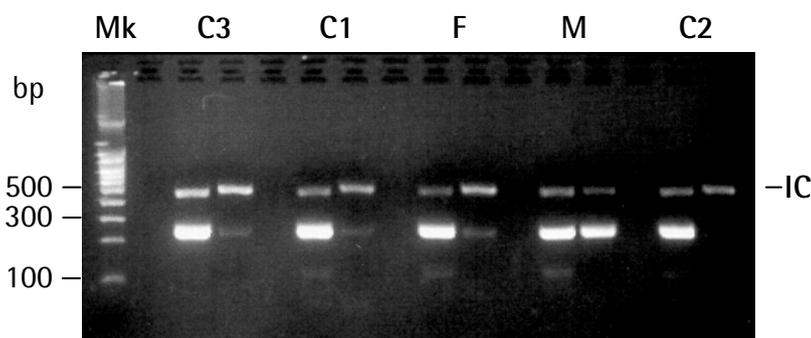


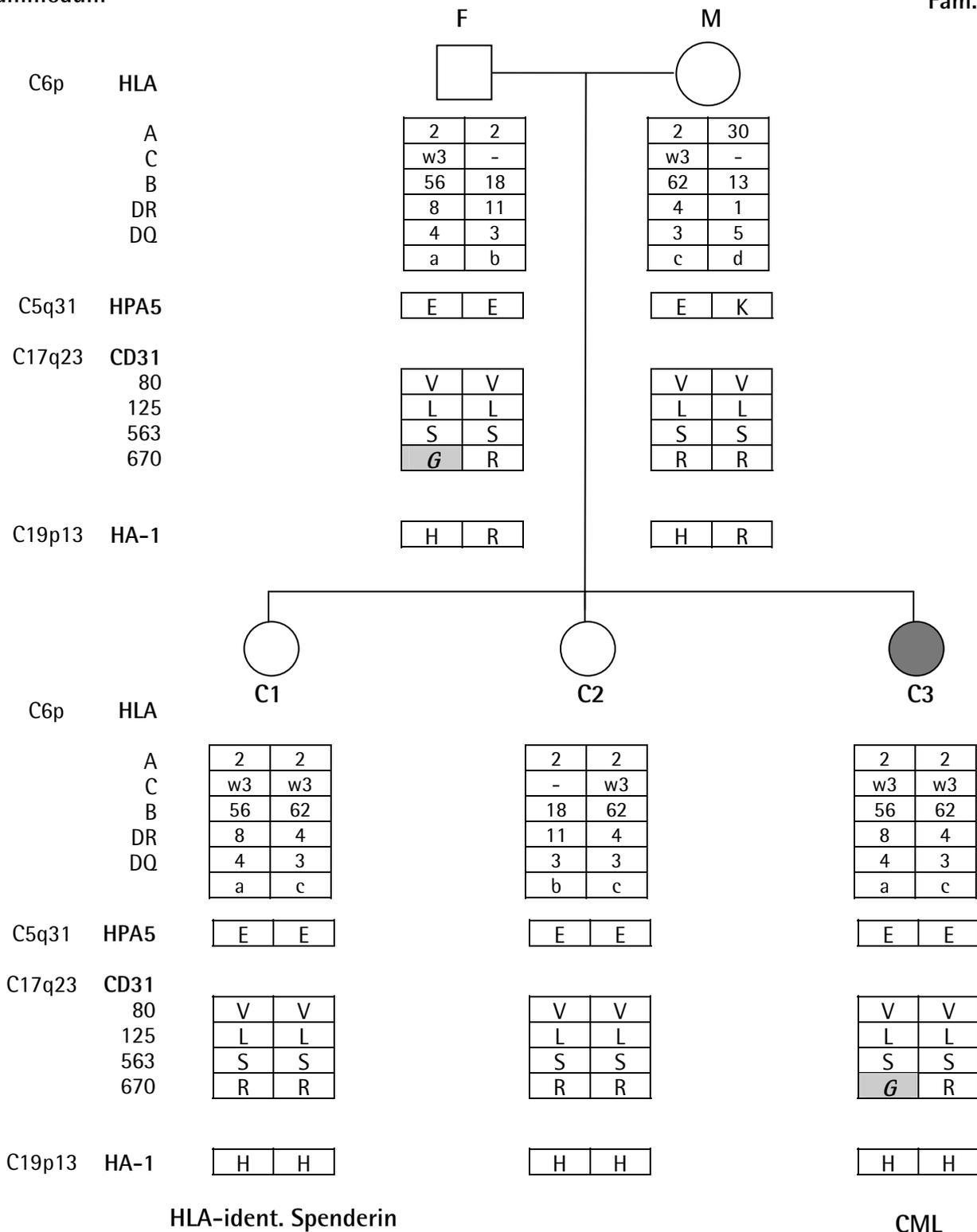
Abb. 13c: CD49b PCR-SSP der Familie Nr. 6404 auf 2% Agarose, F, M, C1-C3: Ergebnisse des Vaters, der Mutter und der Nachkommen, IC: interne Amplifizierungskontrolle (HGH-1/2), Mk: Marker 100 bp ladder

Institute of Immunology
 University Hospital of Essen
 Virchowstr. 171
 D-45122 Essen / F. R. G.
 Phone (0049 201) 723-4200

Institut für Immunologie
 Universitätsklinikum Essen
 Virchowstr. 171
 D-45122 Essen
 Tel. (0201) 723-4200

Stammbaum

Fam. Nr. 6404



HLA-ident. Spenderin

CML

Abb. 14: Stammbaum der Familie 6404, alle mHag-Allele als AS dargestellt, grau unterlegt: AS Glycin an Position CD31 Kodon 670 in Kombination mit AS Serin an Position Kodon 563, kleine Buchstaben: Zuordnung der HLA-Haplotypen

3.4.2 Bestätigung des neu detektierten CD31-Haplotyps mittels Sequenzierung

Zur Validierung der bisher nicht beschriebenen CD31-Allelkombination wurde DNA der beiden betroffenen Familienmitglieder der Familie Nr. 6404 durch direkte Sequenzierung der relevanten Bereiche in Exon 8 und Exon 12 näher untersucht.

Zunächst erfolgte die Etablierung der Sequenziermethode (2.2.8.2). Ausgewählt wurden zu diesem Zweck die jeweils homozygoten Zelllinien JSS, SJ (2.1.1) und eine heterozygote Normalperson (Nr. 198) aus der für die Berechnung der Allelfrequenzen bereits untersuchten Gruppe von Normalpersonen (Tab. 22).

Probe	CD31-Allele
Zelllinie SJ	V,V; L,L; S,S; R,R
Normalperson 198	V,V; V,L; N,S; G,R
Zelllinie JSS	V,V; V,V; N,N; G,G

Tab. 22: CD31-Allele der zur Etablierung der CD31-Sequenzierung an den Positionen Exon 8 und Exon 12 verwendeten Proben

Anschließend erfolgte nach generischer Amplifikation von Fragmenten der Größen 550 bp mit den Primern CD31e8a und CD31e8a4 (Exon 8, Abb. 15) und ca. 700 bp mit den Primern CD31e12a1 und CD31e12a4 (Exon 12, Abb. 16, 2.1.4) die Sequenzierung der Fragmente in der 5'- und zur Absicherung auch in der 3'-Richtung (2.2.8.3). Das amplifizierte Exon 12-Fragment wich in den Experimenten von der durch die publizierte Sequenzinformation (L34944) zu erwartenden Größe von 521 bp ab.

Die Sequenzierung eines 361 bp Fragmentes an Position Exon 12 des CD31-Gens, welches durch die Primer CD31e12a4 bzw. CD31e12a8 amplifiziert werden konnte, war ebenfalls möglich (Abb. 17). Allerdings war die Länge verwertbarer Sequenzierdaten nach Prozessierung der Rohdaten (2.2.9) gegenüber der Primer-Kombination CD31e12a1 und CD31e12a4 für Exon 12 deutlich reduziert.

Die durchgeführten Sequenzierreaktionen ergaben ca. 300 bp bis 500 bp verwertbare Sequenzdaten. Nach manueller Editierung und anschließendem *Alignment* der erhaltenen Sequenzen mit den aus der NCBI-Datenbank bekannten CD31-Sequenzen (2.1.3) zeigte sich bis

auf die in dieser Arbeit beschriebenen Dimorphismen eine vollständige Übereinstimmung der Sequenzen.

Die Abbildung 18 stellt die für die untersuchten CD31-Polymorphismen in Exon 8 und Exon 12 relevanten Bereiche der Proben SJ, JSS und von Normalperson Nr. 198 dar. Die Primer CD31e8a7x (Exon 8 in 5'-Richtung) und CD31e12a3x (Exon 12 in 3'-Richtung) erwiesen sich in ihren *Annealing*-Eigenschaften als problematisch, daher konnten keine gleichmäßigen Sequenzdaten erzeugt werden.

Die CD31-Sequenzierung der DNA des Vaters (F) und der CML-Patientin (C3) der Familie Nr. 6404 bestätigte das zuvor durch die PCR-SSP gewonnene Ergebnis: Beide Proben waren in Exon 8 an Nukleotid 1.688 homozygot für die Base G (entspricht der Aminosäuren S an Kodon 563), während an Nukleotid 2.007 eine heterozygote Konstellation R (= A + G) vorlag, was an Kodon 670 den Aminosäuren R und G entspricht (vgl. Abb. 3).

3.4.3 Segregationsanalyse der HA-1- und CD49b-Allele

Die Vererbung der HA-1 und CD49b Merkmale konnte in den untersuchten Familien sicher nachgewiesen werden. Trotz der niedrigen CD49b/HPA-5 b-Allelfrequenz von 12% (1.3) fand sich in 8 der 16 Familien, die auf ihre CD49b-Allelverteilung hin untersucht wurden, ein CD49b/HPA-5 heterozygoter Elternteil. In allen 8 Fällen konnte die Vererbung der Allele an die Nachkommen gezeigt werden.

Der Stammbaum der Familie Nr. 6404 (Abb. 14) zeigt exemplarisch neben den HLA- und CD31-Allelen auch die Verteilung der in der Familie detektierten HA-1- und HPA-5-Allele.

Insgesamt konnte die in dieser Arbeit eingesetzte PCR-SSP-Methodik durch die mHag-Testung der Mitglieder von 20 Familien sicher validiert werden.

```

4141 gaggaaaaaa aaaaaagttg agcagtggtt gtctcatggt cctcttctc tgccttctt
4201 tgctcagtg gaatcctttt cctGCTTTTC AGCCCCGGTG GATGAGGTCC AGATTTCTAT
4261 CCTGTCAAGT AAGGTGGTGG AGTCTGGAGA GGACATTGTG CTGCAATGTG CTGTGAATGA
4321 AGGATCTGGT CCCATCACCT ATAAGTTTTA CAGAGAAAAA GAGGGCAAAC CCTTCTATCA
4381 AATGACCTCA AATGCCACCC AGGCATTTTG GACCAAGCAG AAGGCTAACA AGGAACAGGA
4441 GGGAGAGTAT TACTGCACAG CCTTCAACAG AGCCAACCAC GCCTCCAGTG TCCCAGAAG
4501 CAAAATACTG ACAGTCAGAG gtgagtcagg gtctccatag caagctgtgc tgtgggcccc
4561 caagggcaag accagaaaac accccccttg taagaggag tttgggggga gtctagctta
4621 tgtgactgaa ggctaggaga gtaatgtcct ccaggctctt gggtgcaagt gacagaaaacc
4681 cactcaaatt aagtaaaaaa gagaaatcga ttattataag gaattggag aatgtcacat
4741 cgttccaatt acaaattggt ggcagactca ccattgagtc atcttgggtc aaacatccaa

```

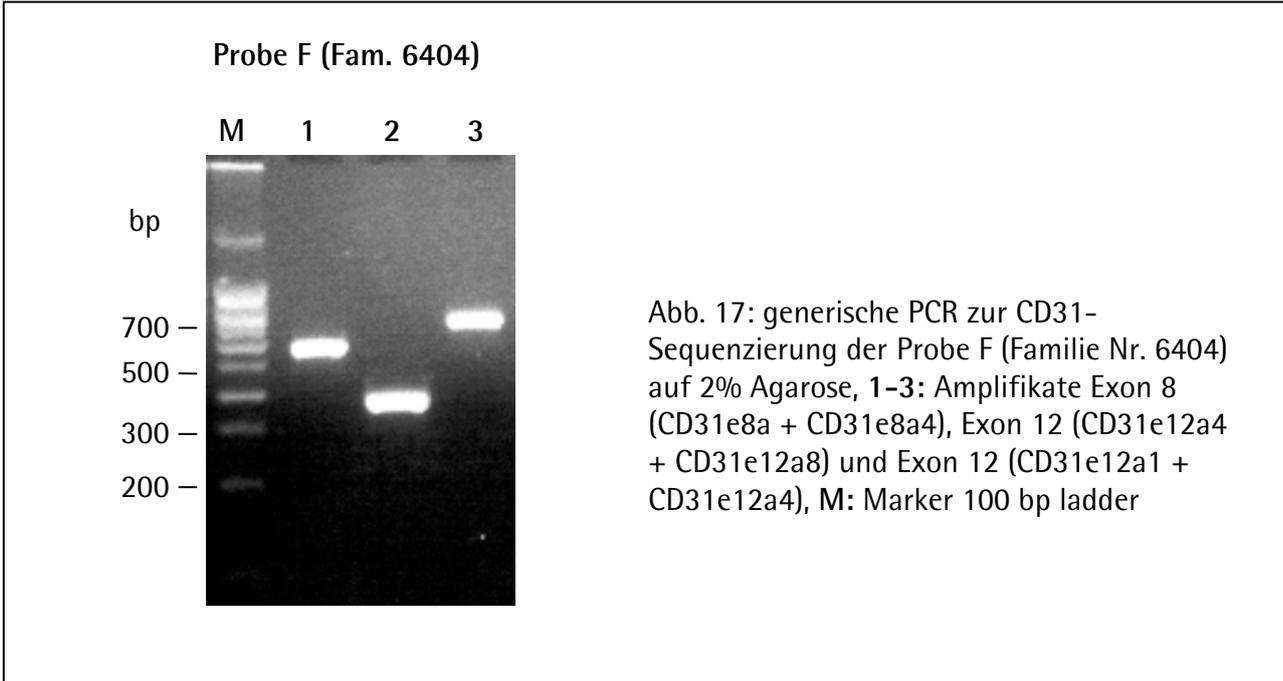
Abb. 15: Direkte Sequenzierung CD31 (Exon 8), **grau unterlegt**: Position der generischen *Primer* CD31e8a und CD31e8a4 im CD31-Gen (*Accession* Nr. L34640) in 5'- und 3'-Richtung, **schwarz unterlegt**: Position der Sequenzier-*Primer* CD31e8a7x + CD31e8a3x, **Großbuchstaben**: Exonsequenz, **kleine Buchstaben**: Intronsequenz, **doppelt unterstrichen**: Position Basenaustausch A → G (Kodon 563)

```

61 agaaagaaag aaactatatt caggccaggc atggtagttc atgcctataa cccagctct
121 ttgggaggct gaggtgggag gatcattgag cccaggagtt ggagaccage ctgtgcaaca
181 aagcgagaca tggagaatgt ggaacgaggg acccaggacc cagagacagt gctggttgtc
241 actacactga ataaatcagg cttgac:ttg ttaggggtac tgaattttta aaagggtttt
301 agaaaactag aatttcctt gtcactcacc ctaattgtta tttttcaact aGGTCACAAT
361 GACGATGTCA GAAACCATGC AATGAAACCA ATAAATGATA ATAAAGgtaa ttatctaatt
421 acatgttttt attagaacca acttttcat taaaaaaaag actcatagga aaagaaaact
481 aaaacttgaa ggactgtgga taatttccca cctctcttaa tgaccctgta cccagccgat
541 gtgtcaatga aggtagctag ctgctttcac cagagatgct atctagtgtc ctcagtggga

```

Abb. 16: Direkte Sequenzierung CD31 (Exon 12), **grau unterlegt**: Position der generischen *Primer* CD31e12a4 + CD31e12a1 im CD31-Gen (*Accession* Nr. L34944) in 5'- und 3'-Richtung, **schwarz unterlegt**: Position der Sequenzier-*Primer* CD31e12a1x + CD31e12a3x, **Großbuchstaben**: Exonsequenz, **kleine Buchstaben**: Intronsequenz, **doppelt unterstrichen**: Position Basenaustausch A → G (Kodon 670)



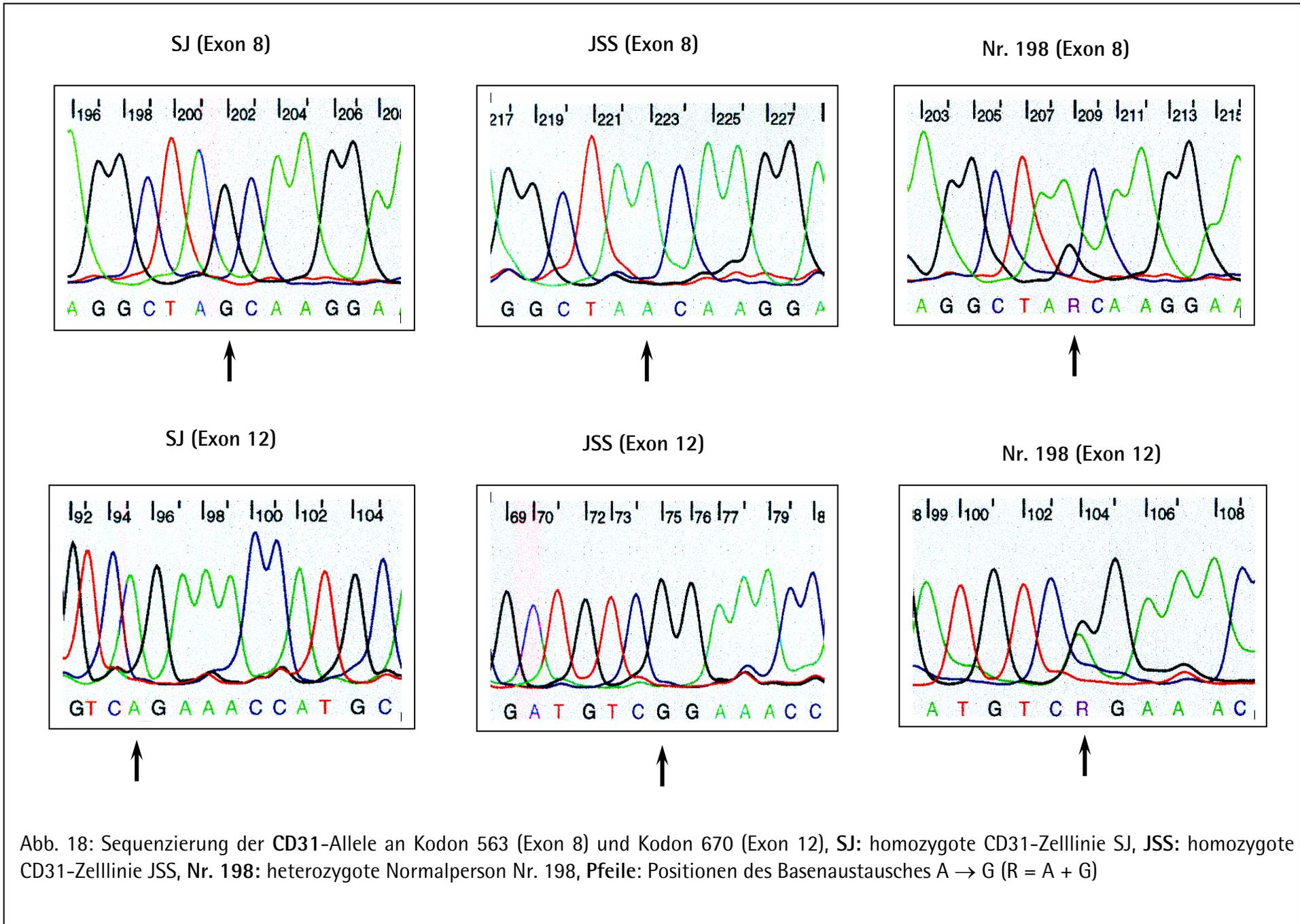


Abb. 18: Sequenzierung der CD31-Allele an Kodon 563 (Exon 8) und Kodon 670 (Exon 12), SJ: homozygote CD31-Zelllinie SJ, JSS: homozygote CD31-Zelllinie JSS, Nr. 198: heterozygote Normalperson Nr. 198, Pfeile: Positionen des Basenaustausches A → G (R = A + G)

3.5 Verteilung der HLA-Merkmale bei CML-Patienten und deren Spendern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 163 CML-Patienten und deren Spender untersucht. 94 der Patienten wurden mit HLA-identischen Geschwisterspendern (ISD) transplantiert, 69 Patienten aus der Kohorte erhielten Knochenmark bzw. periphere Blutstammzellen von HLA-kompatiblen unverwandten Fremdspendern (MUD). Die Auswahlkriterien der Patientenkohorte sind in Kapitel 2.1.2 beschrieben.

Die in der Patientenkohorte häufigsten HLA-A Merkmale waren HLA-A2 (n=100 Patienten), -A3 (n=54), -A1 (n=45) und HLA-A24 mit 28 Patienten (Tab. 26). Von den 30 in der Patientenkohorte vorkommenden HLA-B Merkmalen waren HLA-B7 (n=49), -B44 (n=42), -B8 (n=34) und HLA-B35 mit 30 Patienten die häufigsten (Tab. 27).

Weiterhin wurde die Zugehörigkeit der Patienten/Spender-Paare zu HLA-Klasse I-Supertypen untersucht, die HLA-Merkmale mit vergleichbaren Peptid-Bindungseigenschaften zusammenfassen (1.1).

Aufgeschlüsselt nach den HLA-Klasse I-Merkmalen der Patienten ergab sich folgende Verteilung innerhalb der Patientenkohorte (in Klammern jeweils die Angaben für die Pat./ISD-Paare und die Pat./MUD-Paare):

HLA-A2:	100 Paare (57 + 43)
HLA-A3 Supertyp (HLA-A3, A11, A31, A33, A*68):	73 Paare (41 + 32)
HLA-B7 Supertyp (HLA-B7, B35, B51, B53, B55, B56):	81 Paare (46 + 35)
HLA-B44 Supertyp (HLA-B37, B41, B44, B45, B47, B49, B50, B60, B61):	74 Paare (39 + 35)

3.6 Verteilung der mHag-Allele bei CML-Patienten und deren verwandten sowie unverwandten Spendern

Die Testung der HA-1-, CD31- und CD49b-Allele aller 163 CML-Patienten mit ihren Spendern erfolgte unter den etablierten Testbedingungen mittels PCR-SSP (2.2.8).

Die bei den Patienten und ihren Spendern ermittelten Allelfrequenzen für HA-1, CD31 und CD49b zeigten keinen signifikanten Unterschied zu denen bei Normalpersonen (3.1, Tab. 23). Auch die in der Patienten/Spender-Gruppe detektierten CD31-Haplotypen entsprachen denen, die zuvor in der Segregationsanalyse beschrieben wurden (3.4). Die Patientin C3 der Familie Nr. 6404 wurde mit dem neuen CD31-Haplotyp aufgrund ihrer CML-Erkrankung in die Analyse mit eingeschlossen.

mHag	Allel-Frequenzen		
	CML-Patienten (n= 163)	ISD (n= 94)	MUD (n= 69)
CD31 Kodon 80 V	1,00	1,00	1,00
CD31 Kodon 80 M	0	0	0
CD31 Kodon 125 V	0,57	0,53	0,54
CD31 Kodon 125 L	0,43	0,47	0,46
CD31 Kodon 563 N	0,53	0,51	0,54
CD31 Kodon 563 S	0,47	0,49	0,46
CD31 Kodon 670 G	0,54	0,51	0,54
CD31 Kodon 670 R	0,46	0,49	0,46
HA-1 H	0,35	0,37	0,37
HA-1 R	0,65	0,63	0,63
CD49b Kodon 505 E (HPA-5a ¹¹)	0,91	0,92	0,95
CD49b Kodon 505 K (HPA-5b ¹¹)	0,09	0,08	0,05

Tab. 23: mHag-Allelfrequenzen der getesteten 163 CML-Patienten und ihrer 94 ISD bzw. 69 MUD, mHag als AS angegeben (Ein-Buchstaben-Nomenklatur), ¹¹ CD49b-Allelfrequenzen bei 86 Pat./ISD-Paaren bzw. 68 Pat./MUD-Paaren ermittelt

3.7 Alter und aGvHD-Inzidenz innerhalb der Patientenkohorte

Vor weiteren Untersuchung zur Relevanz von mHag auf den klinischen Verlauf nach HSCT wurde zunächst das Alter der CML-Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation zweifach untersucht: Dazu erfolgte ein Vergleich zwischen den Patienten mit ISD und denen, die mit einem unverwandten Spender transplantiert wurden (Tab. 24), sowie eine Korrelation des Patientenalters mit der Verteilung der mHag-Inkompatibilitäten (Tab. 25). Weiterhin wurden mögliche Unterschiede in der akuten GvHD-Inzidenz zwischen der Gruppe der Patienten mit ISD und der Gruppe der Patienten mit MUD untersucht.

Im Ergebnis zeigten sich zwischen den zwei Patientengruppen sowohl bei der Betrachtung der klinisch relevanten aGvHD (Grad II bis IV, $\chi^2=2,62/P=0,11$) als auch der schweren aGvHD (Grad III und IV, $\chi^2=0,01/P=0,92$) keine signifikanten Unterschiede in der aGvHD Inzidenz.

Auch das Alter der Patienten unterschied sich in den zwei Gruppen nicht signifikant voneinander ($R^2=0,0008$; $P=0,74$; $-2,68-3,79$ 95% CI).

Nach Betrachtung der mHag-Verteilung bei den Patienten ergab sich keine signifikante Differenz im Durchschnittsalter zwischen mHag kompatiblen und inkompatiblen Paaren ($R^2 <0,001$; $P=0,94$; $-3,31-3,04$ 95% CI). Die Beurteilung „inkompatibel“ definiert sich durch das Vorhandensein eines oder mehrerer der getesteten mHag-Allele bei einem Patienten bei gleichzeitiger Abwesenheit des Allels (oder der entsprechenden Allele) bei dem zugehörigen Spender. In der beschriebenen *Mismatch*-Konstellation können mHag einen klinisch relevanten Einfluss auf den Verlauf der HSCT ausüben. Eine CD31-Inkompatibilität definiert sich durch die Anwesenheit eines oder mehrerer *Mismatches* in GvH-Richtung an den Positionen Kodon 125, 563 oder 670.

Entsprechend den unterschiedlichen CD31-Haplotypen bei Normalpersonen (3.4.1) wurden auch in den getesteten Kohorten von Patienten und Spendern unvollständige CD31-Differenzen in GvH-Richtung detektiert: Ein Patient/ISD-Paar wies eine Inkompatibilität nur für die Positionen Kodon 563 und Kodon 670 auf, ein weiteres nur für Kodon 670 (3.4.2). In der Gruppe der Patienten mit MUD wurden zwei Paare mit einer Inkompatibilität für die Positionen Kodon 563 und Kodon 670 sowie zwei weitere mit einer Inkompatibilität nur für Kodon 125 gefunden.

Spender	n	aGvHD 0 – I (n)	aGvHD II – IV (n)	aGvHD 0 – II (n)	aGvHD III + IV (n)
ISD	94	70	24 (25,5%)	80	14 (14,9%)
MUD	69	43	26 (37,7%)	59	10 (14,5%)
	163	$\chi^2=2,62$; $P=0,11$		$\chi^2=0,01$; $P=0,92$	

Tab. 24: Differenzen in der aGvHD-Inzidenz bei 94 Patienten mit ISD und solchen mit MUD (n=69), **Grad II bis IV: klinisch relevante GvHD, Grad III und IV: schwere GvHD**

Spender	n	Alter (SEM)	mHag	n	Alter (SEM)
ISD	94	39,83 (1,086)	kompatibel	83	40,07 (1,167)
MUD	69	40,38 (1,203)	inkompatibel	80	39,94 (1,121)
	163	R ² =0,0008; P=0,74		163	R ² =0,00005; P=0,94

Tab. 25: **links:** Patientenalter bei TX von Patienten mit ISD und mit MUD, **rechts:** Patientenalter bei TX von mHag-kompatiblen Patienten/Spender-Paaren und mHag-inkompatiblen Paaren, **SEM:** *standard error of mean*

Die Analyse des Patientenalters zum Zeitpunkt der Transplantation in den zwei untersuchten Gruppen sowie die Verteilung von mHag-Kompatibilitäten ergab keine statistisch signifikanten Differenzen.

Somit war die Zusammenfassung der zwei Gruppen von Patienten mit ISD und mit MUD zu einer Patientenkohorte für weitere Analysen zulässig.

3.8 Inzidenz akuter GvHD und mHag-Kompatibilität

3.8.1 Assoziation von mHag-Kompatibilität und aGvHD-Inzidenz bei Patienten mit bestimmten HLA-Merkmalen

Im Rahmen einer weiteren Auswertung wurde die Verteilung einzelner HLA-Klasse I-Merkmale in der Patientenkohorte untersucht. Anschließend erfolgte die Korrelation von mHag-*Mismatches* mit dem Vorliegen einer klinisch relevanten akuten GvH-Reaktion (Grad II - IV). Die statische Analyse wurde durch die Anwendung des χ^2 -Tests durchgeführt (2.2.9).

Im Ergebnis zeigte sich keine signifikant erhöhte aGvHD-Inzidenz bei Vorliegen bestimmter HLA-A-Merkmale, wenn zwischen Patient und Spender ein HA-1-, CD31- oder CD49b-*Mismatch* vorlag (Tab. 27). Die höchste aGvHD-Inzidenz von 41,7% konnte bei HLA-A2-positiven Patienten mit einer CD31-Inkompatibilität ermittelt werden (P=0,06, $\chi^2=3,45$). Ein HA-1 *Mismatch* konnte im Gegensatz zu publizierten Berichten nicht mit einer signifikant erhöhten aGvHD-Inzidenz bei HLA-A2-positiven Patienten assoziiert werden (P=0,31, $\chi^2=1,03$).

Bezüglich der HLA-B-Merkmale innerhalb der Patientenkohorte konnte eine erhöhte aGvHD-Inzidenz bei Vorliegen eines HA-1-*Mismatches* bei HLA-B35-positiven Patienten gezeigt werden

($P=0,048$, $\chi^2=3,91$, OR 7,0 1,292-37,92 95% CI, Tab. 28). Nach Korrektur durch Berücksichtigung der Anzahl der in der gesamten Patientenkohorte detektierten HLA-B-Allele (Bonferroni-Korrektur, 2.2.9) ergab sich ein P-Wert von $P_c=0,77$.

Ein CD49b-*Mismatch* konnte in keinem Fall mit einer erhöhten aGvHD-Inzidenz assoziiert werden. In der gesamten untersuchten Kohorte wiesen 12 Patienten eine CD49b-Inkompatibilität in GvH-Richtung auf, bei 11 von ihnen wurde eine aGvHD Grad 0 oder I diagnostiziert. Einer der Patienten zeigte eine aGvH-Reaktion Grad II.

3.8.2 mHag-Kompatibilität und aGvHD-Inzidenz bei in HLA-Supertypen eingeteilten Patienten

Nach Einteilung der Patienten in HLA-Supertypen zeigte sich nach Korrelation einzelner mHag-*Mismatches* mit der aGvHD-Inzidenz eine erhöhte aGvHD-Inzidenz (Grad II - IV) bei Vorliegen einer HA-1-Inkompatibilität bei Patienten, die HLA-Merkmale des HLA-B7-Supertyps aufwiesen ($P=0,036$, $\chi^2=4,39$, OR 3,44 1,21-9,82 95% CI, nach Korrektur $P_c=0,11$). Ein CD31- oder CD49b-*Mismatch* konnte nach Einteilung der Patienten in HLA-Supertypen mit keiner signifikant erhöhten aGvHD-Inzidenz assoziiert werden (Tab. 30).

Anschließend erfolgte eine Analyse der mHag-Kompatibilität insgesamt in der Patientenkohorte. Dazu wurde die Assoziation zwischen einem oder mehreren *Mismatches* der mHag HA-1, CD31 und CD49b und der aGvHD-Inzidenz untersucht (Tab. 30). Zusätzlich erfolgte die Trennung zwischen klinisch relevanter aGvHD (Grad II - IV) und schwerer aGvHD (Grad III und IV).

Von allen 163 Patienten wiesen 81 einen oder mehrere mHag-*Mismatches* in GvH-Richtung auf. Von den in HLA-Supertypen eingeteilten Patienten zeigte sich eine erhöhte aGvHD-Inzidenz (Grad II - IV) bei Vorliegen eines mHag-*Mismatches* in der HLA-B44-Supertyp positiven Patientengruppe ($P=0,07$, $\chi^2=3,30$, OR 2,49 0,91-6,74 95% CI, nach Korrektur $P_c=0,32$). Wurde die Häufigkeit der schweren aGvHD (Grad III und IV) untersucht, konnte keine erhöhte aGvHD-Inzidenz bei Vorliegen eines mHag-*Mismatches* gezeigt werden.

Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit CD49b-*Mismatch* und deren geringer aGvHD-Inzidenz (vgl. Tab. 27 bis Tab. 29) erfolgten weitere Untersuchungen ohne Berücksichtigung der CD49b-Verteilung innerhalb der Patientenkohorte.

3.8.3 Einfluss von HA-1- und CD31-Inkompatibilität auf die aGvHD-Inzidenz von HSCT-Patienten

Nach der Analyse der HA-1- und CD31-Inkompatibilitäten bei Patienten mit HLA-Merkmalen der zuvor beschriebenen HLA-Supertypen (Tab. 31), zeigte sich in der Gruppe der HLA-B44-Supertyp positiven Patienten eine signifikant erhöhte aGvHD-Inzidenz (Grad II bis IV) bei Vorliegen eines HA-1- und/oder CD31-*Mismatches* zwischen Patient und Spender gegenüber der Gruppe ohne Inkompatibilität ($P=0,018$, $\chi^2=5,65$, OR 3,36 1,21-9,35 95% CI, nach Korrektur $P_c=0,05$). Auch bei der Betrachtung der schweren aGvHD Grad III + IV war die Inzidenz in dieser Gruppe von Patienten erhöht: $P=0,028$, $\chi^2=4,82$, OR 3,82 1,10-13,28 95% CI, nach Korrektur $P_c=0,08$.

Nach Auswertung der Ergebnisse nur der mit einem MUD transplantierten Patienten zeigte sich eine höhere aGvHD-Inzidenz von 48,6% bei Vorliegen eines HA-1- und/oder CD31-*Mismatches* gegenüber 37,0% bei allen untersuchten Patienten (Tab. 33).

Auch in der Gruppe der HLA-A2-positiven Patienten (MUD) bzw. der Patienten mit bestimmten HLA-Supertypen (MUD) konnten höhere aGvHD-Inzidenzen ermittelt werden (HLA-B44-Supertyp: $P=0,028$, $\chi^2=4,83$, OR 6,42 1,44-28,52 95% CI, nach Korrektur $P_c=0,08$).

Patienten, die mehrere mHag-Inkompatibilitäten zu ihrem Spender aufwiesen, zeigten keine generell höhere aGvHD-Inzidenz gegenüber dem Rest der untersuchten Kohorte: Ein Patient (aGvHD Grad 0) mit ISD wies *Mismatches* bei allen drei in dieser Arbeit untersuchten mHag auf, acht weitere Patienten MUD zeigten CD31- und HA-1-Inkompatibilitäten. Letztere entwickelten ebenfalls keine überdurchschnittlich starken aGvH-Reaktionen (ein Fall Grad 0, vier Fälle Grad I, zwei Fälle Grad II und einmal Grad III).

Zur Korrelation der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten mit etablierten aGvHD-Risikofaktoren erfolgte eine multivariate Analyse (2.2.9). Nach Aufnahme aller für die Berechnung relevanten Daten standen für die Analyse 106 Patienten mit vollständigem Datensatz zur Verfügung.

Eine Berechnung der linearen, stufenweisen Regression nach Cox ergab einzig das Patientenalter (>37 Jahre) als signifikanten unabhängigen Risikofaktor für eine klinisch relevante aGvH-Reaktion ($P=0,042$, OR=2,48, 1,03-5,95 95% CI). Damit zeigte sich die Tauglichkeit des Datensatzes von jeweils 106 Patienten und Spendern, die durchgeführte Analyse mit der klinisch relevanten aGvHD als abhängiger Variable auszuwerten. Es gelang jedoch nicht, Inkompatibilitäten bei den mHag HA-1, CD31 oder CD49b ebenfalls als unabhängige Risikofaktoren zu etablieren (Tab. 26).

multivariate Analyse	unabhängige Variable	Statistik (Cox Regression, n=106 Patienten)
mit 6 Variablen	Patientenalter >37	P=0,042 OR=2,48 1,03-5,95 (95% CI)
	Spenderalter >37	P=0,23
	Sex-Mismatch	P=0,46
	HA-1-MM	P=0,82
	CD31-MM	P=0,86
	CD49b-MM	P=0,63
mit 4 Variablen	Patientenalter >37	P=0,042 OR=2,48 1,03-5,95 (95% CI)
	Spenderalter >37	P=0,23
	mHag-MM	P=0,43
	Sex-Mismatch	P=0,46

Tab. 26: Ergebnisse der multivariaten Analyse (Cox Regression, n=106 Patienten), **abhängige Variable:** klinisch relevante aGvHD Grad II-IV, MM: *Mismatch* in GvH-Richtung

3.9 Einfluss der Geschlechts-Kompatibilität von Spender und Empfänger auf die Entwicklung einer akuten GvH-Reaktion

Im Rahmen erster Versuche zur Transplantation allogener Gewebe sind Gene, die außerhalb des MHC auf dem Y-Chromosom liegen, mit der Transplantat-Abstoßung in Verbindung gebracht worden (1.2). Um den Einfluss Y-chromosomaler Gene auf den klinischen Verlauf nach HSCT zu vermeiden, wird bei mehreren alternativen Spendern nach Möglichkeit ein Geschlechtskompatibler Spender (d. h. ohne *Sex-Mismatch*) für die Transplantation herangezogen. Besonders bei HLA-identischen Geschwister-spendern kann jedoch häufig mangels alternativen Spenders keine Rücksicht auf einen *Sex-Mismatch* genommen werden.

In dieser Arbeit wurde auch ein möglicher Einfluss der Geschlechts-Inkompatibilität auf die aGvHD-Inzidenz in der untersuchten Patientenkohorte analysiert. Nach Ausschluss aller Pat./Spender-Paare mit *Sex-Mismatch* aus der Analyse verblieben 121 Patienten in der Kohorte mit ISD und MUD (Tab. 32).

Die aGvHD-Inzidenz (Grad II - IV) bei Vorliegen einer HA-1- und/oder CD31-Inkompatibilität wich mit 38,6% nicht signifikant von der Gruppe mit *Sex-Mismatch* ab (37,0%). Auch nach Einteilung

der Patienten in die HLA-Supertypen zeigten sich keine signifikant differenten aGvHD-Inzidenzen.

Die Berechnung der Inzidenz der schweren aGvHD Grad III und IV zeigte gegenüber der Gruppe aller 163 analysierten Patienten insgesamt etwas niedrigere Raten (bei allen Pat. 17,5% zu 19,2% mit *Sex-MM*).

In der multivariaten Analyse konnte das Vorliegen eines *Sex-Mismatches* nicht als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten einer klinisch relevanten aGvH-Reaktion etabliert werden (3.8.3).

HLA-	Patienten (n)	CD31 MM ¹² (n)	Pat. mit aGVHD > I bei CD31 MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei CD31 MM (%)	P / χ^2	HA-1 MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei HA-1 MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei HA-1 MM (%)	P / χ^2	CD49b MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei CD49b MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei CD49b MM (%)	P / χ^2
A1	45	16	5	31,3	0,18 / 1,82	8	1	12,5		2		0	
A2	100	24	10	41,7	0,06 / 3,45	26	9	34,6	0,31 / 1,03	7	1	14,3	
A3	55	12	6	50,0	0,66 / 0,19	18	8	44,4	0,85 / 0,04	5	1	20,0	
A11	12	3	1	33,3		2	1	50,0		1		0	
A23	3	1	1	100,0									
A24	28	10	3	30,0	0,86 / 0,03	6	4	66,7	0,12 / 2,40	1		0	
A25	7	1		0		2		0					
A26	4	2		0									
A28	9	2	1	50,0		1		0					
A29	8	4		0		2		0		1		0	
A30	2	1		0		2	1	50,0					
A31	10	3	1	33,3		1		0		2		0	
A32	17	5	3	60,0		5	2	40,0		2		0	
A33	5					2	2	100,0		1		0	

Tab. 27: Auflistung der bei Patienten (mit ISD und MUD, n=163) bestimmten HLA-A Merkmale. Zusätzlich ist die Verteilung der mHag CD31, HA-1 und CD49b angegeben und die MM-Häufigkeit mit dem Auftreten einer klinisch relevanten aGvHD assoziiert. Verzeichnet sind nur die niedrigsten P-Werte (χ^2 -Test), ¹² CD31 MM: Vorliegen einer oder mehrerer Inkompatibilitäten an den Positionen CD31 Kodon 125, 563 und 670, MM: *Mismatch*

HLA-	Patienten (n)	CD31 MM ¹² (n)	Pat. mit aGVHD > I bei CD31 MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei CD31 MM (%)	P / χ^2	HA-1 MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei HA-1 MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei HA-1 MM (%)	P / χ^2	CD49b MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei CD49b MM (n)	Pat. mit aGVHD > I bei CD49b MM (%)	P / χ^2
B7	49	14	4	28,6	0,70 / 0,15	9	5	55,6	0,15 / 2,12	5	1	20	
B8	34	9	3	33,3	0,49 / 0,47	5	1	20,0		2		0	
B13	12	4		0		2	1	50,0		2		0	
B14	10	2	2	100,0		3	2	66,7		1		0	
B18	14	3	1	33,3		2		0					
B27	8	3	1	33,3		2	1	50,0					
B35	30	8	2	25,0		10	7	70,0	0,048 / 3,91	3		0	
B37	4	2	2	100,0		1	1	100,0					
B38	5	2		0		1		0					
B39	6	4	1	25,0		1		0		1		0	
B41	4	1	1	100,0		1	1	100,0					
B44	42	12	6	50,0		13	6	46,2	0,61 / 0,25	4	1	25	
B45	3												
B47	1												
B49	5									1		0	
B50	5	1		0		3		0					
B51	14	6	2	33,3	0,31 / 1,01	2	1	50,0		1		0	
B55	5	1	1	100,0		2	1	50,0					
B56	4	1		0									
B57	7	2		0		2		0		1		0	
B58	3												
B60	16	3	1	33,3		6	2	33,3		1		0	
B61	4												
B62	24	7	2	28,6		6	1	16,7					
B63	2	2	1	50,0		1	1	100,0					

Tab. 28: Auflistung der bei Patienten (mit ISD und MUD, n=163) bestimmten HLA-B Merkmale. (vgl. Tab. 27)

HLA-Supertyp	Pat. (n)	CD31 MM ¹² (n)	Pat. mit aGvHD > I bei CD31 MM (n)	Pat. mit aGvHD > I bei CD31 MM (%)	P / χ^2	HA-1 MM (n)	Pat. mit aGvHD > I bei HA-1 MM (n)	Pat. mit aGvHD > I bei HA-1 MM (%)	P / χ^2	CD49b MM (n)	Pat. mit aGvHD > I bei CD49b MM (n)	Pat. mit aGvHD > I bei CD49b MM (%)	P / χ^2
A3	73	18	7	38,9	0,74 / 0,11	19	9	47,4	0,28 / 1,19	8	1	12,5	
B7	81	24	6	25,0	0,37 / 0,79	20	11	55,0	0,036/4,39	8	1	12,5	
B44	74	18	8	44,4	0,21 / 1,57	22	8	36,4	0,64 / 0,22	6	1	16,7	

Tab. 29: Auflistung der bei Patienten (mit ISD und MUD, n=163) bestimmten HLA-Klasse I Merkmale, zusammengefasst nach HLA-Supertypen (vgl. Tab. 27)

HLA-	Patienten (n)	mHag MM	Patienten mit aGvHD > I bei mHag MM (n)	Patienten mit aGvHD > I bei mHag MM (%)	P / χ^2	Patienten mit aGvHD > II bei mHag MM (n)	Patienten mit aGvHD > II bei mHag MM (%)	P / χ^2
A2	100	51	17	33,3	0,09 / 2,91	8	15,7	0,25 / 1,34
A3-Supertyp	73	35	16	45,7	0,21 / 1,54	9	25,7	0,45 / 0,57
B7-Supertyp	81	46	17	37,0	0,43 / 0,62	8	17,4	0,98
B44-Supertyp	74	32	14	43,8	0,07 / 3,30	8	28,6	0,14 / 2,15
alle Patienten	163	81	28	34,6	0,21 / 1,56	14	17,3	0,36 / 0,84

Tab. 30: Auflistung der bei Patienten (mit ISD und MUD, n=163) bestimmten HLA-Klasse I Merkmale, zusammengefasst nach HLA-Supertypen. mHag MM: Inkompatibilität bei einem oder mehreren der getesteten mHag (vgl. Tab. 27)

HLA-	Patienten (n)	HA-1/CD31 MM	Patienten mit aGvHD > I bei HA-1/CD31 MM (n)	Patienten mit aGvHD > I bei HA-1/CD31 MM (%)	P / χ^2	Patienten mit aGvHD > II bei HA-1/CD31 MM (n)	Patienten mit aGvHD > II bei HA-1/CD31 MM (%)	P / χ^2
A2	100	44	16	36,4	0,06 /3,50	8	18,2	0,09 /2,84
A3-Supertyp	73	29	15	51,7	0,09 /2,76	9	31,0	0,13 /2,34
B7-Supertyp	81	40	16	40,0	0,13 /2,26	8	20,0	0,52 /0,41
B44-Supertyp	74	26	13	50,0	0,018/5,65	8	30,8	0,03/4,82
alle Patienten	163	73	27	37,0	0,06 /3,62	14	19,2	0,15 /2,09

Tab. 31: Auflistung der bei Patienten (mit ISD und MUD, n=163) bestimmten HLA-Klasse I Merkmale, zusammengefasst nach HLA-Supertypen. Unterschieden wird nach aGvHD Grad II-IV und Grad III+IV, HA-1/CD31 MM: Inkompatibilität bei HA-1 und/oder CD31

HLA-	Patienten ohne Sex-MM (n)	HA-1/CD31 MM	Patienten mit aGvHD > I bei HA-1/CD31 MM (n)	Patienten mit aGvHD > I bei HA-1/CD31 MM (%)	P / χ^2	Patienten mit aGvHD > II bei HA-1/CD31 MM (n)	Patienten mit aGvHD > II bei HA-1/CD31 MM (%)	P / χ^2
A2	74	36	14	38,9	0,09 /2,87	6	16,7	0,09 /2,77
A3-Supertyp	54	23	11	47,8	0,38 /0,77	6	26,1	0,58 /0,31
B7-Supertyp	59	30	13	43,3	0,67 /0,18	5	16,7	0,77 /0,08
B44-Supertyp	55	24	11	45,8	0,12 /2,39	6	25,0	0,24 /1,36
alle Patienten	121	57	22	38,6	0,11 /2,59	10	17,5	0,29 /1,11

Tab. 32: Auflistung der bei Patienten ohne Geschlechts-Mismatch (mit ISD und MUD, n=163) bestimmten HLA-Klasse I Merkmale, zusammengefasst nach HLA-Supertypen.

HLA-	Patienten mit MUD (n)	HA-1/CD31 MM	Patienten mit aGvHD > I bei HA-1/CD31 MM (n)	Patienten mit aGvHD > I bei HA-1/CD31 MM (%)	P / χ^2	Patienten mit aGvHD > II bei HA-1/CD31 MM (n)	Patienten mit aGvHD > II bei HA-1/CD31 MM (%)	P / χ^2
A2	43	22	12	54,5	0,08 / 3,06	5	22,7	0,20 / 1,59
A3-Supertyp	32	18	8	44,4	0,36 / 0,85	3	16,7	0,85 / 0,03
B7-Supertyp	35	20	11	55,0	0,09 / 2,81	4	20	0,60 / 0,27
B44-Supertyp	35	17	11	64,7	0,028/4,83	6	35,3	0,08 / 3,15
alle Patienten	69	37	18	48,6	0,08 / 3,14	7	18,9	0,20 / 1,61

Tab. 33: Auflistung der bei Patienten mit MUD bestimmten HLA-Klasse I Merkmale, zusammengefasst nach HLA-Supertypen.

3.10 Untersuchung der cDNA Sequenz KIAA0223 bzw. der Aminosäure-Sequenz des HA-1-Genproduktes

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei Vorliegen eines HA-1-*Mismatches* zwischen Spender und HLA-B7-Supertyp positivem Empfänger eine höhere aGvHD-Inzidenz auftrat, als bei HLA-A2 positiven Patienten und HA-1-*Mismatch*.

Daher stellt sich die Frage, ob die Aminosäure-Sequenz der cDNA KIAA0223, die von Chromosom 19p13.3 exprimiert wird und als HA-1 Genort betrachtet werden kann (1.3), weitere Peptide enthält, die über andere HLA-Moleküle als HLA-A2 präsentiert werden können.

Als einziges Peptid des HA-1-Gens ist bisher das diallelische mHag HA-1 mit seiner Aminosäuresequenz VLHDDLLEA bzw. VLRDDLLEA durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten charakterisiert worden. Weiterhin wird eine Peptidsequenz diskutiert, welche den beschriebenen HA-1 Polymorphismus beinhaltet und über HLA-B60 präsentiert werden kann (Mommaas et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zur weiteren Aufklärung eine Analyse der KIAA0223 AS-Sequenz unter Verwendung des im Internet verfügbaren Programms *HLA Peptide Predictions* zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten von Peptiden zu bestimmten HLA-Spezifitäten (2.2.9). Dazu wurden alle potentiellen Nonamere, die in der Aminosäuresequenz der cDNA KIAA0223 lokalisiert sind, auf ihre Bindungsaffinitäten zu den HLA-Merkmalen HLA-A3, -A11, -A30, -A32, -B7, -B35, -B44 und HLA-B60 getestet. Ausgewählt wurden die HLA-Spezifitäten nach der Analyse der aGvHD-Inzidenz bei HA-1-inkompatiblen Spender-/Empfänger-Paaren und aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den im Rahmen der durchgeführten Assoziationsstudie analysierten HLA-Supertypen.

Position im HA-1-Gen ¹³	Nonamer	HLA-Spezifität	rel. Bindungsaffinität
Exon 7	LLYAKNMAK	HLA-A3	200
Exon 20	LPPENRASL	HLA-B7	120
Exon 22	AEVVVQVPY	HLA-B44	720
Exon 22	LEAGEAVVY	HLA-B44	540
Exon 23	SEASALGHL	HLA-B60	320

Tab. 34: Nonamere im HA-1-Gen mit hohen Bindungsaffinitäten zu den angegebenen HLA-Spezifitäten, ¹³ Exon-/Intron-Struktur nach Kaminski et al. (2000), Erklärungen im Text

Im Ergebnis konnten einige Nonamere mit hohen relativen Bindungsaffinitäten zu den genannten HLA-Spezifitäten beschrieben werden, deren Vorkommen in den Pat./Spender-Paaren eine hohe aGvHD-Inzidenz bei HA-1-*Mismatch* auftrat (Tab. 34). Zur Untersuchung der KIAA0223-Aminosäuresequenz hinsichtlich ihrer intrazellulären Prozessierung wurde das Programm *PaProC* herangezogen (2.2.9). Die Analyse der gesamten Sequenz bestätigte die Prozessierung der bekannten HA-1-Peptide VLHDDLLEA bzw. VLRDDLLEA.

3.10.1 Direkte Sequenzierung des 109 bp großen Exons Nummer 22 im HA-1-Gen

Aufgrund der geringen Größe von 109 bp (Kaminski et al., 2000) und der Vorhersage von zwei möglichen Nonameren mit hohen Bindungsaffinitäten zur HLA-Spezifität HLA-B44 wurde das Exon 22 im HA-1 Gen zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

Dazu erfolgte die direkte Sequenzierung (2.2.8.3) zur Suche nach Polymorphismen im kodierenden Bereich von Exon 22. Die Sequenzierung von 10 Normalpersonen (2.1.2) mit zuvor bestimmtem HA-1-Genotyp (HA-1 H,H) und 10 weiteren Normalpersonen mit dem Genotyp HA-1 R,R wurde durchgeführt. Unter der Annahme eines Kopplungs-Ungleichgewichtes zwischen Variationen innerhalb eines Gens sollte ein häufiger Polymorphismus durch die Testung von 20 Normalpersonen detektierbar sein.

Genomische DNA-Sequenz des HA-1-Genortes war in Form der Cosmid-Sequenz R28738 (GeneBank *Accession* Nr. AC004151) verfügbar, welche bei einer Größe von ca. 35 kb neben anderen bisher nicht näher charakterisierten Genen den größten Teil des HA-1-Gens beinhaltet (Lamerdin et al., 1998). Nach Zuordnung der Exon-Intron-Grenzen des HA-1-Gens durch Abgleichung der cDNA-Sequenz KIAA0223 mit der entsprechenden Region auf Cosmid R28738 erfolgte die Positionierung von generischen Amplifizierungs-Primern. Die in Kapitel 2.2.8.3 beschriebenen Reaktionsbedingungen ermöglichten die Amplifikation eines 2.552 bp großen Fragmentes unter der Verwendung der Primer HA-1 P8 und HA-1 P11 (dargestellt in Abb. 19). Anschließend erfolgte die direkte Sequenzierung mit den Primern HA-1 P13Seq in 5'-Richtung und HA-1 P18Seq in 3'-Richtung.

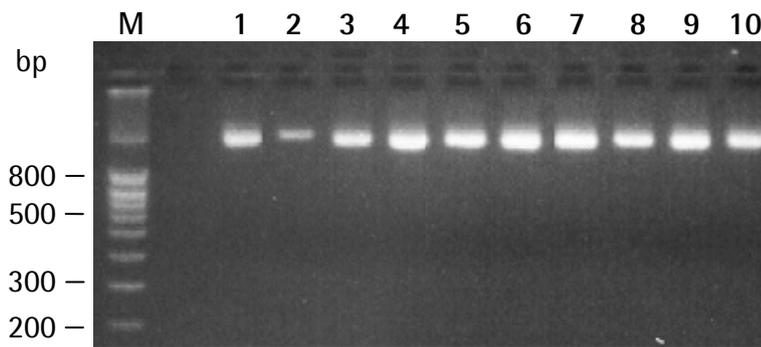


Abb. 19: generische PCR zur direkten Sequenzierung des Exon 22 im HA-1-Gen, ca. 2.500 bp-Fragment auf 2% Agarose (Primer HA-1 P8 + HA-1 P11), 1-10: Probanden 1 bis 10 (alle HA-1 H,H), M: Marker 100 bp ladder

3.10.2 Nachweis einer bisher unbeschriebenen Variation im HA-1-Gen

Die generischen Amplifikate aller 20 Normalpersonen wurden jeweils ca. 500 bp in der 5'- sowie in der 3'-Richtung sequenziert. Anschließend erfolgte ein *Alignment* der erhaltenen Sequenzdaten unter der Verwendung der *DNASTAR-Software* (2.2.9).

Die Vergleiche zwischen den neu gewonnenen Sequenzdaten und bereits aus Datenbanken verfügbaren Sequenzen (2.1.3) zeigten keine Polymorphismen in der kodierenden Region von Exon 22. Allerdings konnte ein Basenaustausch T → A an Position des Nukleotids 12.155 im an Exon 22 anschließenden Intron ca. 100 bp von der Exon-Intron-Grenze entfernt detektiert werden (Basenzuordnung gemäß der Sequenz des Cosmids R28738, Abb. 20).

Zwei der untersuchten Normalpersonen wiesen homozygot die Base Thymin auf (Probanden 15 und 20, beide HA-1 R,R). Fünf der Probanden trugen heterozygot die Basen Thymin und Adenin (A + T= W) und 12 Probanden waren homozygot für die Base Adenin an Position Nukleotid 12.155 (Abb. 21). Für Proband 11 konnten keine Sequenzdaten aus dem betroffenen Bereich generiert werden (Abb. 22). Die Probanden 1 bis 10 waren zuvor positiv für den Genotyp HA-1 H,H getestet, die Probanden 11 bis 20 dagegen nach ihrem HA-1-Genotyp HA-1 R,R ausgewählt worden. Eine vollständige Kopplung der HA-1-Varianten H und R und dem Dimorphismus an Nukleotid 12.155 konnte nach Testung der 20 Normalpersonen ausgeschlossen werden.

Eine Analyse der Sequenzdaten der ausgewerteten Probanden ergab eine Häufigkeit von 0,76 (Adenin) zu 0,24 (Thymin) der neu detektierten Variante.

```

11641 actttgttgg ccaggctggt ctogaactgc tgacctcaag tgatccgcac cccccttggc
11701 ctcctgaagt gctggggatta cagggtgtgag ccaactgcacg cggcgtctcg tattctttca
11761 atccatcttc cctgggtggt taggggctgc ggtttctcgg gtttctctt ggctgaggac
11821 agaccgcctg ggcaacacgcg ggtgtcagta gctgttacgg gctgtgtggg tgggtttggt
11881 aatttataac atggaaaatg gagccccggc ccctctatga cttccgttct gcacttgcag
11941 GACGAGTCAT CCAACCAGCG ASCTGAGGTA GTCGTCCAGG TGCCGTACTCT GGAGGCGGGC
12001 GAGGCGGTGG TCTACTCCGCT GCAGGAGGCG GCGGCGGACG GGTGCAGAGg tgagtgtgtg
12061 gctgcccga cggccccaa gagggtctgc gtgtgccacc catgggcgca ggtgccatga
12121 cctagtgtga cacacgtggc agggctccac gtgtggcaca ttctgtggat ttcgtctgcc
12181 acggagacca cacctatgag ctactcattc agtgtccttt aaccggctgc aaaaacaggc

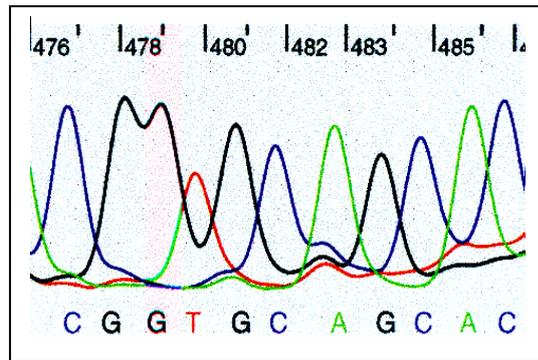
```

Abb. 20: Sequenzierung im HA-1-Gen (Exon 22, Cosmid R28738, Accession Nr. L34944) in 5'- und 3'-Richtung, **schwarz unterlegt**: Position der Sequenzier-Primer HA-1 P13Seq + HA-1 P18Seq, **Großbuchstaben**: Exonsequenz, **kleine Buchstaben**: Intronsequenz, **unterstrichen**: für Nonamere AEWVQVPY und LEAGEAVVY kodierende Sequenz, **eingrahmt**: Austausch T → A an Nukleotid 12.155

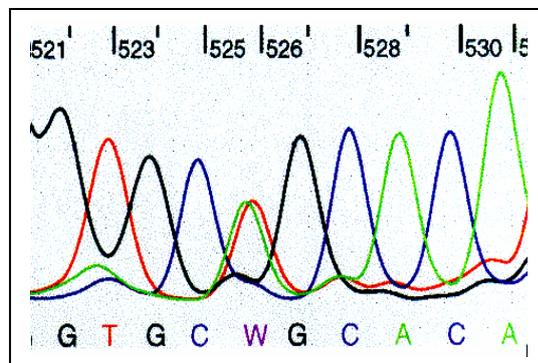
	451	465	466	480	481	495	496	510
Probe1	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGCCAC	-----	450
Probe2	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTTC		GT	-----	440
Probe3	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		-----		-----		421
Probe4	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CAT-CTGTGGATCGT		C	-----	429
Probe5	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC W GCA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGCCA	-----	424
Probe6	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGCCACGGAGAC		469
Probe7	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGCCACGGAGAC		451
Probe8	TACACACGTGGCAGG	-TCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGCCACGGAGA-		442
Probe9	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC W GCA		CATTCT		-----		432
Probe10	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC W GCA		CATTCTGTGATTT		---	-----	409
Probe11	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGG		-----		-----		394
Probe12	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTTCG		-----		431
Probe13	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGCCACGGAG-A		447
Probe14	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC W GCA		CATTCTGTGGAT---		-----		413
Probe15	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC T GCA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGC	-----	453
Probe16	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGAT---		-----		445
Probe17	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC W GCA		CATTCTGTGGATTTC		-----		488
Probe18	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGCCACGGAGAC		468
Probe19	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC AG CA		CATTCTGTGGATTGG		-----		437
Probe20	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC T GCA		CATTCT		-----		407
R28738	TACACACGTGGCAGG	GTCCACGGTGC T GCA		CATTCTGTGGATTTC		GTCTGCCACGGAGAC		

Abb. 22: *Multiple Sequence Alignment* (DNASTAR) der Sequenzen aus dem Intronbereich des HA-1-Gens, **Probe1 - Probe20**: Sequenzdaten der Normalpersonen 1 bis 20 (1 bis 10: HA-1 H,H, 11 bis 20: HA-1 R,R), **R28738**: Sequenz aus Cosmid R28738, Accession Nr. L34944, **fett**: Nukleotid-Austausch T → A, alle Sequenzen in 5' → 3'-Richtung angegeben, Erklärungen im Text

Proband Nr. 12
(HA-1 R,R)



Proband Nr. 14
(HA-1 R,R)



Proband Nr. 15
(HA-1 R,R)

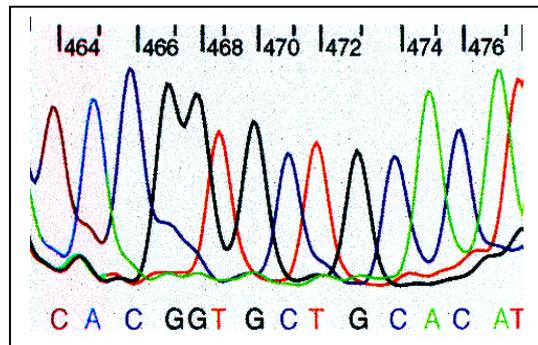


Abb. 21: Direkte Sequenzierung im HA-1-Gen mit den Primern HA-1 P13Seq + HA-1 P18Seq, Pfeile: Positionen des Basenaustausches T → A (W = T + A) im Intronbereich ca. 100 bp distal von Exon 22

4. Diskussion

Zahlreiche widersprüchliche Berichte über den Einfluss von minor Histokompatibilitäts-Antigenen (mHag) auf den klinischen Verlauf nach allogener Blutstammzell-Transplantation (HSCT) zeigen, dass die Frage nach der Relevanz von mHag für die HSCT noch immer nicht ausreichend geklärt ist (Behar et al., 1996; Maruya et al., 1998; Tseng et al., 1999; Murata et al., 2000; Grumet et al., 2001; Lin et al., 2001; Kögler et al., 2002; Rozman et al., 2003).

Zur Aufklärung der genannten Fragestellung (1.4) wurde in der vorliegenden Arbeit die Assoziation zwischen der Spender/Empfänger-Kompatibilität mehrerer mHag und dem Auftreten einer akuten GvH Reaktion nach allogener HSCT mit HLA-identischen Geschwisterspendern (ISD) und unverwandten Spendern (MUD) in einer Kohorte von 163 CML-Patienten untersucht.

Ziel der Untersuchungen war eine Evaluierung der Relevanz gut definierter mHag für die aGvHD-Entwicklung in einer eng definierten Patientenkohorte ohne zusätzliche Variablen, die ebenfalls die Entwicklung der aGvHD beeinflussen können, wie z. B. unterschiedliche hämatologische Grunderkrankungen, Unterschiede im Krankheitsstadium bzw. in der myeloablativen Behandlung oder HLA-*Mismatches* zwischen Spendern und Empfängern.

Somit war die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patientenkohorte außergewöhnlich homogen im Vergleich mit anderen Studien, die zwar z. T. höhere Fallzahlen aber auch die Kombination unterschiedlicher hämatologischer Erkrankungen aufwiesen (Tseng et al., 1999; Gallardo et al., 2001; Lin et al., 2001; Rozman et al., 2003).

4.1 Validierung der mHag-Testung mittels PCR-SSP-Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden die unterschiedlichen Allele der mHag HA-1 und CD31 sowie der CD49b-Polymorphismus HPA-5 durch die Anwendung einer einheitlichen PCR-SSP-Methodik untersucht, bei der für alle Testungen ein identischer PCR-Puffer eingesetzt wurde.

Für die CD31-Dimorphismen an den Positionen Kodon 80, 563 und 670 wurde die PCR-SSP-Methodik dabei erstmalig angewendet, da bisher für die genannten CD31-Dimorphismen PCR-RFLP- oder LIS-SSCP-Verfahren beschrieben wurden (Maruya et al., 1998; Balduini et al., 1999). Auch zum Nachweis des CD31-Dimorphismus G₃₇₃C, der zu einem Austausch Val₁₂₅Leu führt, sind neben der PCR-SSP in der Literatur mit der Sequenzierung und der PCR-RFLP sehr zeitintensive Nachweismethoden beschrieben (Behar et al., 1996; Nichols et al., 1996).

Auch die beiden nur durch 3 bp voneinander getrennten Dimorphismen im HA-1-Gen, die zur Ausprägung der beiden Allele HA-1 H bzw. HA-1 R führen sowie der CD49b Polymorphismus HPA-5 konnten mit der PCR-SSP-Methodik unter der Verwendung bereits beschriebener Primersequenzen zuverlässig dargestellt werden (3.1.2; 3.1.3).

Die Testung des CD49b-Polymorphismus HPA-5 erfährt breite Anwendung im Bereich der Diagnostik von Erkrankungen, die mit Variationen der Thrombozyten-Antigene assoziiert sind. Dazu werden neben biochemischen Typisierungsmethoden (Santoso et al., 1998) immer häufiger molekulargenetische Verfahren verwendet (Santoso S, 2000). Die in dieser Arbeit verwendeten Primer HPA5a und HPA5b, die in Kombination mit anderen sequenzspezifischen Primern zur Testung der Thrombozyten-Antigene HPA-1 bis 5 vom NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*/ UK) eingesetzt werden (<http://www.nibsc.ac.uk>), waren für die hier durchgeführten Untersuchungen problemlos verwendbar (Metcalf et al., 1999; Sellers et al., 1999).

Die in dieser Arbeit eingesetzte PCR-SSP-Methodik zur mHag-Testung wurde gut validiert: Die Verteilung aller mHag-Genotypen befand sich in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg Equilibrium (2.2.9) in der untersuchten Kohorte von Normalpersonen, wobei die geringste Abweichung zwischen der zu erwartenden und der tatsächlichen Allelverteilung bei den HPA-5-Genotypen zu verzeichnen war (3.3.3).

Die Häufigkeiten der vier in dieser Arbeit untersuchten mhag-Polymorphismen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Normalpersonen, CML-Patienten sowie deren Spendern (3.3; 3.6). Die in der japanischen Bevölkerung seltene CD31-Variante mit der Aminosäure Methionin an Position Kodon 80 konnte sowohl bei den Normalpersonen als auch in der untersuchten Patienten/Spenderkohorte nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist die klinische Relevanz eines sehr seltenen mHag, wie die CD31 Variante Methionin an Position Kodon 80, kaum nachzuweisen, da eine *Mismatch*-Konstellation zwischen Spender und Empfänger statistisch gesehen äußerst selten auftritt.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auf die Testung des CD49b-Polymorphismus Sit^a, dessen Allelfrequenz 0,25% bei Kaukasiern beträgt (Santoso et al., 1999), in den Normalpersonen und der untersuchten Patienten/Spenderkohorte verzichtet.

Eine weitere Validierung der PCR-SSP-Methodik erfolgte durch Segregationsanalyse in 20 Familien mit 80 parental Haplotypen (3.4). Danach zeigte sich in einer Familie eine Abweichung von der in der japanischen Bevölkerung beschriebenen Kopplung der CD31-Allele an den

Positionen Kodon 563 und 670, wobei das Testresultat der PCR-SSP durch direkte Sequenzierung der betroffenen CD31 Exons 8 und 12 abgesichert wurde (3.4.2). In diesem Zusammenhang konnte durch den Einsatz des Pharmacia-Kits für die Sequenzierung eine deutlich verbesserte Qualität der Sequenzdaten gegenüber der Chemie von der Firma Visible Genetics erzielt werden (2.1.7).

Da nur die betroffenen Exonbereiche im CD31 Gen sequenziert wurden, war keine Aussage über die genomische Lokalisation des Ortes einer möglichen Rekombination möglich.

Alle in der Segregationsanalyse detektierten CD31-Haplotypen wiesen, neben der neu beschriebenen Allel-Kombination in Exon 8 und Exon 12, keine signifikant von der Häufigkeit in der japanischen Bevölkerung abweichende Verteilung auf (3.3 und 3.6).

4.2 Klinische Relevanz der untersuchten mHag für die allogene Blutstammzell-Transplantation

Durch eine multivariate statistische Auswertung der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten konnten Inkompatibilitäten bei den untersuchten mHag nicht als unabhängige Risikofaktoren für eine klinisch relevante aGvHD nach HSCT gegenüber bekannten Risikofaktoren etabliert werden (3.8.3). Einzig das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation wurde als statistisch signifikanter aGvHD-Risikofaktor nach multivariater Analyse bestätigt (vgl. Ottinger et al., 2003).

Allerdings haben die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass in der untersuchten Patientenkohorte eine signifikant erhöhte aGvHD-Inzidenz bei CML-Patienten nach Transplantation zu verzeichnen war, die positiv für den HLA-B44-Supertyp waren und eine CD31- bzw. HA-1-Inkompatibilität zu ihrem Spender aufwiesen (3.8.3). Diese mit einem korrigierten P-Wert von $P_c=0,05$ relativ schwache Assoziation befindet sich aber in Übereinstimmung mit Daten aus Japan, die eine auf HLA-B44 beschränkte Präsentation von möglichen Peptiden aus dem CD31 Exon 12 diskutierten (Maruya et al., 1998). Nach Analyse ausschließlich der CD31-*Mismatches* und dem Auftreten einer aGvH-Reaktion konnte in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu den Ergebnissen von Maruya et al. keine signifikante Assoziation gefunden werden.

Auch die mehrfach beschriebene erhöhte aGvHD-Inzidenz bei Vorliegen einer HA-1-Inkompatibilität in HLA-A2-positiven Patienten (vgl. 1.3 und 3.8.1) wurde in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt. Damit finden sich Übereinstimmungen zu neueren Arbeiten: Eine Studie mit großen Fallzahlen der Arbeitsgruppe von P. J. Martin und J. A. Hansen aus Seattle mit 229 HLA-A2-positiven Patienten und unterschiedlichen hämatologischen Grunderkrankungen

ergab nur eine schwache Assoziation von erhöhter aGvHD-Inzidenz bei Vorliegen einer HA-1-Inkompatibilität (Tseng et al., 1999), während nach Steigerung der Fallzahl auf 615 Patienten keine signifikante Assoziation mehr zu verzeichnen war (Lin et al., 2001). Eine japanische Studie mit 60 HLA-A2-positiven Patienten einer Kohorte ohne Geschlechts-Inkompatibilität und mit identischer myeloablativer Konditionierung konnte ebenfalls keine Assoziation von erhöhter aGvHD-Inzidenz und Vorliegen einer HA-1-Inkompatibilität beschreiben (Murata et al., 2000). Gleiches gilt für eine multizentrische australische Studie mit 129 Patienten (Tait et al., 2001).

Weitere Analysen unterschiedlicher Konstellationen zeigten in der vorliegenden Arbeit außer Trends keine signifikant erhöhten aGvHD-Inzidenzen innerhalb der Patientenkohorte (3.8 und 3.9). Auch ein Vorkommen mehrerer mHag-*Mismatches* zwischen Patient und Spender resultierte in der untersuchten Kohorte nicht in einer erhöhten aGvHD-Rate (3.8.3).

In diesem Zusammenhang diskutierte P. J. Martin schon vor einigen Jahren zur Klärung der Relevanz einer mHag-Testung für die allogene HSCT die Fragestellung, ob eine Testung mehrerer mHag-Loci zu einer generellen Verbesserung des klinischen Verlaufs nach Transplantation führen kann (Martin PJ, 1997). In dieser Arbeit konnte diesbezüglich kein quantitativer Effekt multipler mHag-*Mismatches* gezeigt werden (3.8).

4.3 Bedeutende Risikofaktoren für eine akute GvH-Reaktion

Die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte aGvHD Inzidenz bei HLA-B44 Supertyp-positiven CML-Patienten kann möglicherweise auch auf unterschiedliche immunologische Eigenschaften der Spender-Lymphozyten zurückzuführen sein, die unterschiedliche HLA-Merkmale tragen. Schon seit längerer Zeit ist im Rahmen der Blutstammzell-Transplantation bekannt, dass bestimmte HLA-Antigene der Patienten mit einer unterschiedlich starken Ausprägung der aGvHD assoziiert sind. Ein erhöhtes Risiko für eine aGvHD ist beispielsweise für Empfänger mit den Merkmalen HLA-A29, HLA-B21 oder HLA-B44 beschrieben worden (Smyth et al., 1993), während für das Vorkommen eines HLA-B8, -DR3 Haplotyps ein protektiver Effekt gegenüber der GvH-Reaktion gezeigt werden konnte (Weisdorf et al., 1991). Als biologische Ursache für diese Beobachtungen sind u. A. auch minor Histokompatibilitäts-Antigene diskutiert worden.

Allerdings konnte eine neuere Studie aus Seattle mit großen Fallzahlen diese Effekte nicht bestätigen: Nach Auswertung von über 2.500 Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Grunderkrankungen nach allogener Blutstammzell-Transplantation mit HLA-identischen Spendern konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen HLA-Antigenen und der aGvHD-Inzidenz festgestellt werden (Martin et al., 1998).

Ein weiterer entscheidender Faktor, der die Entwicklung einer GvH-Reaktion modulieren kann, ist der Grad der Dekontamination des Verdauungstraktes bei Patienten vor HSCT. Arbeiten aus der hiesigen Klinik für KMT haben zweifelsfrei gezeigt, dass eine gnotobiotische Behandlung der Patienten vor der Transplantation eine ausführliche intestinale Dekontamination zur Folge hat, die zu einer generell niedrigen aGvHD-Inzidenz aller Patienten nach HSCT führt (Beelen et al., 1999).

Eine geringe aGvHD-Inzidenz ist weiterhin Folge einer guten Spenderauswahl bezüglich der HLA-Übereinstimmung zwischen Empfänger und Spender. Sie wird durch die Berücksichtigung der im Deutschen Konsensus für die immungenetische Spenderauswahl im Rahmen der Blutstammzell-Transplantation festgelegten Kriterien sichergestellt (Ottinger et al., 1997; Ottinger et al., 2001).

Studien haben gezeigt, dass Inkompatibilitäten der HLA-Klasse I-Merkmale HLA-A und HLA-B sowie der HLA-Klasse II-Merkmale HLA-DRB1 und HLA-DQB1 zwischen Spender und Empfänger den klinischen Verlauf nach Transplantation negativ beeinflussen können (Ferrara et al., 1991; Ottinger et al., 2003). Allerdings scheinen Inkompatibilitäten an den HLA-DRB1 und HLA-DQB1 Genorten einen stärkeren Effekt als HLA-Klasse I-*Mismatches* auszuüben. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgten daher an einer Patientenkohorte mit auf Basis des Deutschen Konsensus ausgewählten HLA-identischen Spender-Empfänger-Paaren. Dieser empfiehlt eine niedrig bis mittel auflösende HLA-Klasse I-Testung („2-digits level“) sowie eine hoch auflösende HLA-Klasse II-Testung der Genorte HLA-DRB1 und DQB1 („4-digits level“).

Eine HLA-Differenz in GvH-Richtung, deren Vorkommen deutlich mit dem Auftreten einer aGvH-Reaktion oder eines Transplantatversagens assoziiert ist, würde die Beobachtung von Auswirkungen der mHag-Inkompatibilitäten auf die aGvHD nach Transplantation in der Patientenkohorte verhindern, da ein HLA-*Mismatch* mögliche mHag-*Mismatches* immer dominiert (Goulmy E, 1997).

Den HLA-Klasse II-Merkmalen fällt durch ihre Präsentation vornehmlich exogener Peptide eine untergeordnete Rolle bei der Funktion als mHag-präsentierende Moleküle zu, da minor Histokompatibilitäts-Antigene Fragmente endogener Peptide darstellen (1.1).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch das Alter zum Zeitpunkt der Transplantation der mit einem Geschwisterspender und mit einem Fremdspender transplantierten CML-Patienten untersucht. Diese Analyse ergab keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen verwandter und unverwandter Konstellation (3.7). Für die Entwicklung einer klinisch relevanten akuten GvH-Reaktion spielt das Alter der Patienten allerdings eine Rolle: Nach einer multivariaten Analyse der

erhobenen Daten konnte sich nur das fortgeschrittene Patientenalter (> 38 Jahre) als statistisch signifikanter ($P=0,042$) unabhängiger aGvHD-Risikofaktor etablieren (3.8.3).

Fortgeschrittene Stadien der hämatologischen Grunderkrankungen der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation bedeuten ebenfalls eine schlechtere Prognose für den klinischen Verlauf nach Transplantation, was jedoch für diese Arbeit nicht von Bedeutung war, da alle in dieser Studie eingeschlossenen CML-Patienten sich in ihren ersten chronischen Phase befanden.

Der Grad der Übereinstimmung der HLA-Merkmale zwischen Empfänger und Spender sowie die intestinale Dekontamination beim Patienten vor der Transplantation sind also neben dem fortgeschrittenem Patientenalter und dem Krankheitsstadium bedeutende Einflussfaktoren für die Entwicklung einer akuten GvH-Reaktion nach Blutstammzell-Transplantation (Ottinger et al., 2003).

4.4 Auswirkungen weniger relevanter aGvHD-Einflussfaktoren

Es hat sich gezeigt, dass die Art des verwendeten Transplantats (Stammzellen, die aus dem Knochenmark des Spenders gewonnen wurden oder periphere Blutstammzellen) wie auch der CMV-Status von Spender und Empfänger keinen Einfluss auf die aGvHD-Inzidenz ausüben (Bensinger et al., 2001; Ottinger et al., 1996 und 2003; Elmaagacli et al., 2002). Allerdings existieren auch gegensätzliche Arbeiten, die gezeigt haben, dass die Transplantation von aus dem peripheren Blut entnommenen Stammzellen eine bessere Überlebensrate oder ein effizienteres Angehen des Transplantats ermöglichte (vgl. Bensinger et al., 2001).

Genetische Polymorphismen, die zu Variationen bei unterschiedlichen Zytokinen führen ($TNF\alpha$, IL-10, u. A.) wurden als aGvHD-modulierende Faktoren ebenfalls mehrfach diskutiert, wobei auch hier die klinische Relevanz weiterhin unklar ist (Hill et al., 1998; Middleton et al., 1998; Liem et al., 1999; Cavet et al., 1999).

Eine auftretende akute GvH-Reaktion lässt sich durch die heute im Rahmen der HSCT eingesetzten Immunsuppressiva wesentlich effizienter im Vergleich zu früher kontrollieren (vgl. Mughal et al., 2000). Auch werden andere Verfahren zur Aufarbeitung der vom Spender gewonnenen Blutstammzellen, wie beispielsweise die T-Zell Depletion, die das Auftreten einer GvH-Reaktion nach Transplantation weiter reduzieren, häufiger klinisch eingesetzt. Allerdings führt ein Entfernen der Spender-T-Lymphozyten aus dem Transplantat neben dem Ausbleiben einer GvH-Reaktion auch zu einem erhöhten Rezidiv-Risiko, da ein nützlicher *graft-versus-leukemia*-Effekt (GvL-Effekt) der T-Lymphozyten des Spender-Immunsystems ebenfalls ausbleibt.

CML-Patienten mit einem T-Zell depletierten Transplantat wurden aus der vorliegenden Studie ausgeschlossen (2.1.2).

4.5 Geschlechts-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger (*Sex-Mismatch*)

Auf dem humanen Y-Chromosom sind einige mHag-Loci definiert worden, die mit „H-Y“ bezeichnet und über unterschiedliche HLA-Spezifitäten präsentiert werden (1.3). Die vorliegende Arbeit zeigte, dass eine Geschlechts-Inkompatibilität (*Sex-Mismatch*) zwischen Spender und Empfänger in der untersuchten Patientenkohorte nicht mit einer signifikant erhöhten aGvHD-Rate assoziiert ist (3.9). Damit finden sich Übereinstimmungen zu teilweise widersprüchlichen älteren Studien über die aGvHD-Inzidenz bei H-Y-inkompatibler Konstellation, von denen einige ebenfalls eine Abwesenheit eines „H-Y-Effektes“ beschreiben (Ramsey et al., 1982; Goulmy et al., 1996).

Auf dem Y-Chromosom lokalisierte H-Y-Gene wurden auch im Rahmen der Transplantation solider Organe untersucht. Bei der Nieren- und Lebertransplantation scheinen sie jedoch keinen Einfluss auf die Häufigkeit einer Abstoßung zu haben, wenn eine Geschlechts-Inkompatibilität zwischen HLA-identischen Spendern und Empfängern vorliegt (Ellison et al., 1994). In diesem Zusammenhang spielen möglicherweise die unterschiedliche Immundominanz der minor Histokompatibilitäts-Antigene sowie die Entwicklung einer effizienten mHag-abhängigen Immunantwort eine Rolle. Ein *in vitro*-Nachweis mHag-spezifischer CTLs muss noch nicht eine erfolgreiche Immunantwort *in vivo* bedeuten, die bis zu einer Abstoßung eines transplantierten allogenen Spenderorgans führt.

4.6 Auswirkungen von mHag-Inkompatibilitäten auf die unverwandte allogene

Blutstammzell-Transplantation

Zu Beginn der KMT mit unverwandten Spendern vor ca. 20 Jahren (Hansen et al., 1980) wurde eine hohe Inzidenz von akuter und chronischer GvHD sowie eine deutlich erhöhte Rate von Transplantatsverlusten im Vergleich zur verwandten Transplantation beobachtet (Kernan et al., 1993; McGlave et al., 1993). Aufgrund der modernen Verfahren zur Immunsuppression und GvHD-Prophylaxe, die im Rahmen der HSCT heutzutage eingesetzt werden, gibt es mittlerweile allerdings kaum Unterschiede im klinischen Verlauf zwischen verwandter und unverwandter Transplantation bei CML-Patienten (Davies et al., 2001; Elmaagacli et al., 2002; Ottinger et al., 2003).

Zur Aufklärung einer möglichen Rolle der minor Histokompatibilitäts-Antigene im Rahmen der unverwandten HSCT wurden 69 CML-Patienten mit ihren HLA-kompatiblen Spendern (MUD) in die vorliegende Studie eingeschlossen. Die Analyse der aGvHD-Inzidenz in dieser Patientenkohorte mit MUD ergab keine signifikante Differenz zu der Patientenkohorte mit ISD (Tab. 25, 3.8.1). Dieser Befund befindet sich in Übereinstimmung mit dem aktuellen Stand der Diskussionen über die unverwandte HSCT, wie er von E. W. Petersdorf in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel diskutiert wurde (Petersdorf et al., 2003).

Die in den letzten Jahren zu verzeichnende Verbesserung der klinischen Verläufe nach unverwandter HSCT wird unter Anderem auch auf eine höhere HLA-Übereinstimmung zwischen dem Empfänger und seinem unverwandten Spender zurückgeführt, wie sie durch die Anwendung hoch auflösender HLA-Klasse I- und II-Testungen erreicht werden konnte (Hansen et al., 1999; Kassar et al., 2001). Eigenen Daten, die vom IFI und der hiesigen KMT-Klinik erhoben wurden, zeigten jedoch, dass *Mismatches* bei HLA-Klasse I-Subtypen keinen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf nach unverwandter allogener HSCT haben (Ottinger et al., pers. Mitteilungen). Möglicherweise besteht hier ein deutlicher Zentrumseffekt, der zu den unterschiedlichen Resultaten der Studien führt.

Weiterhin wird zur Zeit eine Einflussnahme von NK-Zell-spezifischen *killer inhibitory receptors* (KIRs) auf die GvH- und GvL-Effekte besonders im Rahmen der unverwandten HSCT intensiv diskutiert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass HLA-C *Mismatches* die GvH- und GvL-Effekte modulieren können, indem bestimmte HLA-C Moleküle mit definierten KIRs interagieren (zusammengefasst in Jones et al., 2003). Bisher standen allerdings hauptsächlich zytotoxische T-Zellen im Mittelpunkt der Untersuchungen von anti-Tumorzell-Effekten nach HSCT, die jedoch auch für die unerwünschte GvH-Reaktion verantwortlich sind. Erste, viel versprechende Arbeiten weisen daraufhin, dass eine Donor-NK-Zell-spezifische Alloreaktivität gegen leukämischen Zellen wirken kann und dabei gegen die GvHD schützt (Ruggeri et al., 2002; Faraq et al., 2002).

Der Einfluss von mHag auf die unverwandte allogene HSCT ist noch immer nicht ausreichend untersucht: Ein CD49b-*Mismatch* konnte mit einer geringeren Überlebensrate nach unverwandter HSCT assoziiert werden (Juji et al., 1999), während eine weitere Studie auch MUD in eine Analyse über den Einfluss von CD31 und HPA auf die aGvHD-Inzidenz nach HSCT einschloss.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten eine erhöhte aGvHD-Inzidenz bei HLA-B44 Supertyp-positiven CML-Patienten zeigen, die ein mHag *Mismatch* zu ihrem MUD aufwiesen.

Diese positive Assoziation wurde nach Bonferroni-Korrektur allerdings nicht bestätigt (3.8.2). Möglicherweise war die Fallzahl von n=69 CML-Patienten mit MUD für eine deutliche Signifikanz zu niedrig.

Die Bedeutung der Transplantation von unverwandten Blutstammzellen wird in Zukunft weiter zunehmen, da HLA-identische Spenderkandidaten innerhalb der Kernfamilie eines Patienten aufgrund der geringen Geburtenrate hierzulande immer seltener verfügbar sind. Besonders den nur partiell HLA-kompatiblen Mitgliedern der erweiterten Kernfamilie sind HLA-kompatible Fremdspender (MUD) heutzutage vorzuziehen (Elmaagacli et al., 2002; Ottinger et al., 2003).

4.7 Funktionelle Aspekte zur HLA-Klasse I-abhängigen mHag-Präsentation

Spezifische zytotoxische T-Lymphozyten sowie aus HLA-Molekülen eluierte mHag-spezifische Peptide sind die entscheidenden funktionellen Nachweise für die Charakterisierung von minor-Histokompatibilitäts Antigenen, die für die mHag HA-1, HA-2, HA-3 und HA-8 bereits beschrieben wurden (Goulmy et al., 1983 und 1997; Brickner et al., 2001; Pierce et al., 2001; Spierings et al., 2003). Einige mHag, wie auch die in dieser Arbeit untersuchten CD31-Varianten und CD49b, wurden bisher nur in Form von Peptid-Polymorphismen diskutiert, deren Variationen mit bestimmten klinischen Parametern im Rahmen der HSCT assoziiert sind (vgl. 1.3).

1998 konnten HA-1-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTLs) genauer charakterisiert werden. Es zeigte sich, dass nur das über HLA-A*0201 präsentierte HA-1 H-Peptid von spezifischen CTLs erkannt wird, was eine Differenzierung in „HA-1-positiv“ (d. h. der Proband trägt das Allel HA-1 H) und „HA-1-negativ“ für das Allel HA-1 R ermöglichte (den Haan et al., 1998). Eine auf diese Unterscheidung in HA-1-positiv und -negativ basierende Analyse der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten mit ihren Spendern konnte jedoch keinen entsprechenden Zusammenhang zeigen: Die aGvHD-Inzidenz von CML-Patienten mit einem HA-1 H-*Mismatch* in GvH-Richtung entsprach der von den Patienten mit einem HA-1 R-*Mismatch* in GvH-Richtung.

Für das bei Kaukasiern häufigste HLA-Klasse I-Merkmal HLA-A2 konnte gezeigt werden, dass 90-96% aller HLA-A2-positiven Probanden durch hoch auflösende HLA-A Testung positiv für HLA-A*0201 waren (Krausa et al., 1995; Fleischhauer et al., 1996; Szmania et al., 1997). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass fast alle HLA-A2-positiven Normalpersonen sowie CML-Patienten und Spender in der vorliegenden Arbeit auch das Merkmal HLA-A*0201 tragen, durch das das mHag HA-1 präsentiert wird (1.3).

Möglicherweise können die HA-1 Peptide VLHDDLLEA bzw. VLRDDLLEA jedoch auch über andere HLA-Spezifitäten als HLA-A*0201 dem T-Zell-Rezeptor präsentiert werden. Dazu wurden rechnergestützte Untersuchungen vorgenommen, die die dreidimensionale Struktur des Komplexes aus HLA-A*0201-Molekül und HA-1 H-Peptid auf andere HLA-Spezifitäten übertrugen (Ren et al., 2000). Im Ergebnis zeigte sich, dass das HA-1 R-Peptid auch durch HLA-A*1101 präsentiert werden kann, allerdings ist ein Nachweis durch spezifische CTLs bisher nicht erfolgt.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten nur zwei HLA-A11-positive Patienten mit einer HA-1-Inkompatibilität detektiert werden (vgl. Tab. 27), auch ergab sich keine erhöhte aGvHD-Inzidenz bei Patienten, die positiv für den HLA-A3 Supertyp waren, der auch HLA-A11 beinhaltet (vgl. Tab. 30).

Kürzlich konnte mit HA-8 ein weiteres mHag aus der von E. Goulmy 1997 ursprünglich beschriebenen Gruppe (vgl. Tab. 1) näher charakterisiert werden (Brickner et al., 2001): Das Peptid des mHag HA-8 wird ebenfalls über HLA-A*0201 präsentiert und stammt aus der Sequenz der cDNA KIAA0020, deren Genort auf dem humanen Chromosom 9 liegt. Zusätzlich erfolgte die Beschreibung HA-8-spezifischer CTLs. Die Peptidvarianten des mHag HA-8 zeigten jedoch keine unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zum HLA-A*0201-Epitop, wie für HA-1 beschrieben, sondern werden offenbar intrazellulär unterschiedlich prozessiert. Damit liegen Hinweise vor, dass die TAP-assoziierte Prozessierung die Präsenz einer mHag-Variante an der Zelloberfläche stärker beeinflussen kann als Interaktionen zwischen T-Zell-Rezeptor und HLA-Molekül, wie es bei HA-1 der Fall ist.

Auch das mHag HA-2 wurde vor kurzem genauer charakterisiert: HA-2 wird vom Genort MYO1G auf Chromosom 7 exprimiert und weist einen Dimorphismus auf, der zur Bildung der über HLA-A*0201 präsentierten Peptide YIGEVLSV bzw. YIGEVLSM führt (Pierce et al., 2001). Beide Varianten werden nicht gleichermaßen an der Zelloberfläche präsentiert. Als Ursache wurden hierzu wie auch für die unterschiedliche Präsentation der Varianten des mHag HA-3 (Spierings et al., 2003) ebenfalls Differenzen in der TAP-assoziierten Prozessierung diskutiert.

Die Fähigkeit von unterschiedlichen HLA-Molekülen aufgrund von Ähnlichkeiten in den Peptid-Bindemotiven gleiche Peptide zu binden, ist schon seit vielen Jahren bekannt (Schultz et al., 1976). Eine T-Zell-Rezeptor vermittelte Erkennung von Zellen, die das gleiche Peptid über unterschiedliche HLA-Moleküle präsentieren, wurde für über den HLA-A2 Supertyp präsentierte Melanom-assoziierte Antigene bereits beschrieben (Fleischhauer et al., 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CML-spezifische Peptide aus dem bcr-abl-Onkogen über HLA-A3, A11 und HLA-DR Moleküle präsentiert und von CTLs *in vitro* erkannt werden können (Bocchia et al., 1995).

Diese Daten validieren das Konzept der Einteilung von HLA-Spezifitäten in HLA-Supertypen, die ähnliche Peptide mit identischen Aminosäuren an den Ankerpositionen binden und den T-Zellen präsentieren können (Sidney et al., 1996; vgl. 1.1), das zusammen mit einer niedrig auflösenden HLA-A und -B Testung im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde.

Die Anwendung mHag-spezifischer zytotoxischer T-Zellen im Rahmen der HSCT wurde von einigen Arbeitsgruppen inzwischen diskutiert. So ist die *in vitro*-Genese von HA-1 spezifischen CTLs beschrieben worden, die zur Immuntherapie bei leukämischem Rezidiv eingesetzt werden können (Mutis et al., 1999; Brossart et al., 1999). Dazu wurden mit dem HA-1 H-Peptid stimulierte dendritische Zellen zur Genese von spezifischen CTLs verwendet, welche in der Lage waren, leukämische Zellen HA-1 H-positiver Patienten effizient zu lysieren, nicht hämatopoetische Zellen jedoch nicht. Ein ähnlicher Mechanismus konnte auch im Mausmodell beschrieben werden (Bonnet et al., 1999). Eine weitere mögliche Anwendung besteht in der *ex vivo*-Visualisierung von mHag-spezifischen CTLs, die während einer GvH-Reaktion auftreten können, unter der Verwendung von mit HA-1- bzw. H-Y-Peptiden beladenen HLA-Klasse I-Tetrameren (Mutis et al., 1999).

Neben dem Modell zur mHag-Wirkungsweise, dem ein an HLA-Klasse I gebundenes Peptid zur TCR-Präsentation zugrunde liegt (1.3), wurden im Bezug auf CD31 auch alternative Mechanismen diskutiert, die zu einer Assoziation von CD31-Variationen mit einer erhöhten aGvHD führen könnten: Möglicherweise fungiert der CD31-Genort als ein Marker für einen oder mehrere mHag-Gene mit höherer Immundominanz, die sich ebenfalls auf dem humanen Chromosom 17 in direkter Nachbarschaft zum CD31-Gen befinden (Gumina et al., 1995). Dabei wäre eine populationsabhängige Kopplung der Genorte denkbar, welche die widersprüchlichen Daten aus den Assoziationsstudien erklären könnte, die zwischen der japanischen und der kaukasischen Population bestehen.

Ein anderer Zusammenhang zwischen CD31 und der GvH-Reaktion besteht möglicherweise in den physiologischen Funktionen des Adhäsions- und Signaltransduktions-Moleküls CD31 und seinem regulativen Einfluss auf das Immunsystem (vgl. 1.3 und Newman PJ, 1997). Eine inhibierende Wirkung von CD31 auf die TCR-vermittelte Signaltransduktion wurde bereits nachgewiesen (Newton-Nash et al., 1999). Inwieweit die bekannten CD31-Polymorphismen diese physiologischen Funktionen des CD31 modulieren können, ist allerdings bisher noch nicht beschrieben worden.

Ein AS-Austausch von Valin nach Leucin an Molekülen auf der Zelloberfläche, wie er an der CD31-Position Kodon 125 vorliegt, kann zur Bildung von spezifischen Alloantikörpern führen (Milstein et al., 1974). Solche Alloantikörper ermöglichen beispielsweise die spezifische Unterscheidung der Varianten des humanen Plättchenantigens HPA-1 T₁₉₆C (Leu zu Pro, Newman et al., 1989). Auch die Abstoßung von allogenem Knochenmark konnte auf einen einzelnen AS-Austausch Leu₁₅₆Asp im HLA-B44-Merkmal zurückgeführt werden (Fleischhauer et al., 1990).

Durch die bis heute bekannten vielfältigen zellulären Mechanismen, in die das CD31-Molekül involviert ist, bestehen also neben der Präsentation von CD31-spezifischen Peptiden durch HLA-Moleküle weitere mögliche Effekte durch Sequenzvariationen, deren Einfluss auf den klinischen Verlauf von Patienten nach allogener HSCT noch aufgeklärt werden muss.

4.8 Beschreibung einer Intron-Variation im HA-1-Gen

Lange Zeit fehlten genaue Informationen über den Genort, der für die HA-1-Peptide kodiert. Erst 1998 gelang die Zuordnung einer bislang nicht näher charakterisierten und auf Chromosom 19p exprimierten cDNA mit der Bezeichnung KIAA0223 (Negase et al., 1996) zum mHag HA-1 (de Haan et al., 1998). Im gleichen Jahr wurde ein 3,5 Mb großes und auf Chromosom 19p13.3 kartierendes *Cosmid-Contig* publiziert, von dem einer der Klone Teile des die cDNA KIAA0223 kodierenden Gens enthält (vgl. 2.1.3, Lemerding et al., 1998). Diese Daten ermöglichten die Definition von Exon-Intron-Grenzen im putativen HA-1-Gen. Da nur ein Teil der für die HA-1-Peptide kodierenden Sequenz auf dem Cosmid R28738 enthalten ist, erfolgten weitere Arbeiten zur Aufklärung des HA-1-Genortes (Wilke et al., 1998; Tseng et al., 1998). Die exakte Kartierung des HA-1-Gens in die direkte Nähe des Transportermoleküls ABCA7 bestätigte die vorhergesagte Exon-Intron-Struktur (Kaminski et al., 2000).

Aufgrund der HA-1-Expression in hämatopoetischen Zellen besteht die Möglichkeit, dass neben den bereits über CTLs definierten HA-1-Peptiden VLHDDLLEA bzw. VLRDDLLEA auch andere Peptide aus dem HA-1-Genprodukt potentiell als mHag wirken können, sofern sie durch die intrazelluläre Prozessierung der Expression von HLA Klasse I-Molekülen zugeführt werden (3.10). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwar einige putative Peptide aus dem HA-1-Gen beschrieben, die über hohe Bindungsaffinitäten zu den untersuchten HLA-Spezifitäten verfügten, durch direkte DNA-Sequenzierung von 20 Normalpersonen konnten jedoch im untersuchten HA-1-Exon 22 keine Sequenzvariationen im kodierenden Bereich detektiert werden (3.10.2). Allerdings wurde ein bisher nicht beschriebener Basenaustausch Thymin nach Adenin im

anschließenden Intron mit einer Häufigkeit von 0,76 (A) zu 0,24 (T) gefunden, der keine vollständige Kopplung mit den HA-1-Allelen HA-1 H bzw. R aufweist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass es neben den beiden beschriebenen HA-1-Allelen weitere Variationen im HA-1-Gen gibt. Ein Einfluss des detektierten Intron-Polymorphismus auf die bisher unbekannt Funktion des HA-1-Genproduktes oder seine Expression ist jedoch unwahrscheinlich, da regulative genetische Elemente, deren Funktion durch die Variation betroffen sein könnte, in sich am 3'-Ende des Gens befindenden Introns in der Regel nicht vorkommen (vgl. Knippers R, 1995). Genomische Polymorphismen in bisher nicht näher untersuchten weiteren Exons des HA-1-Gens können dagegen durchaus zu AS-Austauschen führen. Ob diese möglichen Variationen allerdings in Form von Peptiden über HLA-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden und damit auch als mHag wirken können, hängt entscheidend von ihrer intrazellulären Prozessierung ab (2.2.9). Eine Analyse der proteasomalen Schnittstellen in der KIAA0223-Proteinsequenz bestätigte die Prozessierung der HA-1-Peptide VLHDDLLEA bzw. VLRDDLLEA (3.10).

4.9 Schlussbemerkung

Abschließend lässt sich feststellen, dass die vorliegenden Ergebnisse eine erhöhte aGvHD-Inzidenz bei CML-Patienten mit ausgewählten HLA-Allelen und einer mHag-Inkompatibilität zu ihren Spendern nach univariater Analyse zeigen konnten. Aufgrund der jedoch gegenüber den etablierten aGvHD-Risikofaktoren untergeordneten Relevanz einer mHag-Inkompatibilität, die in dieser Arbeit beschrieben wurde und der widersprüchlichen Datenlage in der Literatur besteht weiterhin die Notwendigkeit nach zusätzlichen Studien mit großen Fallzahlen, um einen klinisch relevanten Effekt von multiplen mHag-Inkompatibilitäten im Rahmen der HSCT sicher nachzuweisen.

Weiterhin sollte der Nachweis und die Definition von neuen, immunogenen mHag vorangetrieben und deren Relevanz für die HSCT untersucht werden, wie es bereits durch die internationale mHag-Arbeitsgruppe im Rahmen des 13. internationalen Histokompatibilitäts Workshops (13. IHWG) in Victoria/Kanada im Jahr 2002 begonnen worden ist.

Besonders erste Versuche über die Anwendung mHag-spezifischer zytotoxischer T-Zellen im Zusammenhang mit anti-Tumor Effekten (GvL-Reaktionen) eröffnen einen viel versprechenden Bereich, der über die reine molekulargenetische Charakterisierung von minor Histokompatibilitäts-Antigenen hinaus in Zukunft an klinischer Bedeutung gewinnen kann.

5. Zusammenfassung

Klinische und experimentelle Daten weisen daraufhin, dass bei Patienten nach allogener Blutstammzell-Transplantation (HSCT) trotz genotypischer HLA-Identität des Spenders in 30-40% der Fälle eine Graft-versus-Host (GvH) Reaktion auftreten kann, die durch zytotoxische alloreaktive T-Lymphozyten des Spenders ausgelöst wird. Bei genotypischer HLA-Identität zwischen Spender und Empfänger verbleibt somit als allogene Differenz die Aminosäuresequenz-Variation in den dem T-Zell Rezeptor präsentierten Peptiden. Dieser Peptid-Polymorphismus ist die Grundlage für Auslösung einer GvH-Reaktion. Deshalb werden die allelischen Ausprägungen der präsentierten Peptide als minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHag) bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mHag HA-1, CD31 und CD49b molekulargenetisch charakterisiert und deren allelischen Ausprägungen mit dem Auftreten einer akuten GvH Reaktion in einer gut definierten Patientenkohorte von 163 CML-Patienten und deren HLA-identischen Geschwisterspendern (n=94) sowie HLA-kompatiblen unverwandten Spendern (n=69) korreliert. Nach univariater Analyse ergab sich eine signifikante Assoziation von mHag-*Mismatch* und einer erhöhten aGvHD-Inzidenz in HLA-B44 Supertyp-positiven Patienten. Nach multivariater Untersuchung konnte jedoch einzig das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation als statistisch signifikanter aGvHD-Risikofaktor etabliert werden.

Zur mHag-Testung wurde eine einheitliche PCR-SSP Methodik eingeführt und in einem populationsgenetischen Ansatz durch die Untersuchung von Normalpersonen (n=201) sowie eine Segregationsanalyse in 20 Familien mit 80 parental Haplotypen validiert. Die Verteilung aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten mHag-Allele befand sich dabei im Hardy-Weinberg Equilibrium. Innerhalb der Segregationsanalyse konnte eine bisher unbekannt Allelkombination im CD31 Gen beschrieben werden, die durch eine entsprechende Sequenzierungsstrategie weiter aufgeklärt wurde.

Weiterführende Untersuchungen des für das mHag HA-1 kodierenden Gens KIAA0223 ergaben schließlich einen bisher unbeschriebenen T → A Polymorphismus im an das Exon 22 anschließenden Intronbereich.

Aufgrund der gegenüber den etablierten aGvHD-Risikofaktoren untergeordneten Relevanz der mHag und der widersprüchlichen Datenlage in der Literatur besteht weiterhin die Notwendigkeit nach zusätzlichen Studien mit großen Fallzahlen, um einen klinisch relevanten Effekt von multiplen mHag-Inkompatibilitäten im Rahmen der HSCT sicher nachzuweisen.

6. Literatur

- Allison JP, Lanai LL, Structure, function and serology of the T-cell antigen receptor complex, *Ann Rev Immunol*, **5**: 503 (1987)
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic Local alignment Search Tool, *J Mol Biol*, **215**: 403-410 (1990)
- Arostegui JI, Gallardo D, Rodriguez-Luaces M, Querol S, Madrigal JA, Garcia-Lopez J, Granena A, Genomic typing of minor histocompatibility antigen HA-1 by reference strand mediated conformation analysis (RSCA), *Tissue Antigens*, **56**: 69-76 (2000)
- Balduini CL, Noris P, Giorgiani G, Martinetti M, Klersy C, Spedini P, Belletti S, Maccario R, Gusberti L, Locatelli F, Incompatibility for CD31 and human platelet antigens and acute graft-versus-host-disease after Bone Marrow Transplantation, *Br J Haematol*, **106**: 723-29 (1999)
- Balduini CL, Frassoni F, Noris P, Klersy C, Iannone AM, Bacigalupo A et al. Donor-recipient incompatibility at CD31-codon 563 is a major risk factor for acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from a human leucocyte antigen-matched donor, *Br J Haematol*, **114**: 951 (2001)
- Beatty PG, Hervé P, Immunogenic factors relevant to acute graft-versus-host-disease. In: Burakoff SJ, Deeg HJ, Ferrara S, Atkinson K (eds), *Graft-versus-host-disease: Immunology, Pathophysiology and Treatment*, New York, Marcel Dekker, **12**: 415 (1990)
- Beck Y, Satz L, Takamiya Y, Nakayama S, Ling L, Ishikawa Y, Nagao T, Uchida H, Tokunaga K, Müller C, Juri T, Takiguchi M, Polymorphism of human minor Histocompatibility antigens: T cell recognition of human minor histocompatibility Peptides presented by HLA-B35 subtype molecules, *J Exp Med*, **181**: 2037-2048 (1995)
- Beelen DW, Peceny R, Elmaagacli A, Ottinger HD, Kummer G, Opalka B, Seeber S, Schaefer UW, Transplantation of highly purified HLA-identical sibling donor peripheral blood CD34+ cells without prophylactic post-transplant immunosuppression in adult patients with first chronic phase chronic myeloid leukemia: Results of a phase II study, *Bone Marrow Transplant*, **26**: 823-829 (2000)
- Beelen DW, Elmaagacli A, Müller K-D, Hirche H, Schaefer UW. Influence of intestinal bacterial decontamination using Metronidazole and Ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: Final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial, *Blood*, **93**: 3267 (1999)
- Behar E, Chao NJ, Hiraki DD, Krishnaswamy S, Brown BW, Zehnder JL, Grumet C, Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in graft versus host disease, *Blood*, **88**: 4429-34 (1996)
- Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers MED, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Appelbaum FR, Transplantation of Bone Marrow as compared with

- peripheral Blood Cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers, *N Engl J Med*, **344**: 175-181 (2001)
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC, Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature*, **329**: 506-512 (1987)
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC, The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens, *Nature*, **329**: 512-518 (1987)
- Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S et al., Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules, *Blood*, **85**: 2680 (1995)
- Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Ridell SR, CD8+ minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 8639-44 (1999)
- Bortin MM, Horowitz MM, Mrcic M, Rimm AA, Sobocinski KA, Progress in bone marrow transplantation for leukemia: A preliminary report from the advisory committee of the international bone marrow transplant registry, *Transplant Proc*, **23**: 61-80 (1991)
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davies RW, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am J Hum Genet* **32**: 314-331 (1980)
- Bray PF, Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for Thrombosis, *Curr Opin Hematol*, **7**: 284-289 (2000)
- Brickner AG, Warren EH, Caldwell JA, Akasaka Y, Golovina TN, Zarlring AL, Shabanowitz J, Eisenlohr LC, Hunt DF, Engelhard VH, Ridell SR, The Immunogenicity of a new Human Minor Histocompatibility Antigen results from Differential Antigen Processing, *J Exp Med*, **193**: 195-205 (2001)
- Brossart P, Spahlinger B, Grünebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W, Induction of minor Histocompatibility Antigen HA-1-specific Cytotoxic T Cells for the treatment of Leukemia after allogeneic stem cell transplantation, *Blood*, **94**: 4374-76 (1999)
- Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM, Recipient tumor necrosis factor- α and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host-disease severity in HLA-matched Sibling Bone Marrow Transplantation, *Blood*, **94**: 3941-46 (1999)
- Choi EY, Yoshimura Y, Christianson GJ, Sproule TJ, Malarkannan S, Shastri N, Joyce S, Roopenian DC, Quantitative analysis of the Immune Response to Mouse non-MHC Transplantation antigens in vivo: The H60 Histocompatibility antigen dominates over all others, *J Immunol*, **166**: 4370-4379 (2001)
- Choi EY, Christianson GJ, Yoshimura Y, Jung N, Sproule TJ, Malarkannan S, Joyce S, Roopenian DC, Real-time T-cell profiling identifies H60 as a major minor histocompatibility antigen in murine graft versus host disease, *Blood*, **100**: 4259-4265 (2002)

- Corral J, Rivera J, Gonzalez-Conejero R, Vicente V, The number of Platelet Glycoprotein Ia molecules is associated with the genetically linked 807 C/T and HPA-5 polymorphism, *Transfusion*, **39**: 372-78 (1999)
- Counce C, Smith P, Barter R, Snell GD, Strong and weak histocompatibility fine differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin, *Ann Surg*, **144**: 198 (1956)
- Cox DR, Regression models and life tables, *J R Stat Soc*, **34**: 187 (1992)
- DaCosta L, Charron D, Loiseau P, Does the adhesion molecule CD31 act as a minor histocompatibility antigen?, *Blood*, **90**: 1332-1340 (1997)
- Davies SM, DeFor TE, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE, Weisdorf DJ, Equivalent outcomes in patients with chronic myelogenous leukemia after early transplantation of phenotypically matched bone marrow from related or unrelated donors, *Am J Med*, **110**: 339-346 (2001)
- de Bueger M, Bakker A, van Rood JJ, van der Woude F, Goulmy E, Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens, *J Immunol*, **149**: 1788-1794 (1992)
- DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM, Molecular and functional aspects of PECAM-1, *Immunol Today*, **15**: 490-495 (1994)
- den Haan JMM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Blokland E, Bishop TL, Reinhardus C, Shabanowitz J, Offringa R, Hunt DF, Engelhard VH, Goulmy E, The minor Histocompatibility Antigen HA-1: A diallelic gene with a single amino acid Polymorphism, *Science*, **279**: 1054-57 (1998)
- den Haan JMM, Sherman NE, Blokland E, Huczko E, Koning F, Wouter Drijfhout J, Skipper J, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Goulmy E, Identification of a graft versus host disease-associated human minor Histocompatibility Antigen, *Science*, **268**: 1476-1480 (1995)
- Dolstra H, Fredrix H, Maas F, Coulie PG, Brasseur F, Mensink E, Adema GJ, de Witte TM, Figdor CG, van de Weil-van Kemenade E, A human minor Histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic Leukemia, *J Exp Med*, **189**: 301-308 (1999)
- Dupont B, Induction of the Minor into the Major league? Genomic identification of a human minor Histocompatibility antigen, *Tissue Antigens*, **52**: 303-304 (1998)
- Dzuris JL, Sidney J, Appella E, Chesnut RW, Watkins DI, Sette A, Conserved MHC class I peptide binding motif between Humans and Rhesus Macaques, *J Immunol*, **164**: 283-91 (2000)
- Elias III CG, Spellberg JP, Karan-Tamir B, Lin CH, Wang YJ, McKenna PJ, Muller WA, Zukowski MM, Andrew DP, Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils, *Eur J Immunol*, **28**: 1948-58 (1998)

- Ellison MD, Norman DJ, Breen TJ, Edwards EB, Davies DB, Daily OP, No effect of H-Y- minor Histocompatibility antigen in zero-*Mismatched* living-donor Renal transplants, *Transplantation*, **58**: 518-519 (1994)
- Elmaagacli A, Beelen DW, Trenn G, Schmidt O, Nahler M, Schaefer UW, Induction of a graft-versus-leukemia reaction by cyclosporine A withdrawal as immunotherapy for leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant*, **23**: 771-777 (1999)
- Elmaagacli A, Basoglu S, Peceny R, Trenschele R, Ottinger H, Lollert A, Runde V, Grosse-Wilde H, Beelen DW, Schaefer UW, Improved disease-free-survival after transplantation of peripheral blood stem cells with bone marrow from HLA-identical unrelated donors in patients with first chronic myeloid leukemia, *Blood*, **99**: 1130-1135 (2002)
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM, The biology of chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med*, **341**: 164-172 (1999)
- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA, Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect, *Blood*, **100**: 1935-1947 (2002)
- Ferrara JLM, Deeg HJ, Graft-versus-host disease, *New Engl J Med*, **324**: 667-674 (1991)
- Fleischhauer K, Kernan NA, O'Reilly RJ, Dupont B, Yang SY, Bone-Marrow allograft rejection by T-lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44, *N Engl J Med*, **323**: 1818-1822 (1990)
- Fleischhauer K, Zino E, Mazzi B, Severini GM, Benazzi E, Bordignon C, HLA-A*02 subtype distribution in Caucasians from northern Italy: identification of A*0220, *Tissue Antigens*, **48**: 673-79 (1996)
- Fleischhauer K, Tanzarella S, Wallny HJ, Bordignon C, Traversari C, Multiple HLA-A alleles can present an immunodominant peptide of the human melanoma antigen Melan-A/MART-1 to a peptide-specific HLA-A*0201+ cytotoxic T cell line, *J Immunol*, **157**: 787 (1996)
- Gallardo D, Arostegui JI, Balas A, Torres A, Caballero D et al., Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with increased risk of acute graft-versus-host-disease (aGvHD) but it does not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival or overall survival after allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling donor transplantation, *Br J Haematol*, **114**: 931-936 (2001)
- Garcia KC, Degano M, Pease LR, Huang M, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA, Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen, *Science*, **279**: 1166-1172 (1998)
- Goodfellow PN, Jones EA, van Heynigen V, Solomon E, Bobrow M, Miggiano V, Bodmer WF, The β 2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HLA region, *Nature*, **254**: 267-69 (1975)
- Gorer PA, The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera, *Brit J Exp Pathol*, **17**: 42-50 (1936)

- Götze D, The major histocompatibility system in man and animals, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977)
- Goulmy E, Gratama JW, Blokland E, Zwaan FE, van Rood JJ, A minor transplantation antigen detected by MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes during graft-versus-host disease, *Nature*, **302**: 159-161 (1983)
- Goulmy E, Human minor Histocompatibility Antigens: New concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy, *Immunological Reviews*, **157**: 125-140 (1997)
- Goulmy E, Minor histocompatibility Antigens in man and their role in transplantation. In: Morris J, Tilney NL (eds), *Transplantation Reviews*, **2**: 29-53 (1988)
- Goulmy E, Minor Histocompatibility antigens: From T cell recognition to peptide identification, *Hum Immunol*, **54**: 8-14 (1997)
- Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Frederik Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ, *Mismatches* of minor Histocompatibility Antigens between HLA-identical donors and the development of graft-versus-host disease after Bone Marrow Transplantation, *New Engl J Med*, **334**: 281-285 (1996)
- Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van Rood JJ, Alloimmunity to human H-Y, *Lancet*, **ii**: 1206 (1976)
- Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van Rood JJ, Y-antigen killing by T cells of women is restricted by HLA, *Nature*, **266**: 544-545 (1977)
- Goulmy E, Voogt P, van Els C, de Bueger M, van Rood JJ, The role of minor Histocompatibility antigens in GVHD and rejection: a mini-review, *Bone Marrow Transplant*, **7**: 49-51 (1991)
- Grumet FC, Hiraki DD, Brown BW, Zehnder JL, Zacks ES, Draksharapu A, Parnes J, Negrin RS, CD31 *Mismatching* affects marrow transplantation outcome, *Biol Blood Marrow Transplant*, **7**: 503-512 (2001)
- Gubarev MI, Jenkin JC, Leppert MF, Buchanan GF, Otterud BE, Guilbert DA, Beatty PG, Localisation to chromosome 22 of a gene encoding a human minor Histocompatibility antigen, *J Immunol*, **157**: 5448-54 (1996)
- Gumina RJ, Kirschbaum NE, Nagesh Rao P, vanTuinen P, Newman PJ, The human PECAM-1 gene maps to 17q23, *Genomics*, **34**: 229-232 (1996)
- Hansen J, Clift R, Thomas E et al., Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia, *New Engl J Med*, **303**: 565-567 (1980)
- Hansen JA, Yamamoto K, Petersdorf E, Sasazuki T, The role of HLA-matching in hematopoietic cell transplantation, *Rev Immunogenet*, **1**: 359-373 (1999)

- Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Keith JC, Brinson YS, Bungard D, Ferrara JLM, Interleukin-11 promotes T cell polarisation and prevents acute graft-versus-host-disease after allogeneic Bone Marrow Transplantation, *J Clin Invest*, **102**: 115-123 (1998)
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM, Graft-versus leukemia reactions after Bone Marrow Transplantation, *Blood*, **75**: 555-562 (1990)
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM, *Blood*, **75**: 555-562 (1990)
- Hua CT, Gamble JR, Vadas MA, Jackson DE, Recruitment and activation of SHP-1 protein-tyrosine Phosphatase by human Platelet-Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), *J Biol Chem*, **273**: 28332-340 (1998)
- Irle C, Beatty PG, Mickelson E, Thomas ED, Hansen JA, Anti-non-major histocompatibility complex alloreactive cytotoxic T cell clones occurring in vivo, following HLA-identical sibling bone marrow transplantation, *Transplant Proc*, **17**: 772-773 (1985)
- Jones DC, Young NT, Natural killer receptor repertoires in transplantation. *Eur J Immunogenetics*, **30**: 169 (2003)
- Juji T, Watanabe Y, Ishikawa Y, Fujiwara K, Tonami H, Tanaka H, Satake M, Akaza T, Tadokoro K, Kodera Y, Sasazuki T, Morishima Y, Takaku F, Human Platelet alloantigen (HPA)-5a/b Mismatch decreases disease-free survival in unrelated Bone Marrow Transplantation, *Tissue Antigens*, **54**: 229-234 (1999)
- Kaminski WE, Piehler A, Schmitz G, Genomic organisation of the human Cholesterol-responsive ABC Transporter ABAC7: Tandem Linkage with the Minor Histocompatibility Antigen HA-1 Gene, *Biochem Biophys Res Commun*, **278**: 782-789 (2000)
- Kasser NE, Legouvello S, Joseph CM, Salesses P, Rieux C, Cordonnier C, Vernat JP, Farcet JP, Bierling P, Kuentz M, High resolution HLA class I and II typing and CTLp frequency in unrelated donor transplantation: a single-institution retrospective study of 69 BMTs, *Bone Marrow Transplant*, **27**: 35-43 (2001)
- Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, Beatty PG, Champlin R, Filipovich A, Gajewski J, Hansen JA, Hensley-Downey PJ, McCullough J, McGlave P, Perkins HA, Phillips GL, Sanders J, Stroncek D, Thomas ED, Blume KG, Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program, *N Engl J Med*, **382**: 593-598 (1993)
- Kernan NA, Dupont B, Minor Histocompatibility Antigens and Marrow Transplantation, *N Engl J Med*, **354**: 323-324 (1996)
- Kirschbaum NE, Gumina RJ, Newman PJ, Organisation of the gene for human Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 shows alternatively spliced isoforms and a functionally complex cytoplasmic domain, *Blood*, **84**: 4028-37 (1994)
- Knippers R, Molekulare Genetik, 6. neubearbeitete Auflage, Stuttgart, New York (1995)

- Kögler G, Middleton PG, Wilke M, Rocha V, Esendam B, Enczmann J et al. Recipient cytokine genotypes for TNF- α and IL-10 and the minor histocompatibility antigens HY and CD31 codon 125 are not associated with occurrence or severity of acute GvHD in unrelated cord blood transplantation, *Transplantation*, **74**: 1167-1175 (2002)
- Korngold R, Pathophysiology of graft-versus-host disease directed to minor Histocompatibility antigens, *Bone Marrow Transplant*, **7**: 38-41 (1991)
- Krausa P, Brywka M, Savage D, Hui KM, Bunce M, Ngai JLF, Teo DLT, Ong YW, Barouch D, Allsop CEM, Hill AVS, McMichael AJ, Bodmer JG, Browning MJ, Genetic polymorphism within HLA-A*02: significant allelic variation revealed in different populations, *Tissue Antigens*, **45**: 223-231 (1995)
- Kreiter S, Wehler T, Landt O, Huber C, Derigs HG, Heß G, Rapid Identification of minor histocompatibility antigen HA-1 subtypes H and R using fluorescence-labeled oligonucleotides, *Tissue Antigens*, **56**: 449-452 (2000)
- Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, Nucleotide polymorphism in the $\alpha 2$ gene define multiple alleles that are associated with differences Platelet $\alpha 2\beta 1$ density, *Blood*, **92**: 2382-88 (1998)
- Kroll H, Gardemann A, Fechter A, Haberbosch W, Santoso S, The impact of the Glycoprotein Ia Collagen receptor subunit A₁₆₄₈G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction, *Thromb Haemost*, **83**: 392-6 (2000)
- Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ, Hereditary variation in Platelet $\alpha 2\beta 1$ density is associated with two silent polymorphisms in the $\alpha 2$ gene coding sequence, *Blood*, **89**: 1939-43 (1997)
- Kunicki TJ, Newman PJ, The molecular immunology of human Platelet proteins, *Blood*, **80**: 1386-1404 (1992)
- Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M, The molecular genetics of philadelphia chromosome-positive leukemias, *N Engl J Med*, **319**: 990-998 (1988)
- Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, Haderl KP, An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages, *J Mol Biol*, **298**: 417-29 (2000)
- Lamerdin JE, McCready PM, Skowronski E, Adamson AW, Burkhart-Schultz K, Gordon L, Kyle A, Ramirez M, Stilwagen S, Phan H, Valasco N, Garnes J, Danganan L, Poundstone P, Christensen M, Georgescu A, Avila J, Liu S, Attix C, Andreise T, Trankheim M, Maico-Keller G, Coefield J, Duarte S, Lucas S, Bruce R, Thomas P, Quan G, Kronmiller B, Arellano A, Montgomery M, Ow D, Nolan M, Trong S, Kobayashi A, Olsen AO, Carrano AV, Sequence analysis of a 3.5 Mb contig in human 19p13.3 containing a serine protease gene cluster, Submitted 19-Feb-1998, Joint Genome Institute, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA 94551, USA
- Liem LM, Fibbe WE, van Houwelingen HC, Goulmy E, Serum transforming growth factor- $\beta 1$ levels in Bone Marrow Transplant recipients correlate with blood cell counts and chronic graft-versus-host-disease, *Transplantation*, **67**: 59-65 (1999)

- Lin M-T, Gooley T, Hansen JA, Tseng L-H, Martin EG, Singleton K, Smith AG et al., Absence of statistically significant correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation, *Blood*, **98**: 3172-3173 (2001)
- Lunetta KL, Rogus JJ, Strategy for mapping minor Histocompatibility genes involved in graft-versus-host disease: A novel application of discordant Sib pair methodology, *Genet Epidemiol*, **15**: 595-607 (1998)
- Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DC, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA, Herzig RH, Hong R, Masaoka T, Rimm AA, Ringden O, Speck B, Weiner RS, Bortin MM, *Blood*, **78**: 2120-2130 (1991)
- Martin PJ, How much benefit can be expected from matching for minor antigens in allogeneic marrow transplantation?, *Bone Marrow Transplant*, **20**: 97-100 (1997)
- Martin PJ, Petersdorf EW, Anasetti C, Hansen JA, HLA homozygosity and the risk of graft-versus-host disease, *Tissue Antigens*, **50**: 119-123 (1997)
- Martin PJ, Gooley T, Anasetti C, Petersdorf EW, Hansen JA, HLAs and risk of acute graft-vs.-host disease after marrow transplantation from an HLA-identical sibling, *Biol Blood Marrow Transplant*, **4**: 128 (1998)
- Maruya E, Saji H, Seki S, Fujii Y, Kato K, Kai S, Hiraoka A, Kawa K, Hoshi Y, Ito K, Yokoyama S, Juji T, Evidence that CD31, CD49b and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants, *Blood*, **92**: 2169-76 (1998)
- McGlave P, Bartsch G, Anasetti C, Ash R, Beatty P, Gajewski J, Kernan NA, Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: Initial experience of the National Marrow Donor Program, *Blood*, **81**: 543-548 (1993)
- Metcalfe P, Cavanagh G, Hurd C, Ouwehand WH, HPA genotyping by PCR-SSP: Report of 4 exercises, *Vox Sang*, **77**: 40-43 (1999)
- Meyer O, Hildebrandt M, Schulz B, Blasczyk R, Salama A, Simultaneous genotyping of human Platelet antigens (HPA) 1 through 6 using new sequence-specific primers for HPA-5, *Transfusion*, **39**: 1256-58 (1999)
- Middleton PG, Taylor PRA, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM, Cytokine gene polymorphism associating with severe acute graft-versus-host-disease in HLA-identical Sibling Transplants, *Blood*, **92**: 3943-48 (1998)
- Milstein CP, Steinberg AG, McLaughlin CL, Solomon A, Amino acid sequence change associated with genetic marker Inv(2) of human immunoglobulin, *Nature*, **248**: 160-161 (1974)
- Mommaas B, Kamp J, Drijfhout JW, Beekman N, Ossendorp F, van Veelen P, den Haan J, Goulmy E, Mutis T, Identification of a novel HLA-B60-restricted T Cell epitope of the minor histocompatibility antigen HA-1 Locus, *J Immunol*, **169**: 3131-3136 (2002)

- Mughal T, Goldmann J, Hehlmann R, Berger U: Leukämie verstehen, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin/Wien, ISBN 3-89412-443-1 (2000)
- Murata M, Emi N, Hirabayashi N, Hamaguchi M, Goto S, Wakita A, Tanimoto M, Saito H, Kodera Y, Morishita Y, No significant association between HA-1 incompatibility and incidence of acute graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation in Japanese patients, *Int J Hematol*, **72**: 371-5 (2000)
- Mutis T, Gillespie G, Schrama E, Frederik Falkenburg JH, Moss P, Goulmy E, Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease, *Nat Med*, **5**: 839-842 (1999)
- Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam B, Brand A, Goulmy E, Feasibility of Immunotherapy of relapsed Leukemia with Ex vivo-generated Cytotoxic T Lymphocytes specific for Hematopoietic System-restricted minor Histocompatibility Antigens, *Blood*, **93**: 2336-41 (1999)
- Nagase T, Seki N, Ishikawa K et al., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain, *DNA Res*, **3**: 321-9 (1996)
- Nakamuro K, Tanigaki N, Pressmann D, Multiple common properties of human β 2-microglobulin and the common portion fragment derived from HLA-antigen molecules, *Proc Natl Acad Sci*, **70**: 2863-65 (1973)
- Nesci S, Buffi O, Iliescu A, Andreani M, Lucarelli G, Recipient mHag-HA-1 disparity and aGVHD in thalassemic-transplanted patients, *Bone Marrow Transplant*, **31**: 575-578 (2003)
- Newman PJ, Derbes RS, Aster RH, The human platelet alloantigen P1 A1 and P1A2 are associated with a leucine³³/proline³³ amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa and are distinguishable by DNA typing, *J Clin Invest*, **83**: 1778-1781 (1989)
- Newman PJ, Switched at birth: A new family for PECAM-1, *J Clin Invest*, **103**: 5-9 (1999)
- Newman PJ, The biology of PECAM-1, *J Clin Invest*, **99**: 3-8 (1997)
- Newton-Nash DK and Newman PJ, A new role for Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): Inhibition of TCR-mediated signal transduction, *J Immunol*, **163**: 682-88 (1999)
- Nichols WC, Antin JH, Lunetta KL, Terry VH, Hertel CE, Wheatley MA, Arnold ND, Siemieniak DR, Boehnke M, Ginsburg D, Polymorphism of adhesion molecule CD31 is not a significant risk factor for graft-versus-host-disease, *Blood*, **88**: 4429-34 (1996)
- Novel PC, Hungerford DA, A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia, *Science*, **132**: 1497 (1960)
- Nussbaum AK, Kuttler C, Haderl KP, Rammensee HG, Schild H, PaProC: A prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW, *Immunogenetics*, **53**: 87-94 (2001)

- Ottinger HD, Beelen DW, Sayer H, Schaefer UW, Grosse-Wilde H, Bone marrow transplantation from partially HLA-matched related donors in adults with leukemia: the experience at the University Hospital of Essen, Germany, *Br J Hematol*, **92**:913-921 (1996)
- Ottinger HD, Albert E, Arnold R et al., German consensus on immunogenetic donor search for transplantation of allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cells, *Bone Marrow Transplant* **20**:101-105 (1997)
- Ottinger HD, Müller CR, Goldmann SF, Albert E, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Bunjes D, Casper J, Ebell W, Ehninger G, Eiermann T, Einsele H, Fauser A, Ferencik S, Finke J, Hertenstein B, Heyll A, Klingebiel T, Knipper, Kremens B, Kolb HJ, Kolbe K, Lenartz E, Lindemann M, Müller CA, Mytilineos J, Niederwieser D, Runde V, Sayer H, Schaefer UW, Schmitz N, Schröder S, Schulze-Rath R, Schwerdtfeger R, Siegert W, Thiele B, Zander AR and Grosse-Wilde H, Second German Consensus on Immunogenetic Donor Search for Allotransplantation of Hematopoietic Stem Cells, *Ann Hematol*, **80**: 706 (2001)
- Ottinger HD, Ferencik S, Beelen DW, Lindemann M, Peceny R, Elmaagacli AH, Hüsing J, Grosse-Wilde H, Hematopoietic stem cell transplantation: contrasting the outcome of transplantations from HLA-identical siblings, partially HLA-Mismatched related donors, and HLA-matched unrelated donors, *Blood*, **102**: 1131-1137 (2003)
- Panzer S, Janisiw M, Fischer G, Jilma B, The platelet $\alpha 2$ -integrin (GPIa) nucleotide-807 polymorphism is not associated with a risk for maternal-fetal human platelet antigen-5 incompatibility, *Ann Haematol*, **79**: 296-98 (2000)
- Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE: Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent bindings of individual peptide side-chains, *J Immunol*, **152**: 163 (1994)
- Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Hansen JA, Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation, *Tissue Antigens*, **61**: 1 (2003)
- Pierce RA, Field ED, den Haan JJ, Caldwell JA, White FM, Marto JA, Wang W, Frost LM, Blokland E, Reinhardus C, Shabanowitz J, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH, The HLA-A*0101-restricted HY Minor Histocompatibility antigen originates from DFFRY and contains a cysteinylated cysteine residue as identified by a novel Mass Spectrometric Technique, *J Immunol*, **163**: 6360-6364 (1999)
- Pierce RA, Field ED, Mutis T, Golovina TN, von Kap-Herr C, Wilke M, Pool J, Shabanowitz J, Pettenati MJ, Eisenlohr LC, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH, The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human Class I Myosin Protein, *J Immunol*, **167**: 3223-3230 (2001)
- Prilliman KR, Jackson KW, Lindsey M, Wang J, Crawford D, Hildebrand WH, HLA-B15 peptide ligands are preferentially anchored at their C-termini, *J Immunol*, **162**: 7277-84 (1999)
- Pumphrey NJ, Taylor V, Freeman S, Douglas MR, Bradfield PF, Young SP, Lord JM, Wakelam MJO, Bird IN, Salmon M, Buckley CD, Differential Association of cytoplasmic signaling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C- γ 1 with PECAM-1/CD31, *FEBS Letters*, **450**: 77-83 (1999)

- Ramsay NK, Kersey JH, Robison LL, McGlave PB, Woods WG, Krivit W, Kim TH, Goldman AL, Nesbit ME Jr, A randomized study of the prevention of graft-versus-host-disease, *N Engl J Med*, **306**: 392-397 (1982)
- Ren EC, Kanguane P, Kolatkar P, Lin MT, Tseng LH, Hansen JA, Molecular modeling of the minor Histocompatibility Antigen HA-1 peptides binding to HLA-A alleles, *Tissue Antigens*, **55**: 24-30 (2000)
- Rozman P, Karas M, Kosir A, Labar B, Madrigal A, Middleton D et al. Are human platelet alloantigens (HPA) minor transplantation antigens in clinical bone marrow transplantation? *Bone Marrow Transplant*, **31**: 497-506 (2003)
- Rufer N, Starobinski M, Chapuis B, Gratwohl A, Jeannet M, Helg C, Roosnek E, Clinical consequences of sensitization to minor Histocompatibility antigens before allogeneic Bone Marrow Transplantation, *Bone Marrow Transplant*, **22**: 895-98 (1998)
- Rufer N, Wolpert E, Helg C, Tiercy JM, Gratwohl A, Chapuis B, Jeannet M, Goulmy E, Roosnek E, HA-1 and the SMCY-derived peptide FIDSYICQV (H-Y) are immunodominant minor Histocompatibility Antigens after Bone Marrow Transplantation, *Transplantation*, **66**: 910-916 (1998)
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A, Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in *Mismatched* hematopoietic transplants, *Science*, **295**: 2097-2100 (2002)
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N, Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, **230**: 1350-1354 (1985)
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989)
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 5463-5467 (1977)
- Santoro SA, Zutter MM, The $\alpha 2\beta 1$ Integrin: A Collagen receptor on Platelets and other cells, *Thromb Haemostasis*, **74**: 813-824 (1995)
- Santoso S, Amrhein J, Hofmann HA, Sachs UJH, Walka MM, Kroll H, Kiefel V, A point mutation Thr₇₉₉Met on the $\alpha 2$ Integrin leads to the formation of new human Platelet alloantigen Sit^a and affects Collagen-induced aggregation, *Blood*, **94**: 4103-4111 (1999)
- Santoso S, Clinical impact of Platelet glycoprotein polymorphism, *Vox Sang*, **78** (suppl 2): 121-124 (2000)
- Santoso S, Kiefel V, Human Platelet-specific Alloantigens: Update, *Vox Sang*, **74** (suppl 2): 249-253 (1998)

- Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A, Association of the Platelet Glycoprotein Ia C₈₀₇T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients, *Blood*, **93**: 2449-53 (1999)
- Sawyers CL, Chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med*, **340**: 1330-1340 (1999)
- Schreuder GMT, Pool J, Blokland E, van Els C, Bakker A, van Rood JJ, Goulmy E, A genetic analysis of human minor Histocompatibility antigens demonstrates Mendelian segregation independent from HLA, *Immunogenetics*, **38**: 98-105 (1993)
- Schultz JS, Baels TF, Petraitis FP, Tissue graft rejection in mice. I. Contributions of H-2 and non H-2 genetic barriers, *Immunogenetics*, **3**: 85 (1976)
- Sellers J, Thompson J, Cuttridge MG, Darke C, Human platelet antigens: Typing by PCR using sequence-specific primers and their distribution in blood donors resident in Wales, *Eur J Immunogen*, **26**: 393-97 (1999)
- Sidney J, Grey HM, Kubo RT, Sette A, Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs, *Immunol Today*, **17**: 261-266 (1996)
- Sidney J, Grey HM, Southwood S, Celis E, Wentworth PA, delGuercio MF, Kubo RT, Chesnut RW, Sette A, Definition of an HLA-A3-like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules, *Hum Immunol*, **45**: 79-93 (1996)
- Simpson E, Roopenian D, Goulmy E, Much ado about minor Histocompatibility antigens, *Immunology Today*, **19**: 108-112 (1998)
- Sireci G, Dieli F, Caccamo N, Bonnanno CT, Salerno A, Induction and tolerisation of Anti-male CD8+ cytotoxic T Lymphocytes by in vivo immunization with an H-Y-derived peptide, *Hum Immunol*, **60**: 764-73 (1999)
- Snary D, Barnstable C, Bodmer WF, Human Ia antigens: purification and molecular structure, *Cold Spr Harb Symp quant Biol*, **41**:379-86 (1977)
- Snell GD, Methods for the study of histocompatibility genes, *J Genet*, **49**: 87 (1948)
- Sommer SS, Groszbach AR, Bottema CDK, PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes, *BioTechniques*, **12**: 82-87 (1992)
- Smyth LA, Witt CS, Christiansen FT et al. The MHC influences acute graft versus host disease in MHC matched adults undergoing allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant*, **12**: 351 (1993)
- Spierings E, Brickner AG, Caldwell JA, Zegveld S, Tatsis N, Blokland E, Pool J, Pierce RA, Mollah S, Shabanowitz J, Eisenlohr LC, Van Peelen P, Ossendorp F, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH, The minor histocompatibility antigen HA-3 arises from differential proteasome-mediated cleavage of the lymphoid blast crisis (Lbc) oncoprotein, *Blood*, **102**: 621-629 (2003)

- Szmania S, Keever-Taylor C, Baxter-Lowe LA, Automated nucleotide Sequencing reveals substantial disparity between the HLA-A2 genes of Bone Marrow Transplant recipients and donors, *Hum Immunol*, **56**: 77-83 (1997)
- Tait BD, Maddison R, McCluskey J, Deayton S, Heatley S, Lester S, Bardy P, Szer J, Grigg A, Spencer A, Schwarzer A, Holdsworth R, Clinical relevance of the minor Histocompatibility antigen HA-1 in allogeneic Bone Marrow Transplantation between HLA-identical siblings, *Transpl Proc*, **33**: 1760-1761 (2001)
- Takada Y, Hemler ME, The primary structure of the VLA-2/Collagen receptor $\alpha 2$ subunit (Platelet GPIa): Homology to other Integrins and the presence of a possible Collagen-binding domain, *J Cell Biol*, **109**: 397-407 (1989)
- Tseng LH, Lin MT, Hansen JA, Gooley T, Pei J, Smith AG, Martin EG, Petersdorf EW, Martin PJ, Correlation between Disparity for the minor Histocompatibility Antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic Marrow Transplantation, *Blood*, **94**: 2911-14 (1999)
- Tseng LH, Lin MT, Martin PJ, Pei J, Smith AG, Hansen JA, Definition of the gene encoding the minor histocompatibility antigen HA-1 and typing for HA-1 from genomic DNA, *Tissue Antigens*, **52**: 305-311 (1998)
- van Els C, D'Amaro J, Pool J, Blokland E, Bakker A, van Elsen PJ, van Rood JJ, Goulmy E, Immunogenetics of human minor Histocompatibility antigens: Their Polymorphism and Immunodominance, *Immunogenetics*, **35**: 161-165 (1992)
- van Els CACM, Zantvoort E, Jacobs N, Bakker A, van Rood JJ, Goulmy E, Graft-versus-host disease associated T helper cell response specific for minor histocompatibility antigens are mainly restricted by HLA-DR, *Bone Marrow Transplant*, **5**: 365-372 (1990b)
- vanEndert PM, Riganelli D, Greco G, Fleischhauer K, Sidney J, Sette A, Bach JF, The peptide-binding motif of the human Transporter Associated with antigen Processing, *J Exp Med*, **182**: 1883-1895 (1995)
- Vogt MHJ, de Paus RA, Voogt PJ, Willemze R, Frederik Falkenburg JH, DFFRY codes for a new human male-specific minor transplantation antigen involved in Bone Marrow graft rejection, *Blood*, **95**: 1100-1105 (2000)
- Vogt MHJ, Goulmy E, Kloosterboer FM, Blokland E, de Paus RA, Willemze R, Frederik Falkenburg JH, UTY gene codes for an HLA-B60-restricted human male-specific minor Histocompatibility Antigen involved in stem cell graft rejection: Characterisation of the critical polymorphic amino acid residues for T-cell recognition, *Blood*, **96**: 3126-3132 (2000)
- Vogt MHJ, Van den Muijsenberg JW, Goulmy E, Spierings E, Kluck P, Kester MG, van Soest RA, Drijfhout JW, Willemze R, Falkenburg JHF, *Blood*, **99**: 3027-3032 (2002)
- Wang W, Meadows LR, den Haan JMM, Sherman NE, Chen Y, Blokland E, Shabanowitz J, Agulnik AI, Hendrickson RC, Bishop CE, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH, Human H-Y: A male-

- specific Histocompatibility antigen derived from the SMCY Protein, *Science*, **269**: 1588-1590 (1995)
- Warren EH, Gavin MA, Simpson E, Chandler P, Page DC, Disteche C, Stankey KA, Greenberg PD, Ridell SR, The human UTY gene encodes a novel HLA-B8-restricted H-Y-Antigen, *J Immunol*, **164**: 2807-2814 (2000)
- Warren EH, Greenberg PD, Ridell SR, Cytotoxic T-Lymphocytes-defined human Minor Histocompatibility antigens with a restricted Tissue distribution, *Blood*, **91**: 2197-2207 (1998)
- Weisdorf D, Hakke R, Blazar B et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation, *Transplantation*, **51**: 1197 (1991)
- Wernet P, Human I-type alloantigens: methods of detection, aspects of chemistry and biology, markers for disease states, *Transpl Rev*, **30**: 271-98 (1976)
- Wilke M, Pool J, den Haan JMM, Goulmy E, Genomic identification of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus by allele-specific PCR, *Tissue Antigens*, **52**: 312-317 (1998)
- Wolf U, The serologically detected H-Y antigen revisited, *Cytogenet Cell Genet*, **80**: 232-235 (1998)
- Yamada N, Ishikawa Y, Dumrese T, Tokunaga K, Juri T, Nagatani T, Miwa K, Rammensee HG, Takiguchi M, Role of anchor residues in peptide binding to HLA-A26 molecules, *Tissue Antigens*, **54**: 325-332 (1999)
- Yazaki M, Takahashi T, Andoh M, Akatsuka Y, Ito T, Miyake Y, Ito Y, Nakamura S, Wada Y, A novel minor Histocompatibility Antigen recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes generated from HLA-identical bone marrow donor lymphocytes, *Bone Marrow Transplant*, **24**: 129-137 (1999)
- Zhang C, Anderson A, DeLisi C, Structural principles that govern the peptide-binding motifs of Class I MHC molecules, *J Mol Biol*, **281**: 929-947 (1998)
- Zinkernagel RM, Doherty PC, Restriction of in vitro T Cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogenic system, *Nature*, **248**: 701-721 (1974)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Molekulargenetische Analyse der minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHag) und deren Relevanz für die allogene Blutstammzell-Transplantation“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Dipl. Biol. Falko Heinemann befürworte.

Essen,

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen,

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen,

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.