

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus dem Institut für Immunologie und
der Klinik für Neurochirurgie

**HLA-Phänotypfrequenzen bei Patienten mit intrakraniellen
Aneurysmen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät der
Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Noutchangoin *Njawe Siewe*
aus Tiko-Fako / Kamerun

2006

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. I.E. Sandalcioglu

Tag der mündlichen Prüfung: 14. August 2007

Thematisch relevante Veröffentlichung

1. Ferencik S., Rebmann V., Regel J., Siewe N., Schoch B., Stolke D., Grosse-Wilde H. (2005): HLA-phenotype frequencies in patients with intracranial aneurysms. *Genes and Immunity* 6 (suppl. 1), S 34.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Intrakranielle Aneurysmen	6
1.1.1	Ätiopathologie	6
1.1.2	Risikofaktoren	8
1.1.3	Klinik und Verlauf	8
1.1.4	Differentialdiagnosen	10
1.1.5	Therapie	11
1.2	Der Histokompatibilitätskomplex	12
1.2.1	Das HLA System	12
1.2.2	Genomische Organisation des HLA Komplexes	13
1.2.3	Genstruktur der HLA Moleküle	14
1.2.4	HLA Testungen	14
1.2.5	Funktion der HLA Moleküle	15
1.2.6	HLA Krankheitsassoziationen	15
2	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
3	Material	19
3.1	Chemikalien	19
3.2	Lösungen	19
3.3	Geräte	20
3.4	Verbrauchsmaterialien	21
3.5	Polymerasekettenreaktion sequence specific primer	21
4	Methoden	19
4.1	Beschreibung des Normalpersonen- und Patienten Kollektivs	19
4.2	Präparation der genomischen Desoxyribonukleinsäure	19
4.3	Prinzip der Polymerasekettenreaktion sequence specific primer	23
4.4	Durchführung der Polymerasekettenreaktion sequence specific primer	23
4.4.1	Desoxyribonukleinsäure-Konzentrationsberechnung für HLA Klasse I und Klasse II	23
4.4.2	Herstellung des Mastermixes	24
4.4.3	Amplifizierung der HLA Klasse I und Klasse II Merkmale	24
4.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	24
4.4.5	Fotodokumentation	25
4.5	Statistische Auswertung	26
5	Ergebnisse	28
5.1	Klinische Beschreibung der intrakraniellen Aneurysmapatienten	28
5.1.1	Anzahl und Lokalisation der intrakraniellen Aneurysmen	29
5.1.2	Risikofaktoren der Aneurysmapatienten	30
5.1.3	Prognosefaktoren und postoperative Komplikationen der Aneurysmapatienten	28
5.2	HLA Allelfrequenzen der Aneurysmapatienten im Vergleich zum Normalkollektiv	29
5.2.1	HLA Klasse I Allelfrequenzen der Aneurysmapatienten	32
5.2.2	HLA Klasse II Allelfrequenzen der Aneurysmapatienten	35
5.3	Vergleich der HLA Allelfrequenzen zwischen Patienten mit und ohne subarachnoidalen Blutung und dem Kontrollkollektiv	37
5.3.1	Vergleich der HLA Allelfrequenzen zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe	37
5.3.2	Vergleich der HLA Allelfrequenzen zwischen den Patienten mit und ohne	

	subarachnoidalen Blutung.....	41
5.4	HLA Allelfrequenzen und Verlauf der intrakraniellen Aneurysmen	44
6	Diskussion	46
7	Zusammenfassung	56
8	Literaturverzeichnis	57
9	Verzeichnis der Abkürzungen	64
10	Anhang	67
	10.1 Abbildungen	67
	10.2 Tabellen	67
	10.3 Danksagung	68
11	Lebenslauf	69

1 Einleitung

1.1 Intrakranielle Aneurysmen

1.1.1 Ätiopathologie

Intrakranielle Aneurysmen (IA) sind intrakranielle Gefäßausstülpungen unterschiedlicher Form und Größe, die erworben oder angeboren sein können. Sie können eine sack- oder beerenförmige Gestalt annehmen. Angeborene IA haben eine Prävalenz von 0,2 - 9 % und sind meistens an der Abzweigung von größeren Hirnarterien lokalisiert (Nakagawa T. et al., 1999; Weir B., 2002). Intrakranielle Aneurysmen kommen in den ersten beiden Lebensdekaden selten vor (Weir B., 2002; Heiskanen O. und Vikki J., 1981). Sie haben einen Häufigkeitsgipfel in der sechsten Lebensdekade, wobei Frauen häufiger erkranken. Es ist eine familiäre Häufung bei 20 % der Aneurysmaträger nachgewiesen (Uehara T. et al., 1998; Ingall T. J., 2000). Multiple IA werden ebenfalls bei etwa 15 - 20 % der IA-Patienten diagnostiziert (Steiner H.H. und Unterberg A., 1999; Steinmetz H. und Raabe A., 2004). Viele Patienten mit IA sind klinisch asymptomatisch und bleiben lebenslang beschwerdefrei. Die Symptome äußern sich klinisch bei Ruptur des IA oder wenn das IA so groß wird, dass es Nachbarstrukturen irritiert (Weir B., 2002; Schirmer M., 2005).

Das Gehirn wird hauptsächlich im vorderen Kreislauf über die Arteria carotis interna (ACI) und im hinteren Kreislauf über die Vertebralarterien versorgt. Die beiden Kreisläufe vereinigen sich im Circulus arteriosus Willisii. Durch Störungen im Aufbau der Gefäßwand kommt es unter dem Einfluss des Blutdrucks zur aneurysmatischen Ausbuchtung bzw. Erweiterung eines Blutgefäßes. Diese Störungen äußern sich als ein Defekt des Kollagen III in der Gefäßwand oder durch das Fehlen einer Tunica muscularis (Ostergaard J.R., 1989; Schirmer M. und Ellegalla D.B., 2005.; Day A.L., 2005). Im Erwachsenenalter sind etwa ein Drittel der IA jeweils an der ACI und Arteria cerebri anterior (ACA) lokalisiert (Tabelle 1). Weiterhin sind ein Viertel an der Arteria cerebri media (MCA) und knapp 10 % im vertebrobasilären Kreislauf lokalisiert (Drake C.G., 1982; Kunze K., 1992; Steinmetz H. und Raabe A., 2004).

Nach Pathophysiologischer Einteilung gibt es wahre Aneurysmen mit einem Mediadefekt der arteriellen Gefäßwand und pseudo- oder falsche Aneurysmen, die mit periarteriellen Hämatomen gleichzusetzen sind. Ätiologisch lassen sich diese unterteilen in Aneurysmen bedingt durch Trauma, Infektion, Neoplasie, Mykose und Verkalkung.

Lokalisation	Verteilung (%) *
ACA	ca. 35
ACI	ca. 35
MCA	ca. 22
Vertebrobasilärer Kreislauf	ca. 8

Tabelle 1: Vergleich des Vorkommens von IA an intrakraniellen Arterien

(* = nach Kunze K., 1992)

Die Gefäßwand von intrakraniellen Arterien ist im Gegensatz zu der Gefäßwand von extrakraniellen Gefäßen durch das Fehlen von Muscularis und Elastica interna gekennzeichnet. Diese dünneren Hirnarterien sind ohne einen perivaskulären Halt. Neil-Dwyer et al. (1987) stellten fest, dass ca. 50 % der IA-Patienten zusätzlich eine Kollagen Typ III-Schwäche haben. Kollagen trägt zur Stabilität und Widerstandsfähigkeit eines Gefäßes bei. Hämodynamischer Stress und Kollagenschwäche scheinen Ausstülpungen der Gefäßwand zu begünstigen. Familiär gehäufte Faktoren wie arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus begünstigen eine Häufung von IA. Hypertonie und Diabetes fördern vaskulitische Veränderungen und Kollagenschwäche (Ostergaard J.R., 1989; Rinkel G.J. et al., 1998; Rasmussen T.E. et al. und Ellegalla D.B., 2001; Day A.L., 2005).

Obwohl 2 - 3 % der Bevölkerung ein oder mehrere IA beherbergen, sind die meisten IA Patienten beschwerdefrei. Größere IA können Kopfschmerzen, Schwindelanfälle, Erbrechen, Thrombembolien oder Nervenpareesen aufgrund der Beziehung zu den Nachbarstrukturen verursachen. IA können zudem im Rahmen einer Subarachnoidalblutung (SAB) symptomatisch werden. Juvela et al. (2000) errechneten im Rahmen einer Metaanalyse ein kumulatives SAB-Vorkommen von über 30 % über einen Zeitraum von 30 Jahren bei Patienten mit intrakraniellen Aneurysmen. Die SAB hat insgesamt eine jährliche Inzidenz von 10 - 30 pro 100.000 Personen, wobei in Deutschland eine niedrigere Inzidenz von 7 - 10 pro 100.000 und in Japan und Finnland eine höhere Inzidenz von 20 - 30 pro 100.000 dokumentiert ist (Linn F.H. et al., 1996; Ronkainen A. et al., 1997; Nakagawa T. et al., 1999 und Weir B., 2002). Die SAB ist aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität eine schwerwiegende Erkrankung. Als Folge der SAB kann es zu sehr starken Kopfschmerzen, Meningismus, Bewusstseinsstörungen, neurologischen Ausfällen, Koma und Tod kommen (Broderick J.P. et al., 1994; Johnston S.C. et al., 1998

und Raabe A. et al., 2005). Innerhalb der ersten 24 Stunden nach stattgehabter Blutung sterben 25 % der Patienten. Bei ca. 50 % der Patienten, die überleben, bleiben neurologische Ausfälle unterschiedlichen Ausmaßes. Ein unabhängiges Leben ist für ca. ein Drittel der Überlebenden nicht mehr möglich (Broderick J.P. et al., 1994; Johnston S.C. et al., 1998 und Raabe A. et al., 2005).

1.1.2 Risikofaktoren

Die Entstehung von IA scheint mit erworbenen, umweltbedingten, hormonellen und genetischen Einflüssen zusammenzuhängen. Erblich bedingte Bindegewebschwächen wie beim Noonan Syndrom, Achondroplasie, Ehlers-Danlos Syndrom, Neurofibromatose Typ 1, Pseudoxanthoma elasticum, Alpha-1-Antitrypsin Mangel, Marfan-Syndrom und der autosomalen dominanten polyzystischen Nierenkrankheit ADPKD scheinen eine zusätzliche Rolle bei der Entstehung von IA zu spielen, da IA gehäuft bei diesen Erkrankungen auftreten (Ostergaard J.R., 1989; Schievink W.I., 1997; Steinmetz H. und Raabe A., 2004; Ruigrok Y.M., 2005).

Mit dem Alter steigt das Risiko ein IA zu beherbergen, auch die Größe der gefundenen Aneurysmen steigt mit dem Alter, jedoch das Risiko an einer SAB zu erkranken steigt nicht (Heiskanen O. und Vikki J., 1981; Wiebers D.O. et al., 1987).

Rauchen und der exzessive Konsum von Alkohol können langfristig zu einer Schwächung von Gefäßwänden sowie zur Hypertonie führen. Angesichts der schon bestehenden Schwäche der Hirnarterien durch das Fehlen von *Elastica interna* und *muscularis* kann der zusätzliche Druck bei einer Hypertonie zu einer Ausstülpung und dann gegebenenfalls zur Ruptur der zerebralen Gefäßausstülpungen führen (Ostergaard J.R., 1989; Juvela S. et al., 1993).

Faktoren wie Artherosklerose (Rinkel G.J. et al., 1998), Cholesterolvere über 6,3 mmol/l (Adamson J. et al., 1994) und ischämische Herzkrankheiten bei Frauen (Uehara T. et al., 1998) werden als begünstigende Faktoren für die Entstehung eines IA diskutiert.

1.1.3 Klinik und Verlauf

Die IA werden bezogen auf die Blutung in symptomatische und asymptomatische IA eingeteilt.

Die Entstehung spontaner Blutungen durch Aneurysmaruptur führt in der Regel zum plötzlichen Beginn der Symptomatik: unerträgliche Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Meningismus, Photophobie und kurzfristige Bewusstseinsverluste. Bei ausgedehnten Blutungen kann es zu Krampfanfällen und neurologischen Ausfällen kommen. Hunt und Hess (1968) teilten die Patienten je nach Schwere der Symptome nach stattgehabter Blutung ein (Hunt W., Hess R., 1968).

Grad	Symptome
0	Nicht geplatzt IA, keine SAB
I	Kopfschmerzen (KS), Meningismus, keine neurologischen Ausfälle
II	Starke KS, stärkerer Meningismus, evtl. milde neurologische Symptome (z.B. Lähmung des III. oder IV. Hirnnervs)
III	Somnolent, desorientiert und leichte neurologische Herdsymptomatik
IV	Bewusstlos, milde bis ausgeprägte Hemiparese
V	Tiefes Koma, Enthirnungsstarre, sterbend

Tabelle 2: Klinische Gradeinteilung der SAB (Hunt W., Hess R., 1968)

Bei Ruptur der Aneurysmen kann es zu subarachnoidalen (SAB) oder intrazerebralen (ICB) Blutungen kommen. Die gängige bildmorphologische Einteilung nach Fisher unterscheidet Patienten ohne SAB (Grad 1) von Patienten mit geringer SAB (Grad 2), ausgedehnter SAB (Grad 3) und Patienten mit ICB (Grad 4) (Fisher CM. et al., 1980; Johnston S.C. et al., 1998).

Grad	Beschreibung
1	Keine Blutung
2	Diffuse Subarachnoidale Blutung < 1 mm Dicke
3	Diffuse Subarachnoidale Blutung > 1 mm Dicke
4	Intrazerebrale oder intraventrikuläre Blutung, mit oder ohne SAB

Tabelle 3: Fisher, Einteilung anhand von CT-Aufnahmen bei IA (Fisher et al., 1980)

Bei Ruptur eines IA kann es zu einem Hirnödem, einem Hydrocephalus im Sinne einer Erweiterung des Hirnkammersystems aufgrund einer Behinderung des Liquorabflusses, zu Krampfanfällen und Rezidivblutungen und später zu Vasospasmus kommen. Das Risiko einer Rezidivblutung steigt auf 27 % innerhalb von zwei Wochen nach SAB und bleibt auf einem Niveau von 2 % pro Jahr bei unbehandelten Aneurysmen (Johnston S.C. et al., 1998; Schirmer M., 2005).

Die nicht-rupturierten IA werden in der Regel zufällig diagnostiziert. Als asymptomatisch gelten Patienten, die mit unklaren Kopfschmerzen, transischämischen Attacken (TIA) und Schwindel oder wegen einer anderen Erkrankung in der Klinik vorstellig werden und ein Aneurysma nachgewiesen wird. Andere asymptomatische Patienten mit familiärer Belastung oder erhöhten Risikofaktoren können im Rahmen von Screeninguntersuchungen oder bei Autopsien identifiziert werden.

1.1.4 Differentialdiagnosen

Das Hauptsymptom eines IA (Kopfschmerzen) ist schwer einzuordnen. Beim Auftreten dieses Symptoms wird zuerst an häufiger vorkommende Erkrankungen gedacht wie: Migräne, Enzephalitis, subdurales Hämatom, zervikales Syndrom, Glaukomanfall, Intoxikation. Diese können zur Verschleppung der Diagnose SAB führen.

Diagnostische Methode der ersten Wahl beim Verdacht auf SAB ist die Computertomographie (CT). Ein unauffälliges CT schließt eine SAB jedoch nicht aus. Bei SAB-Verdacht und unauffälligem CT wird eine Lumbalpunktion durchgeführt. Dabei ist eine Blutbeimengung im Liquor nach eingetretener Blutung schnell nachweisbar (Steiner H.H. und Unterberg A., 1999; Raabe A. et al., 2005). Sowohl zum Ausschluss eines IA und zum Blutungsnachweis als auch zur Planung der Therapie wird eine intraarterielle digitale Subtraktionsangiographie (DSA) angefertigt. Die Magnetresonanzangiographie und die Angio-CT sind weitere Untersuchungsmethoden für den Aneurysmanachweis (Raabe et al., 2005). Die nachfolgende Abbildung fasst die notwendigen diagnostischen und therapeutischen Schritte zusammen.

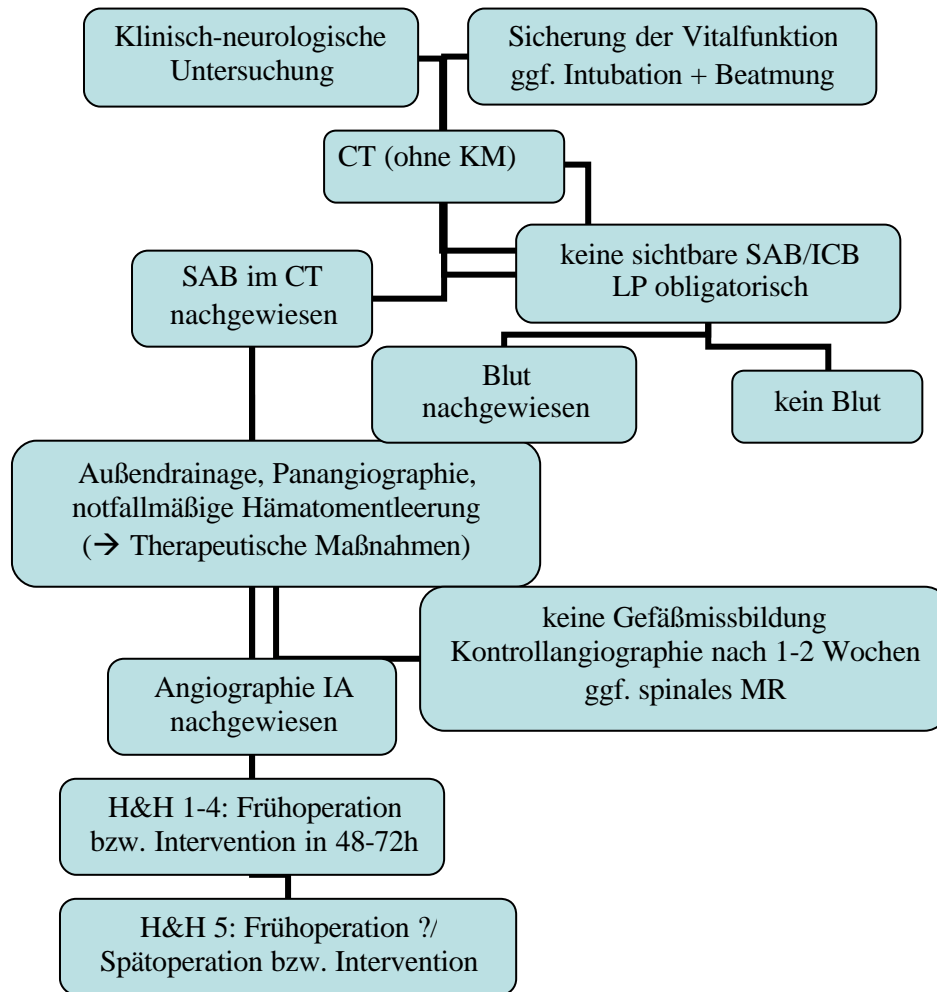


Abbildung 1: Diagnostisches und therapeutisches Vorgehen bei Verdacht auf Subarachnoidalblutung (Steiner H.H. und Unterberger A., 1999)

[KM = Kontrastmittel, H&H = Hunt und Hess]

1.1.5 Therapie

Zur Basistherapie des symptomatischen IA gehören die Sicherung der Vitalfunktionen, Vermeidung von Blutdruckspitzen, die Schmerzbekämpfung und die ständige Kontrolle des neurologischen Befundes. Die sekundär entstandene Dysregulation des Elektrolythaushaltes und Temperatur muss ebenfalls therapiert werden (Schirmer M., 2005; Raabe et al., 2005).

Sollte es zu einer Liquorzirkulationsstörung im Sinne einer Hydrozephalus mit Aufstau des Liquors kommen, wird empfohlen eine externe Liquordrainage anzulegen (Raabe et al., 2005)

Grundsätzlich stehen zwei Therapieverfahren zur Auswahl (Steiner H.H. und Unterberg A., 1999; Schirmer M., 2005; Raabe et al., 2005; Ellegalla D.B. et al., 2005): Beim sogenannten Clipping wird das Aneurysma an seinem Hals mit einem kleinen Titanclip verschlossen und so von der Blutzirkulation abgetrennt (Abbildung 2B). Beim sogenannten Coiling werden Platinspiralen in das Aneurysma transarteriell eingebracht, was eine Thrombosierung des Aneurysmas bewirkt (Abbildung 2A).

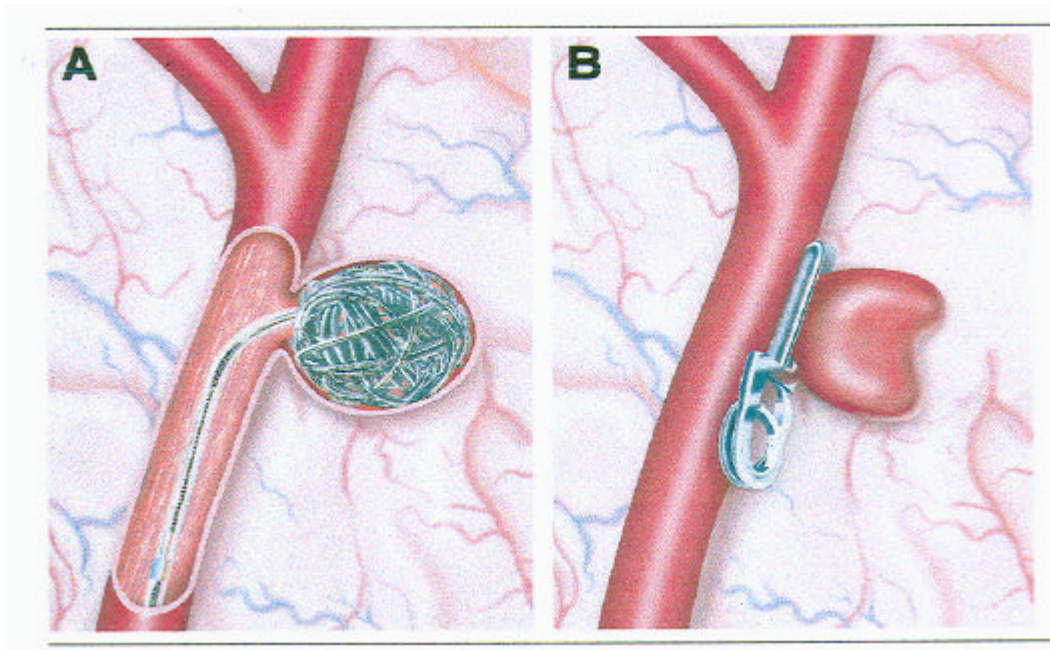


Abbildung 2: Coiling (A) und Clipping (B) bei IA (Johnston S.C. et al., 2000)

Trotz sorgfältiger intensivmedizinischer Therapie ist die aneurysmatische SAB mit einer Frühmortalität von ca. 15 % behaftet. Bei Rezidivblutungen steigt die Mortalität auf bis zu 70 % (Broderick J.P. et al., 1994; Johnson S.C. et al., 2000; Schirmer M., 2005).

1.2 Der Histokompatibilitätskomplex

1.2.1 Das HLA-System

Die Geschichte der Humanen Leukozyten Antigene (HLA) begann mit der Feststellung von Gorer und Snell, dass Transplantate zwischen Experimentaltieren um so langsamer abgestoßen werden, je näher die Tiere miteinander verwandt sind (Snell G., 1941). Daher werden HLA-Antigene Histokompatibilitätsantigene genannt. Da vermutet wurde, dass eine größere Zahl unterschiedlicher Gene für die Abstoßung des Transplantates verantwortlich ist, begann man, die einzelnen HLA-Merkmale zu definieren. In den 1970er Jahren wurde nachgewiesen, dass HLA-Moleküle eine zentrale Rolle bei der Einleitung der Immunantwort spielen und Liganden für T-Zell-Rezeptoren (TZR) darstellen (Zinkernagel

R.M., Doherty P.C., 1974).

1.2.2 Genomische Organisation des HLA-Komplexes

Der HLA-Genkomplex kodiert für strukturell und funktionell unterschiedliche Klassen Glykoproteine. Der HLA-Genkomplex wird in drei Regionen eingeteilt (Campbell R.D. et al., 2002; Janeway C. et al., 2002). Dabei werden ungefähr 210 eng gekoppelter Gene, Pseudogene in den Regionen der HLA Klasse I, Klasse II und eine dazwischen liegende Region, die der HLA Klasse III, zusammengefasst.

Die Klasse I-Region liegt am weitesten telomerisch und nimmt mit 1.800 Kb fast die Hälfte des HLA-Komplexes ein. Diese Region enthält die Genorte der polymorphen klassischen HLA-A-, -B-, -C-Antigene und die der sogenannten nicht-klassischen HLA-Klasse I-Antigene, HLA-E, -F und HLA-G (Milner C.M., 1992; Campbell R.D., 1992; Le Bouteiller P., 1994). Die klassischen HLA Klasse I-Antigene (HLA-A, -B, -C) werden von den meisten kernhaltigen Körperzellen exprimiert, während nicht-klassische HLA Klasse I-Merkmale nur von bestimmten Körperzellen wie den Trophoblasten oder unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden.

Die HLA Klasse II-Subregion liegt zentromerisch, umspannt ca. 800 Kb. Zu den HLA Klasse II-Antigenen zählen die HLA-DR-, -DQ- und -DP-Moleküle. Diese werden auf den Zelloberflächen von antigenpräsentierenden Zellen wie den z.B. B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen angetroffen. Die Expression der Klasse I- und Klasse II-Antigene werden durch verschiedene Zytokine induziert (Kappes D.1988; Strominger J., 1988).

Die HLA Klasse III-Region liegt zwischen den HLA Klasse I- und II-Regionen. Sie umspannt 1.100 Kb und weist die höchste Gendichte auf. Sie beinhaltet Faktoren des Komplementsystems (C2, C4A, C4B, Bf), die 21-Hydroxylase (CYP21), die Tumornekrose-Faktoren (TNF- α und - β) sowie Gene der Hitzeschock-Protein-Gruppe.

1.2.3 Struktur der HLA Moleküle

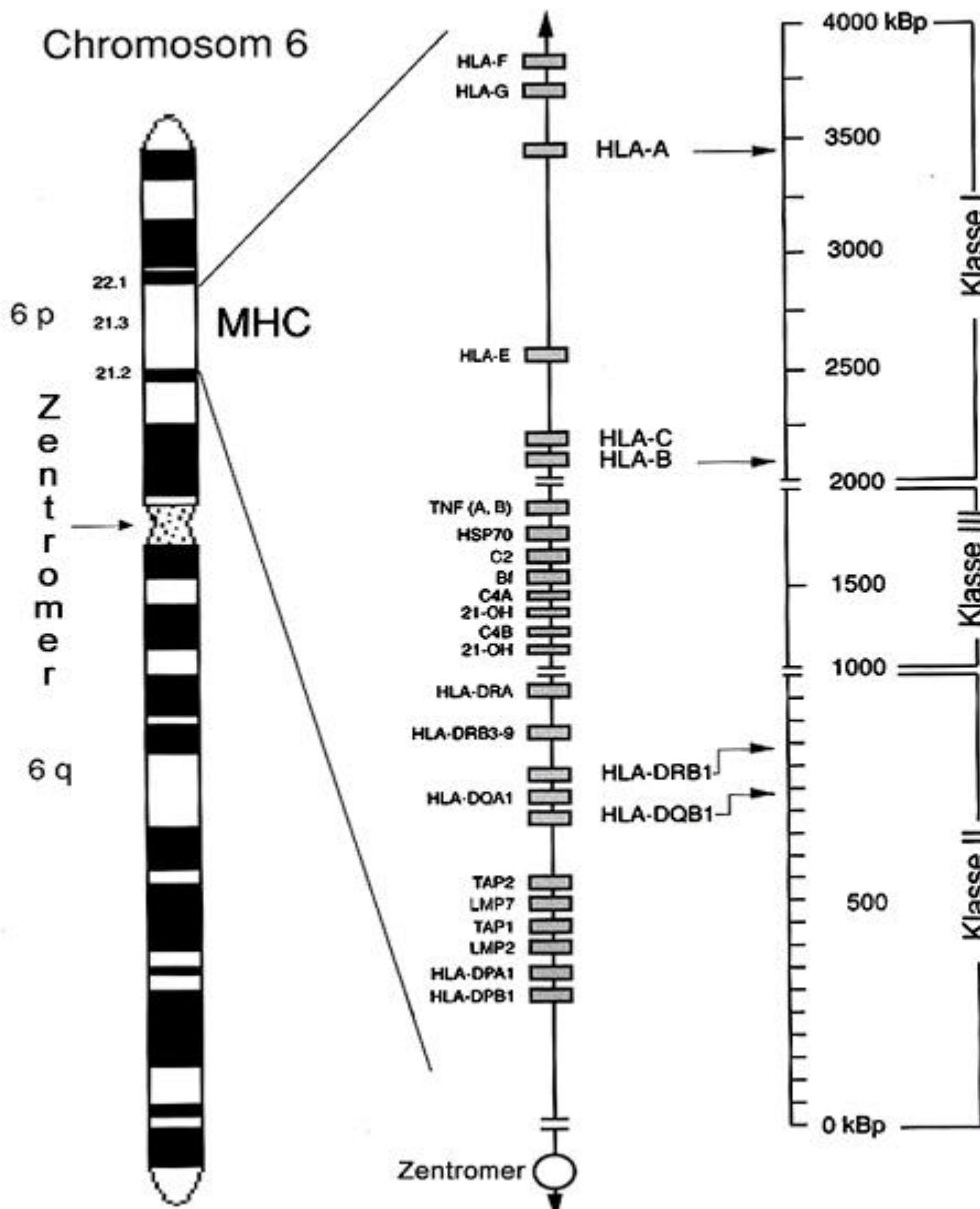


Abbildung 3: Genkarte Chromosom 6

HLA Klasse I-Antigene bilden mit dem nicht-polymorphen β 2-Mikroglobulin-Molekül ein Heterodimer. Im Gegensatz dazu bilden die Klasse II-Antigene Heterodimere aus jeweils einer HLA Klasse II α - und β -Kette mit unterschiedlich ausgeprägtem Polymorphismus (Klein J. und Sato A., 2000; Male D., 2001; Janeway C. et al., 2002).

1.1.4 HLA-Testungen

Neben den serologischen HLA-Bestimmungsmethoden werden neuere zelluläre, biochemische und molekularbiologische Nachweistechiken zur HLA-Typisierung herangezogen. Bei der molekulargenetischen Testung werden nur die polymorphen Exone

berücksichtigt. Dies sind bei den HLA Klasse I-Antigenen die Exone 2 und 3 und bei den Klasse II-Antigenen Exon 2. Hierbei werden die HLA-Allele mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Einsatz von PCR-SSOP (Sequence-Specific-Oligonucleotide-Probes) definiert sowie der PCR-SSP (Sequence-Specific-Primers), der PCR-RFLP (Restriction-Fragment-Length-Polymorphism) und der PCR-SBT (Sequence-Based-Typing) analysiert (Albert E., 1997).

1.1.5 Funktion der HLA-Moleküle

Die Aufgabe der HLA-Moleküle besteht darin, Peptidfragmente endogener oder exogener Herkunft zu binden und diese auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Klasse I-Moleküle sind für die Präsentation von Peptiden aus endogenen autologen oder viralen Proteinen verantwortlich (Heemels M.T., 1995; Ploegh H., 1995). Klasse II-Moleküle präsentieren Peptide bevorzugt aus endozytierten Proteinen (Neefjes J.J. et al., 1990; Neefjes J.J. et al., 1991). Die spezifische Antigenerkennung von T-Zellen erfolgt durch einen Komplex, welcher aus dem HLA-Molekül, dem prozessierten Antigen und dem TZR besteht. Die T-Zellen können dabei nicht nur das präsentierte Antigen erkennen, sondern sie sind in der Lage, zwischen autologen und allogenen HLA-Molekülen zu unterscheiden (Zinkernagel R.M., 1974; Doherty P.C., 1974; Garcia K.C. et al., 1998).

Untersuchungen der HLA-Moleküle ermöglichen tiefere Einblicke in die Abläufe immunologischer Abwehrmechanismen und in die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen.

1.1.6 HLA-Krankheitsassoziationen

Die Untersuchungen von HLA-Antigenen ergeben bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen (Tabelle 4), wie z.B. Diabetes mellitus und Morbus Bechterew, eine Assoziation mit bestimmten HLA-Merkmalen, d.h. bei Individuen mit bestimmten Erkrankungen sind bestimmte HLA-Allele häufiger oder seltener exprimiert als in der gesunden Bevölkerung (Svejgaard A. et al., 1982; Schievink W.I., 1997).

Ein weiteres Einsatzgebiet der HLA-Typisierung ist die Forensik, zum Beispiel zur Erstellung von Vaterschaftsgutachten.

Die Kenntnisse über die Struktur der HLA-Antigene und ihre biologische Funktion führten seither zu einem besseren Verständnis der Immunpathomechanismen. Mit molekularbiologischen Untersuchungstechniken können bei einigen Erkrankungen sogar Allele bzw.

Aminosäuresequenzen im HLA-Molekül definiert werden, die für die Krankheitsentstehung mitverantwortlich sind. Einige hervorzuhebende primäre Genassoziationen sind (Weyand C.M., 1997; Goronzy J.J., 1997):

Krankheit	HLA-Merkmal	relatives Risiko
Ankylosierende Spondylitis (M. Bechterew)	B27	87,4
Reaktive Arthropathie, incl. M. Reiter	B27	37,0
Akute Iridozyklitis	B27	10,4
Rheumatoide Arthritis	DR4	4,2
Morbus Behcet	B51	3,8
Lupus Erythematodes (SLE)	DR3, B8	5,8; 2,8
Insulin-dependent Diabetes mellitus (IDDM)	DR3, DR4	3,3; 6,4
Dermatitis herpetiformis	DR3	15,9
Alopecia areata	DR4, DR11	6,1
Psoriasis vulgaris	Cw6	13,3
Sicca Syndrome	DR3	9,7
Idiopathische membranöse Nephropathie	DR3	12,0
Goodpasture's Syndrome	DR2	15,9
Zöliakie	DR3, DR7, DR11	10,8; 6; 10
Multiple Sklerose	DR2, DR1, DRw51	4,1
Narcolepsie	DR2	16,9
Idiopathische Hämochromatose	A3	8,8

Tabelle 4: HLA-Krankheitsassoziationen (Weyand C.M., 1997)

Tabelle 4 zeigt die stärksten bekannten Assoziationen von HLA-Merkmalen mit dem Auftreten von bestimmten Erkrankungen. Die Stärke der Assoziation spiegelt sich am

relativen Risiko wider. Es gibt an, um wie viel das Risiko eines Trägers mit einem bestimmten Antigen erhöht ist, die entsprechende Krankheit im Vergleich zu einer Person zu bekommen, die das Antigen nicht besitzt.

Weiterhin ist die Kenntnis des HLA-Musters besonders im Rahmen der Transplantation von großer Bedeutung, da die Kompatibilität der HLA-Merkmale zwischen Spender und Empfänger über den klinischen Verlauf nach erfolgter Transplantation entscheidet.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das gehäufte familiäre Auftreten von intrakraniellen Aneurysmen und die Assoziation von IA mit autosomal vererbaren Erkrankungen deuten auf einen genetischen Hintergrund hin. Erste Hinweise, dass das HLA-System mit dem Auftreten von IA assoziiert ist, wurden durch die Untersuchungen von Ostergaard J.R. et al., 1987, und Norrgard O. et al., 1987 geliefert. Jedoch wurden nach heutigen Maßstäben unzureichende serologische Methoden verwendet, mit denen viele Allele nicht detektiert werden konnten, insbesondere die HLA-C-Allele.

In Rahmen dieser Promotionsarbeit soll geprüft werden, (i) ob bestimmte HLA-Merkmale mit dem Auftreten des IA assoziiert sind, (ii) ob die Frequenzen der HLA-Merkmale sich bei IA-Patienten mit und ohne subarachnoidale Blutung unterscheiden und (iii) ob HLA-Merkmale etabliert werden können, die IA-Patienten mit einem hohen Risiko für eine SAB identifizieren.

Hierfür wurden konsekutiv in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Essen aufgenommene und behandelte, nicht selektierte IA-Patienten (N = 194) auf ihre HLA-Merkmale untersucht, mit den HLA-Merkmalen der normalen Bevölkerung verglichen und die Verteilung der IA sowie vorhandene Risikofaktoren bezüglich der IA untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studien sollen helfen,

- a) die Aneurysmaerkrankung besser zu verstehen.
- b) Patienten mit einem bisher nicht rupturierten Aneurysma hinsichtlich der Prognose und/oder Behandlungsmöglichkeit besser zu beraten..
- c) die Verwandten eines SAB-Patienten (verursacht durch IA) über eigene Risiken und Screeningmöglichkeit aufzuklären.

3 Material

3.1 Chemikalien

- Agarose (Molecular Biology Grade, EP-0010-05, Eurogentec)
- Aqua ad injectabilia (4221C12, Braun)
- Ammonium Sulphat (13378, Serva)
- Äthanol 96 % (8006, J.T.Baker)
- Borsäure zur Analyse (1.00165.5000, Merck)
- Cresol Red Natrium Salz (C-9877, Sigma-Aldrich)
- Deoxynukleotid-Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 100A, Sigma-Aldrich)
- Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml, 15585-011, Invitrogen)
- EDTA, Di-Natriumsalz (11280, Serva)
- Ficoll-Plaque Plus (17-1440-03, Amersham Biosciences)
- Kaliumhydrogenkarbonat (4854.0500, Merck)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat (1.05833.0250, Merck)
- Mineralöl (M3516-1L,Sigma)
- Salzsäure (HCl), 37 % (1.00317.2500, Merck)
- Taq-Polymerase (Qiagen)
- Tris(hydroxymethyl)-aminoethan [(TRIS),1.08382.2500, Merck]

3.2 Lösungen

- 5 x TBE (Tris, Borat, EDTA) für Gelelektrophorese (Stammlösung)
- 0,5 TBE (Gebrauchslösung)

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
- 0,045 mM Borsäure
- 1,0 mM EDTA, pH 7,4
- 10 g/L Cresol Red in PCR-Puffer
- 10 x PCR-Lösung
- 100 mM Tris-HCl, pH 7,4
- 500 mM KCl
- 2,5 mM MgCl₂
- 10 % Ficoll-Plaque
- 200 mM dNTP-Lösung
- HLA Klasse I und HLA Klasse II spezifische PCR-SSP

3.3 Geräte

- Analysewaage
- PCR-Thermal-Cycler
- Heizblock (Perkin Elmer Cetus 9.600)
- Kühlschrank mit Gefrierfach
- Elektrophoresegeräte (MJ Research PTC 100 / 200)
- Kammer: Elektro4-System, Hybaid
- Netzgerät: Power/Pac 3000, Biorad
- Photodokumentation (Cybertech CS1, Berlin)
- DNS-Spektralphotometer (GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech)

- Zentrifugen (Micro 20, Hettig; Laborzentrifuge 5810, Eppendorf)
- UV-Transluminator (TM-36, UVP)
- DNS-Isolierungsautomat (Chemagic Magnetic Separation Module I, Chemagen)
- Hamilton Mikroliter Dispenser (Dispenser 50 µl, Hamilton)

3.4 Verbrauchsmaterialien

- 0,2 ml Thermowell Tube Strips (Corning-Costar)
- 96 Well PCR-Platten (50 Qyt/Cs, Corning-Costar)
- DNS-Isolierung (QiaAmp Blood kit, Qiagen)
- Nucleo Spin Blood 250, Macherey-Nagel (Chemagic DNA Buffy Coat, Chemagen)

3.5 Polymerasekettenreaktion sequence specific primer, PCR-SSP

HLA-A, -B, -C spezifische Primer (Institut für Immunologie, Abteilung Transplantationsimmunologie, Universitätsklinikum Heidelberg)

HLA-DRB1 und -DQB1-spezifische Primer (Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Essen)

4 Methoden

4.1 Beschreibung des Normalpersonen- und Patienten-Kollektivs

Das Kollektiv der Kontrollgruppe (N = 174) umfasst nicht-verwandte Blutspender aus dem Essener Raum. Alle Normalpersonen sind molekulargenetisch auf HLA Klasse I (HLA-A, -B, und -C) und HLA Klasse II (HLA-DRB1* und DRB1) getestet worden (Ferencik S., Grosse-Wilde H., 1997).

Blutproben von Patienten mit einem oder mehreren IA sind von der Klinik der Neurochirurgie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt worden. Von den 194 Patienten haben 143 mindestens ein rupturiertes IA und 51 mindestens ein nicht-rupturiertes IA. Die Patienten sind nicht selektiert, sondern konsekutiv in der Klinik für Neurochirurgie aufgenommen worden. Die Ermittlung der Risikofaktoren erfolgte mit Hilfe der Patientenanamnese. Alkoholabusus wird festgelegt als ein Konsum von mehr als 40 g Alkohol pro Tag bzw. mehr als 3/4l Bier oder mehr als 3/8 l Wein pro Tag für Männer und mehr als 20 g/Tag bzw. 1/2 l Bier oder 1/4 l Wein pro Tag für Frauen unabhängig davon, ob körperliche, psychische oder soziale Schäden direkt nachzuweisen sind. Ein Raucher wird festgelegt als eine Person, die mindestens 5 Zigaretten pro Tag über einen Zeitraum von einem Jahr konsumiert hat (Herold G., 2005). Anhand der Patientenakten und im persönlichen Gespräch mit den Patienten und/oder deren Angehörigen werden postoperative Komplikationen wie Hydrozephalus, Nachblutung, Krampfanfälle und Tod ermittelt.

4.2 Präparation der genomischen DNS

Die manuelle Isolierung der DNS erfolgt aus Na₂EDTA / Heparin Blutproben nach dem Standardprotokoll der Firmen Qiagen bzw. Mecherey-Nagel mit Hilfe der Säulenchromatographie. Ein Teil der Proben (N = 74) wird mittels der magnetischen Beads am automatischen System der Firma Chemagen isoliert. Der DNS-Gehalt und die Proteinkontamination werden bei allen DNS-Proben photometrisch als Absorption (A) bei 260 und 280 nm gemessen und die A_{260/280} Ratio bestimmt. Die DNS-Proben werden bei minus 20 °C gelagert.

4.3 Prinzip der PCR-SSP

Die HLA Klasse I-Merkmale (A, B, C) und Klasse II (DRB1, DQB1) werden mittels PCR-SSP nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf dem Einsatz der Merkmal bzw. Allel-spezifischen Primer, die in den entsprechenden Regionen (Exon 2 und 3 bei der Klasse I und Exon 2 bei der Klasse II) ihre komplementären Sequenzen in cis/trans-Kombination erkennen, wobei der spezifischer Nachweis zwischen jeweils einem 5'- und 3'-gruppenspezifischen Primerpaar mittels PCR erfolgt. Bei der generischen HLA DNA-Testung richtet sich die Anzahl der einzelnen Primerpaare in der Regel nach den bereits serologisch definierten HLA-Spezifizitäten. Somit werden für eine HLA-A-Testung insgesamt 24 Primerpaare benötigt, für die HLA-B-Testung 48, für die HLA-C-Testung 22 und für die HLA-DRB1*- und HLA-DQB1*-Typisierungen insgesamt 45 Primerpaare. Für alle HLA-DRB1*- und -DQB1-Primermixe, bei denen das Vorhandensein bzw. Fehlen eines spezifischen PCR-Produktes als Typisierungsinformation für den HLA-Genort dient, wird ein Primerpaar zur Amplifizierung eines Fragmentes des humanen Wachstumshormogens als interne Amplifizierungskontrolle eingesetzt. Dieses Primerpaar erkennt nicht-allelische Regionen des HLA und amplifiziert ein 394 Bp-Fragment. Für die HLA Klasse I-Testung wird als interne Amplifizierungskontrolle ein 100 Bp-Fragment des β 2 Globin-Gens eingesetzt.

4.4 Durchführung der PCR-SSP

4.4.1 DNS-Konzentrationsberechnung für HLA Klasse I und Klasse II

Pro HLA Klasse I- und II-Testungen werden jeweils 220 μ l bzw. 110 μ l als Endvolumen des Mastermixes benötigt.

Pro Amplifizierung wird 30 ng der genomischen DNS eingesetzt. Das berechnet sich wie folgt:

Formel 1: Berechnung des DNS-Endvolumens für die HLA Klasse I-Testung

$$\text{Das zu pipettierende DNS-Volumen} = \frac{\alpha \times 30 \text{ ng DNS}}{\text{DNS Konzentration (ng/\mu l)}}$$

(a = Anzahl der PCR-Positionen; für HLA Klasse I: $\alpha = 96$, für HLA Klasse II: $\alpha = 45$)

4.4.2 Herstellung des Mastermixes

14 µl bzw. 3 µl der Taq-Polymerase werden in ein 1,5 ml-Röhrchen pipettiert. Für jede Position für die HLA-Testung werden jeweils 0,3 Units der Taq-Polymerase benötigt.

14 µl Taq-Polymerase und 3.000 ng für die Klasse I oder 1.500 ng für die Klasse II der genomischen DNS werden mit Ampuwa auf 220 µl bzw. 110 µl Endvolumen aufgefüllt und sorgfältig gemischt. Mit Hilfe des Hamilton-Dispensers werden jeweils 2 µl zum entsprechenden Primermix gegeben.

4.4.3 Amplifizierung der HLA Klasse I- und Klasse II-Merkmale

Das Programm für die Amplifikation setzt sich immer aus drei Zyklen zusammen: der Denaturierung, gefolgt von der Primer Hybridisierung (Annealing), und der DNS-Synthese. Für den Erfolg der Amplifikation ist die Annealing-Reaktion von entscheidender Bedeutung. Für das Klasse II-Primermix beträgt die Gesamtdauer der Amplifizierung ca. 1 Stunde und 10 Minuten. Die Gesamtdauer der HLA Klasse I-Amplifizierung beträgt ca. 1 Stunde und 45 Minuten.

HLA Klasse I			HLA Klasse II		
Temperatur (°C)	Zeit (s)	Wiederholung	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Wiederholung
96	205	1	96	130	1
70	25	5	65	60	10
72	45	1	96	10	1
96	25	1	60	30	22
65	50	21	72	30	1
72	45	1			
96	25	1			
55	60	4			
72	120	1			

Tabelle 5: HLA Klasse I- und II-Amplifizierung

4.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse der HLA-Merkmale werden in einem 400 ml-Kolben 2 g Agarose mit 100 ml eines 0,5 x TBE-Puffers zusammengemischt und im Mikrowellengerät bei 700 Watt

(W) ca. 2 min. vollständig aufgelöst. Die Agaroselösung wird für ca. 15 Sekunden unter Leitungswasser abgekühlt und mit 4 µl Ethidium Bromidlösung versetzt, durch Schwenken gemischt und in die vorbereitete Gelbetten gegossen. Danach werden die Kämme zur Bildung von Probenauftragetaschen eingesetzt. Die Agarose wird ca. 30 min. zum Polymerisieren stehen gelassen. Kurz vor der Gelelektrophorese werden die Kämme entfernt.

Das fertige Agarose-Gel (2 %, w/v) wird in die Elektrophorese-Kammer mit ca. 500 ml 0,5 TBE-Puffer gelegt. Das Gesamtvolumen der Amplifizierungsgemische (10 µl) wird vorsichtig auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgt bei einem Anfangsstrom von 340 Milliampere (mA) und einer Leistung von 140 W.

4.4.5 Fotodokumentation

Nukleinsäuren fluoreszieren nach Einlagerung von Ethidiumbromid unter UV-Licht (Wellenlänge von ca. 5 - 400 nm). Wie an folgenden Beispielen dargestellt, werden die Gele nach der Elektrophorese mit Hilfe des Cybertech CS1-Systems fotografiert und ausgewertet.

Für das unten gezeigte Protokoll-Foto (Abbildung 4) sind die Gelpositionen Nummer 9, 13, 21 und 22 fluoreszierend. Dies entspricht laut Testprotokoll dem HLA-DRB1*0701, 1101-1131. Die Positionen 16, 17, 18 und 20 fluoreszieren auf dem Foto (auch Abbildung 4). Verglichen mit dem Testprotokoll entspricht dies den HLA-DQB1*0301, 0303.

TESTPROTOKOLL:				Charge:	05-03-04
DRB1*:	0701, 1101-1131	DRB3*: pos.	DRB5*: neg.	Modifiziert am 28.12.2004	
DQB1*:	0301, 0303	DRB4*: pos.			
Position	HLA-DRB1*	Gelfoto	Position	HLA-DQB1*	
1	0101-02,0104,0104-07		1	0501	
2	0103		2	0502	
3	1501-1506		3	0503	
4	1601-1608		4	0504	
5	0301-0311,1107		5	0601	
6	0301;0303;(0304 nur Position 6) 0305		6	0602	
7	0302,1302;1305 1402;1403;1409		7	0603	
8	0401-0424;1410		8	0604	
9	0701		9	0605	
10	0801-0819		10	0606	
11	09011-09012		11	0602,0603 0607,0608,0609	
12	1001		12	0604,0605 0606,0607,0608	
13	1101-1131		13	0604,0605 0606	
14	1201-1205		14	0201/02	
15	1301;1302;1306 1307-1332		15	0201/02,0302	
16	1303;1304		16	0301,0304	
17	1305		17	0302,0303	
18	1401;1404;1405 1407;1408;1411 1412-1427		18	0303	
19	1305;1306;1402 1403;1406;1409		19	0304,0305	
20	1410		20	0301,0601	
21-DRB3*	0101-0301		21	0401	
22-DRB4*	0101-0301		22	0402	
23-DRB5*	0101-0204				

Abbildung 4: Auswertungsprotokoll für HLA-DRB1* und -DQB1*

4.5 Statistische Auswertung

Die klinischen Parameter der Patienten werden als Mittelwert (\pm SEM) angegeben. Vergleiche innerhalb der Patienten werden mittels Whitney-Mann-Test durchgeführt. Als Maß für die Stärke einer Assoziation wird das relative Risiko (RR) verwendet. Ein RR-Wert von $> 1,0$ bedeutet eine positive, ein Wert unter $1,0$ eine negative Assoziation. Bei der Assoziationsanalyse der HLA-Merkmale bei Patienten mit intrakraniellen Aneurysmen werden die verschiedenen HLA-Merkmale in einer unverwandten Patientenpopulation mit der Verteilung der HLA-Merkmale in der gesunden Kontrollpopulation verglichen. Der Vergleich erfolgt in einer χ^2 -Berechnung. Signifikante p-Werte werden nach Bonferroni korrigiert, wobei alle p-Werte $< 0,05$ als signifikant festgelegt werden.

Die Verteilung der HLA-Merkmale in der Bevölkerung wird über Phänotyp- und Genfrequenzen dargestellt. Zur Bestimmung der Phänotypfrequenz (F) wird die Anzahl der Personen mit einem bestimmten Merkmal ermittelt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Personen gesetzt. Die Genfrequenz (g) wird aus der Phänotypfrequenz nach folgender Formel berechnet:

$$g = 1 - \sqrt{1 - F}$$

5 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Assoziation bestimmter HLA-Merkmale und dem Auftreten von intrakraniellen Aneurysmen. Dabei werden erworbene Risikofaktoren und IA-bedingte Komplikationen berücksichtigt.

5.1 Klinische Beschreibung der IA-Patienten

Insgesamt sind 143 IA-Patienten mit SAB und 51 Patienten ohne SAB im Alter von 23 - 83 Jahren in dieser Studie konsekutiv eingeschlossen. Alle Patienten waren im Zeitraum von 1997 bis 2003 in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Essen mit bestätigten IA behandelt worden.

Die Tabelle 6 zeigt das demographische Profil der IA-Patienten. Zusätzlich werden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: Patienten mit und ohne aneurysmatische Subarachnoidalblutung.

	IA-Patienten (N = 194)	SAB (N = 143)	ohne SAB (N = 51)	P
Geschlecht (m : w)	72 : 122	46 : 97	26 : 25	0.01
Alter (Mittelwert ± SEM)	51.1 ± 12.9	51.3 ± 13.2	50.8 ± 11.8	n.s.
Anzahl der Aneurysmen	IA-Patienten (%)	SAB (%)	ohne SAB (%)	P
1	76.3	74.1	82.4	n.s.
2	18.1	20.3	11.8	n.s.
3	5.6	5.6	5.8	n.s.

Tabelle 6: Demographisches Profil der Patienten

(N = Anzahl der Patienten; n.s.= nicht signifikant; P: SAB vs. ohne SAB)

In dieser Studie befinden sich insgesamt 122 weibliche und 72 männliche Personen. Während das Geschlechterverhältnis bei den Patienten ohne SAB ausgewogen ist, sind mehr als doppelt so viele Patienten mit SAB weiblich ($p = 0.017$, $RR = 1.24$; chi-square Test).

Das Alter der Patienten unterscheidet sich innerhalb der zwei Patientengruppen nicht wesentlich (IA-Patienten mit SAB vs. IA-Patienten ohne SAB \pm SEM; 51.3 ± 13.2 Jahre bzw. 50.8 ± 11.8 Jahre).

5.1.1 Anzahl und Lokalisation der IA

148 Patienten (76,3 %) der insgesamt 194 Patienten beherbergten ein einziges Aneurysma. 35 der 194 Patientin Patienten (18,1 %) weisen zwei Aneurysmen auf, während 11 der 194 Patienten (5,6 %) drei IA beherberge. Die Verteilung der Anzahl der Aneurysmen in den beiden Patientengruppen mit und ohne SAB ist ohne signifikante Abweichung von der gesamten Patientenpopulation: Patienten mit SAB haben in 74,1 % der Fälle ein Aneurysma, 20,3 % zwei und 5,6 % drei Aneurysmen. Ähnlich haben 82,4 % der Patienten ohne SAB ein Aneurysma, 11,8 % zwei, und 5,8 % drei Aneurysmen.

Die Verteilung der Aneurysmen an den intrakraniellen Arterien bei den Patienten dieser Studie konzentriert sich um den Circulus arteriosus Willisii (Tabelle 7). Insgesamt beherbergen die 194 IA-Patienten 243 Aneurysmen. 81, 66, 58 der Aneurysmen befinden sich an der ACA, ACI bzw. an der MCA. Das vertebrobasiläre System beherbergte 38 der 243 Aneurysmen. Die 243 Aneurysmen verteilen sich gleichmäßig in den zwei Patientengruppen. Patienten mit und ohne SAB weisen 180 bzw. 63 Aneurysmen auf. Unter Berücksichtigung der Patientenzahl der beiden Gruppen (143 für Patienten mit SAB bzw. 51 für Patienten ohne SAB) unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht signifikant. Jedoch sind innerhalb der jeweiligen Gruppe Unterschiede in der Lokalisation der Aneurysmen vorzufinden. Bei Patienten mit SAB sind 63 (35,0 %) der 180 Aneurysmen an der ACA lokalisiert. Demgegenüber sind 48 Aneurysmen (26,7 %) an der ACI, 42 (23,3 %) an der MCA und die restlichen 27 (15,0 %) im vertebrobasilären System lokalisiert.

Bei den Patienten ohne SAB sind genau so viele Aneurysmen an der A. cerebri anterior wie an der A. carotis interna [jeweils 18 Aneurysmen (28,6 %)] lokalisiert, 16 Aneurysmen (25,4 %) sind an der A. cerebri media lokalisiert. Im vertebrobasilären System ließen sich 11 Aneurysmen (17,4 %) bei den Patienten ohne aneurysmale subarachnoidale Blutung nachweisen.

Ort der Aneurysmen	IA-Patienten (N = 194)	SAB (N = 143)	ohne SAB (N = 51)	P
ACA	33.3 %	35.0 %	28.6 %	n.s.
ACI	27.2 %	26.7 %	28.6 %	n.s.
MCA	23.9 %	23.3 %	25.4 %	n.s.
Vertebrobasilärer Kreislauf	15.6 %	15.0 %	17.4 %	n.s.

Tabelle 7: Lokalisation der IA (N = Anzahl der Patienten; n.s. = nicht signifikant)

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass sich die Patienten mit und ohne SAB nicht signifikant unterscheiden hinsichtlich der Anzahl der IA und ihrer Lokalisation.

5.1.2 Risikofaktoren der IA-Patienten

Da das Vorkommen von arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, hohem Alkoholkonsum, Hyperlipidämie und koronarer Herzkrankheit zu den wichtigsten Risikofaktoren der Aneurysmaentstehung und -ruptur zählen, sind diese über Patientenbefragungen, im persönlichen Gespräch mit Patienten oder deren Angehörigen, ermittelt worden (Tabelle 8). Zusätzliche Informationen wurden aus den jeweiligen Patientenakten entnommen.

Bei 85 der 194 (43.8 %) IA-Patienten ist Hypertonie als Risikofaktor eines Aneurysmas ermittelt worden. 14 (7.21 %) der Aneurysma-Patienten sind an Diabetes mellitus erkrankt. Erhöhte Blutfettwerte (Hyperlipidämie) sind bei 32 (16.5 %) der Patienten mit intrakraniellen Aneurysmen festgestellt worden. 29 (14.9 %) der Patienten in dieser Studie leiden an einer koronaren Herzkrankheit.

Nach der in Abschnitt 4.1 aufgeführten Definition konsumierten 17 der 194 (8.8 %) IA-Patienten übermäßig Alkohol. 59 (30.4 %) der Aneurysma-Patienten waren Raucher. Diese erworbenen Risikofaktoren treten in beiden Gruppen gleich häufig auf.

51 (26.3 %) Patienten der Studie litten an mindestens einer der folgenden Erkrankungen: Tinnitus, Niereninsuffizienz, Nephrolithiasis, Hypothyreose, Hyperthyreose, chronisch-obstruktive Lungenkrankheit, Ikterus, Migräne, Asthma bronchiale, Sepsis, Venenthrombose, Taubheit oder Leberzellkarzinom.

Bei 61 (31.4 %) der Aneurysma-Patienten waren gleichzeitig drei Risikofaktoren vorhanden und bei mehr als 20 (10.3 %) Patienten waren mindestens vier Risikofaktoren vorhanden.

Bezüglich arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Alkoholabusus, Hyperlipidämie und koronarer Herzerkrankungen unterscheiden sich die Patienten mit und ohne SAB nicht. Allerdings war der Anteil der Patienten mit anderen Zusatzerkrankungen wie Niereninsuffizienz, Nephrolithiasis, Hypothyreose, Hyperthyreose, chronisch-obstruktiver Lungenkrankheit und Venenthrombose in der SAB-Patientengruppe signifikant erhöht ($p = 0.04$).

Erblich bedingte Erkrankungen wie das Noonan Syndrom, Achondroplasie, das Ehlers-Danlos Syndrom, Neurofibromatose Typ 1, Pseudoxanthoma elasticum, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, das Marfan-Syndrom und die autosomal-dominante polyzystische Krankheit (ADPKD), die eine zusätzliche Rolle bei der Entstehung von IA spielen sollen, sind bei den Patienten in dieser Studie nicht dokumentiert.

Risikofaktoren	IA Patienten (N = 194)	SAB (N = 143)	ohne SAB (N = 51)	P
Hypertonie	85 (43.8)*	60 (42.0)*	25 (49.0)*	n.s.
Diabetes mellitus	14 (7.2)	11 (7.7)	3 (5.9)	n.s.
Alkoholabusus	17 (8.8)	10 (7.0)	7 (13.7)	n.s.
Rauchen	59 (30.4)	40 (28.0)	19 (37.3)	n.s.
Hyperlipidämie	32 (16.5)	22 (15.4)	10 (19.6)	n.s.
Koronare Herzkrankheit	29 (14.9)	22 (15.4)	7 (13.7)	n.s.
andere Erkrankungen	51 (26.3)	43 (30.8)	8 (15.7)	n.s.

Tabelle 8: Risikofaktoren bei Aneurysmapatienten

[(^{*} Definition Anzahl der Ereignisse (% der betroffenen Patienten)]; ein Patient kann mehr als ein Risikofaktor aufweisen; P^o: SAB-Pat. vs. Pat. ohne SAB; n.s. = nicht signifikant]

5.1.3 Prognosefaktoren und postoperative Komplikationen der IA-Patienten

Wichtig für die Prognose der Patienten sind neben dem Ort, der Größe und der Lokalisation der Aneurysmen sowohl der Hunt und Hess-Grad als auch das Auftreten von postoperativen Komplikationen.

Das Einteilungsschema nach Hunt und Hess (Hunt W.E. und Hess R.M., 1968) ist wertvoll für die Beurteilung und Verlaufsbeobachtung von IA-Patienten mit SAB. 15 (10,5 %) der insgesamt 143 Patienten mit SAB haben nach Hunt und Hess eine Blutung Grad I, 54 (37,8

%) Patienten liegen im Bereich von Grad II und 35 (24.5 %) im Bereich von Grad III. 27 (18.9 %) Patienten mit SAB sind dem Grad IV und 12 (8.4 %) dem Grad V zuzuordnen. Demzufolge waren rund 27 % der Patienten mit SAB höheren Hunt und Hess-Schweregraden (Grad IV und V) zuzuordnen. Demgegenüber sind bei Patienten ohne SAB 20 (39,2 %), 16 (31,4 %), 10 (19,6 %) den Graden I, II oder III zuzuordnen. Und nur 5 (9,8 %) Patienten ohne SAB haben eine Hunt und Hess-Grad IV.

Bei den Patienten dieser Studie traten postoperativ folgende Komplikationen auf: Krampfanfälle, Vasospasmus, Hydrocephalus und Re-Blutung, wobei alle diese Patienten zur Gruppe der SAB-Patienten gehören. 28 der Patienten litten postoperativ an Krampfanfällen. Bei 39 der 194 IA-Patienten (bzw. der 143 SAB-Patienten) war ein Vasospasmus aufgetreten. Ein Hydrocephalus im Sinne einer Liquorzirkulationsstörung war bei 85 Patienten aufgetreten.

Innerhalb von 12 Monaten nach Diagnose des intrakraniellen Aneurysmas verstarben 23 der 194 (11.9 %) Patienten, 20 davon waren Patienten mit SAB, drei dieser Patienten hatten ein Aneurysma ohne eine Ruptur (p ist nicht signifikant). Dies entspricht 5,9 % der Patienten ohne SAB. Der Vergleich der Patienten mit und ohne SAB ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Überlebens.

Zusammengefasst zeigen die klinischen Daten, dass die Verteilung der Patienten mit und ohne SAB sich nur hinsichtlich ihres Geschlechts, aber nicht hinsichtlich der obigen Risikofaktoren wie Hypertonie, Rauchen und Diabetes mellitus unterscheiden.

5.2 HLA-Allelfrequenzen der IA-Patienten im Vergleich zum Normalkollektiv

Um den genetischen Hintergrund der Pathogenese von intrakraniellen Aneurysmen zu studieren, sind alle Patienten molekulargenetisch getestet worden hinsichtlich ihrer HLA-Merkmale Klasse I (HLA-A, -B und -C) und HLA Klasse II (HLA-DRB1* und -DQB1*). Die HLA-Allelfrequenzen der 194 Patienten wurden nach der Typisierung ermittelt und mit denen des Normalkollektivs (N = 174) verglichen.

5.2.1 HLA Klasse I-Allelfrequenzen der IA-Patienten

In den Tabellen 9 und 10 ist die Verteilung der HLA-A-, -B-, und HLA-C Allelfrequenzen der IA-Patienten und des Normalkollektivs dargestellt.

Bei IA-Patienten treten die HLA Klasse I Allele B*44, Cw*06 und Cw*16 im Vergleich zum Normalkollektiv vermehrt auf, während die HLA-B*8 und Cw*02-Allelfrequenzen erniedrigt sind. Die Bonferroni-Korrektur, die jeweils die Gesamtanzahl der nachgewiesenen Antigene berücksichtigt, ergibt jedoch nur für HLA-Cw*16 eine signifikante ($p = 0,013$) Erhöhung. Demzufolge haben Individuen mit dem HLA-Cw*16-Allel ein relatives Risiko von 7,6, ein Aneurysma zu entwickeln. Die Odds Ratio beträgt hierbei 8,26.

Diabetes mellitus gehört zu den Risikofaktoren für die Entstehung der IA. Diabetes mellitus ist jedoch auch eine autoimmune Erkrankung mit genetischem Hintergrund. Bei Ausschluss der IA-Patienten mit bekanntem Diabetes mellitus ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zu den obigen Ergebnissen.

HLA-	Patienten (N = 194)		Kontrollen (N = 174)		pc	RR
	N	Af.	N	Af		
A*						
1	54	15.1	45	13.9	n.s.	-
2	95	28.6	89	30.1	n.s.	-
3	63	17.8	50	15.6	n.s.	-
11	15	3.9	15	4.4	n.s.	-
23	11	2.9	6	1.7	n.s.	-
24	32	8.6	33	10.0	n.s.	-
25	10	2.6	8	2.3	n.s.	-
26	9	2.3	11	3.2	n.s.	-
29	13	3.4	7	2.0	n.s.	-
30	6	1.6	8	2.3	n.s.	-
31	8	2.1	12	3.5	n.s.	-
32	13	3.4	6	1.7	n.s.	-
33	3	0.8	6	1.7	n.s.	-
34	2	0.5	0	0.0	n.s.	-
36	2	0.5	0	0.0	n.s.	-
66	2	0.5	0	0.0	n.s.	-
68	17	4.5	19	5.6	n.s.	-
Cw*						
01	10	2.6	19	5.6	n.s.	-
02	23	6.1	35	10.6	0.39	0.59
03	45	12.4	53	16.6	n.s.	-
04	50	13.8	31	9.3	n.s.	-
05	31	8.3	21	6.2	n.s.	-
06	45	12.4	21	6.2	0.06	1.92
07	100	30.4	103	36.1	n.s.	-
08	5	1.3	7	2.0	n.s.	-
12	21	5.6	17	5.0	n.s.	-
14	5	1.3	3	0.9	n.s.	-
15	7	1.8	6	1.7	n.s.	-
16	17	4.5	2	0.6	0.013	7.62
17	7	1.8	3	0.9	n.s.	-

Tabelle 9: Verteilung der HLA-A- und -C Allele von Patienten und dem Normalkollektiv

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, Pc = signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. vs. Kontrollen), RR = relatives Risiko, n.s. = nicht signifikant].

HLA-	Patienten (N = 194)		Kontrollen (N = 174)		pc	RR
	N	Af	N	Af		
B*						
7	53	14.7	44	13.5	n.s.	-
8	28	7.5	44	13.5	n.s. (0.29)	0.57
13	14	3.7	9	2.6	n.s.	-
18	13	3.4	8	2.3	n.s.	-
27	19	5.0	23	6.8	n.s.	-
35	37	10.0	23	6.8	n.s.	-
37	5	1.3	3	0.9	n.s.	-
38	5	1.3	8	2.3	n.s.	-
39	10	2.6	10	2.9	n.s.	-
41	4	1.0	6	1.7	n.s.	-
44	56	15.7	30	9.0	n.s. (0.28)	1.67
45	2	0.5	1	0.3	n.s.	-
47	1	0.3	0	0.0	n.s.	-
48	1	0.3	1	0.3	n.s.	-
49	1	0.3	4	1.2	n.s.	-
50	5	1.3	3	0.9	n.s.	-
51	20	5.3	18	5.3	n.s.	-
52	4	1.0	1	0.3	n.s.	-
53	2	0.5	0	0.0	n.s.	-
54	0	0.0	1	0.3	n.s.	-
55	1	0.3	11	3.2	n.s.	-
56	2	0.5	4	1.2	n.s.	-
57	14	3.7	9	2.6	n.s.	-
58	3	0.8	5	1.4	n.s.	-
59	0	0.0	1	0.3	n.s.	-
60	23	6.1	20	5.9	n.s.	-
61	6	1.6	10	2.9	n.s.	-
62	29	7.8	21	6.2	n.s.	-
64	0	0.0	1	0.3	n.s.	-
65	4	1.0	0	0.0	n.s.	-
71	0	0.0	1	0.3	n.s.	-
72	0	0.0	3	0.9	n.s.	-
81	1	0.3	0	0.0	n.s.	-

Tabelle 10: Vergleich der HLA-B-Allele von Patienten und dem Normalkollektiv

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, Pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. vs. Kontrollen), RR = relatives Risiko, n.s. = nicht signifikant].

5.2.2 HLA Klasse II-Allelfrequenzen der IA-Patienten

Die HLA-DRB1*- und -DQB1*-Allelfrequenzen der IA-Patienten sind in Tabelle 11 und 12 dargestellt. Eine fast gleichmäßige prozentuale Verteilung der HLA-DRB1*- und -DQB1*-Allelfrequenzen sind aus diesen Tabellen zu erkennen. Nach der Bonferroni-Korrektur sind signifikante Unterschiede für HLA-DRB1*07 (pc = 0.02) und DQB1*0603 (pc = 0.014) nachzuweisen. Hierbei ist im Vergleich zum Normalkollektiv die HLA-

DRB1*07-Allelfrequenz signifikant erhöht, während das Vorkommen des HLA-DQB1*0603-Allels bei IA-Patienten vermindert ist. Für das HLA-DRB1*07- und HLA-DQB1*0603-Allel errechnet sich ein relatives Risiko von 1.83 bzw. 0.39. Die Odds Ratio beträgt hierbei 2.19 bzw. 0.34.

HLA-	Patienten (N = 194)		Kontrollen (N = 174)		pc	RR
	N	Af	N	Af		
DRB1*						
01	51	14.1	42	12.9	n.s.	-
03	32	8.6	38	11.6	n.s.	-
04	43	11.8	39	11.9	n.s.	-
07	59	16.6	29	8.7	0.02	1.83
08	10	2.6	13	3.8	n.s.	-
09	0	0.0	5	1.4	n.s.	-
10	4	1.0	1	0.3	n.s.	-
11	41	11.2	34	10.3	n.s.	-
12	15	3.9	11	3.2	n.s.	-
13	49	13.5	46	14.2	n.s.	-
14	6	1.6	11	3.2	n.s.	-
15	63	17.8	61	19.4	n.s.	-
16	8	2.1	9	2.6	n.s.	-

Tabelle 11: Vergleich HLA-DR-Allele von Patienten und Normalkollektiv

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, Pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. vs. Kontrollen), RR = relatives Risiko, n.s. = nicht signifikant].

HLA-	Patienten (N = 194)		Kontrollen (N = 174)		pc	RR
	N	Af	N	Af		
DQB1*						
02	71	20.4	57	18.0	n.s.	-
0301	72	20.7	64	20.5	n.s.	-
0302	30	8.1	18	5.3	n.s.	-
0303	15	3.9	11	3.2	n.s.	-
0402	9	2.3	10	2.9	n.s.	-
0501	47	13.0	44	13.6	n.s.	-
0502	9	2.3	9	2.6	n.s.	-
0503	5	1.3	11	3.2	n.s.	-
0601	4	1.0	3	0.9	n.s.	-
0602	55	15.4	56	17.6	n.s.	-
0603	14	3.7	32	9.7	0.014	0.39
0604	16	4.2	9	2.6	n.s.	-

Tabelle 12: Verteilung der HLA-DQ-Allele von IA-Patienten und Normalkollektiv

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, Pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. vs. Kontrollen), RR = relatives Risiko, n.s. = nicht signifikant].

5.3 Vergleich der HLA-Allelfrequenzen zwischen Patienten mit bzw. ohne SAB und dem Kontrollkollektiv

5.3.1 Vergleich der HLA-Allelfrequenzen zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe

In den Tabellen 13, 14 und 15 ist der Vergleich zwischen Patienten mit bzw. ohne SAB und dem Kontrollkollektiv dargestellt. Pc-Wert und das RR beziehen sich auf die Analyse der Kontrollgruppe versus SAB-Patienten. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und Patienten mit SAB vs. Patienten ohne SAB sind mit pc* und RR* gekennzeichnet. Vergleicht man die Allelfrequenzen der Patienten mit SAB und der Kontrollgruppe (Tabelle 13 – 15), so wird eine signifikante Erhöhung von HLA-Cw*06 bei SAB-Patienten gefunden. Diese Signifikanz bleibt auch nach Bonferroni-Korrektur bestehen (pc = 0.021). Hierbei beträgt das RR 2.14 und die Odds Ratio 2.54.

Bei Patienten ohne SAB sind die Allelfrequenzen Cw*16 und DR*07 signifikant erhöht. Allerdings bleibt diese Signifikanz nicht bestehen, wenn man die HLA Klasse I und II-Allelfrequenzen von Patienten mit und ohne SAB direkt vergleicht. Lediglich für die HLA-Cw*16 zeigt sich ein Trend, der jedoch nach der Bonferroni-Korrektur verschwindet. Folglich sind die Allele Cw*16 und DRB1*07 bei Aneurysmapatienten erhöht.

Das HLA-Cw*16-Allel und das HLA-DRB1*07-Allel sind erhöht bei IA-Patienten ohne SAB. Das relative Risiko beträgt 15.35 (Odds Ratio = 18.43, pc = 0.0013) bzw. 2.12 (Odds Ratio = 2.73, pc = 0.05).

Ein Vergleich der übrigen Allele mit dem Normalkollektiv ergab keine nennenswerten Unterschiede.

HLA-	Kontrollen (N = 174)	SAB (N = 143)	ohne SAB (N = 51)	Kontrollen vs. SAB		Kontrollen vs. ohne SAB	
	N	N	N	Pc	RR	pc*	RR*
A*							
1	45	40	14	n.s.	-	n.s.	-
2	89	73	22	n.s.	-	n.s.	-
3	50	43	20	n.s.	-	n.s.	-
11	15	11	4	n.s.	-	n.s.	-
23	6	8	3	n.s.	-	n.s.	-
24	33	27	5	n.s.	-	n.s.	-
25	8	8	2	n.s.	-	n.s.	-
26	11	7	2	n.s.	-	n.s.	-
29	7	9	4	n.s.	-	n.s.	-
30	8	6	0	n.s.	-	n.s.	-
31	12	3	5	n.s.	-	n.s.	-
32	6	9	4	n.s.	-	n.s.	-
33	6	3	0	n.s.	-	n.s.	-
34	0	2	0	n.s.	-	n.s.	-
36	0	1	1	n.s.	-	n.s.	-
66	0	1	1	n.s.	-	n.s.	-
68	19	14	3	n.s.	-	n.s.	-

Tabelle 13: Vergleich HLA-A-Allele von Patienten mit und ohne SAB mit dem Normalkollektiv

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. mit SAB vs. Kontrollen), RR = relatives Risiko Pat. mit SAB, n.s. = nicht signifikant, pc* = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. ohne SAB vs. Kontrollen), RR* = relatives Risiko Pat. ohne SAB, n.s. = nicht signifikant].

HLA-	Kontrollen (N = 174)	SAB (N = 143)	ohne SAB (N = 51)	Kontrollen vs. SAB		Kontrollen vs. ohne SAB	
	N	N	N	Pc	RR	Pc*	RR*
B*							
7	44	41	12	n.s.	-	n.s.	-
8	44	16	12	n.s.	-	n.s.	-
13	9	11	3	n.s.	-	n.s.	-
18	8	11	2	n.s.	-	n.s.	-
27	23	14	5	n.s.	-	n.s.	-
35	23	25	12	n.s.	-	n.s.	-
37	3	3	2	n.s.	-	n.s.	-
38	8	4	1	n.s.	-	n.s.	-
39	10	8	2	n.s.	-	n.s.	-
41	6	3	1	n.s.	-	n.s.	-
44	30	38	18	n.s.	-	n.s.	-
45	1	2	0	n.s.	-	n.s.	-
47	0	1	0	n.s.	-	n.s.	-
48	1	1	0	n.s.	-	n.s.	-
49	4	1	0	n.s.	-	n.s.	-
50	3	5	0	n.s.	-	n.s.	-
51	18	14	6	n.s.	-	n.s.	-
52	1	4	0	n.s.	-	n.s.	-
53	0	0	2	n.s.	-	n.s.	-
54	1	0	0	n.s.	-	n.s.	-
55	11	0	1	n.s.	-	n.s.	-
56	4	2	0	n.s.	-	n.s.	-
57	9	12	2	n.s.	-	n.s.	-
58	5	3	0	n.s.	-	n.s.	-
59	1	0	0	n.s.	-	n.s.	-
60	20	19	4	n.s.	-	n.s.	-
61	10	5	1	n.s.	-	n.s.	-
62	21	8	21	n.s.	-	n.s.	-
64	1	0	0	n.s.	-	n.s.	-
65	0	3	1	n.s.	-	n.s.	-
71	1	0	0	n.s.	-	n.s.	-
72	3	0	0	n.s.	-	n.s.	-
81	0	1	0	n.s.	-	n.s.	-

Tabelle 14: Vergleich HLA-B-Allele von Patienten mit und ohne SAB mit dem Normalkollektiv

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. mit SAB vs. Kontrollen), RR = relatives Risiko Pat. mit SAB, n.s. = nicht signifikant, pc* = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. ohne SAB vs. Kontrollen), RR* = relatives Risiko Pat. ohne SAB, n.s. = nicht signifikant].

HLA-	Kontrollen (N = 174)	SAB (N = 143)	ohne SAB (N = 51)	Kontrollen vs. SAB		Kontrollen vs. ohne SAB	
	N	N	N	Pc	RR	Pc*	RR*
Cw*							
01	19	7	3	n.s.	-	n.s.	-
02	35	18	5	n.s.	-	n.s.	-
03	53	35	10	n.s.	-	n.s.	-
04	31	34	16	n.s.	-	n.s.	-
05	21	21	10	n.s.	-	n.s.	-
06	21	37	8	0.021	2.14	n.s.	-
07	103	77	23	n.s.	-	n.s.	-
08	7	3	2	n.s.	-	n.s.	-
12	17	17	4	n.s.	-	n.s.	-
14	3	5	0	n.s.	-	n.s.	-
15	6	3	4	n.s.	-	n.s.	-
16	2	8	9	n.s.	-	0.0013	15.35
17	3	6	1	n.s.	-	n.s.	-
DRB1*							
01	42	38	13	n.s.	-	n.s.	-
03	38	26	6	n.s.	-	n.s.	-
04	39	28	15	n.s.	-	n.s.	-
07	29	41	18	n.s.	-	0.05	2.12
08	13	5	5	n.s.	-	n.s.	-
09	5	0	0	n.s.	-	n.s.	-
10	1	2	2	n.s.	-	n.s.	-
11	34	33	9	n.s.	-	n.s.	-
12	11	10	5	n.s.	-	n.s.	-
13	46	42	7	n.s.	-	n.s.	-
14	11	5	1	n.s.	-	n.s.	-
15	61	48	15	n.s.	-	n.s.	-
16	9	5	3	n.s.	-	n.s.	-
DQB1*							
02	57	53	18	n.s.	-	n.s.	-
0301	64	54	18	n.s.	-	n.s.	-
0302	18	22	8	n.s.	-	n.s.	-
0303	11	11	4	n.s.	-	n.s.	-
0402	10	4	5	n.s.	-	n.s.	-
0501	44	32	15	n.s.	-	n.s.	-
0502	9	6	3	n.s.	-	n.s.	-
0503	11	5	0	n.s.	-	n.s.	-
0601	3	3	1	n.s.	-	n.s.	-
0602	56	45	10	n.s.	-	n.s.	-
0603	32	11	3	n.s.	-	n.s.	-
0604	9	12	4	n.s.	-	n.s.	-

Tabelle 15: Vergleich HLA-C-, -DR- und -DQ-Allele von Patienten mit und ohne SAB mit dem Normalkollektiv

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. mit SAB vs. Kontrollen), RR = relatives Risiko Pat. mit SAB, n.s. = nicht

signifikant, pc^* = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. ohne SAB vs. Kontrollen), RR^* = relatives Risiko Pat. ohne SAB, n.s. = nicht signifikant].

5.3.2 Vergleich der HLA-Allelfrequenzen zwischen den beiden Patientengruppen

Die Tabellen 16, 17 und 18 vergleichen die Allelfrequenzen der Patienten mit und ohne SAB. Es sind Unterschiede in der Häufigkeit der Allelfrequenzen zwischen den beiden IA-Patientengruppen festgestellt worden. Statistisch signifikant ist das niedrige Vorkommen des HLA-B62-Allels bei Patienten mit SAB verglichen mit Patienten ohne SAB ($pc = 0.003$, $RR = 0.14$).

HLA-	SAB (N = 143)		ohne SAB (N = 51)		Pc	RR
	N	Af	N	Af		
A*						
1	40	11.2	14	3.9	n.s.	-
2	73	22.0	22	6.6	n.s.	-
3	43	12.1	20	5.7	n.s.	-
11	11	2.9	4	1.0	n.s.	-
23	8	2.1	3	0.8	n.s.	-
24	27	7.3	5	1.3	n.s.	-
25	8	2.1	2	0.5	n.s.	-
26	7	1.8	2	0.5	n.s.	-
29	9	2.4	4	1.0	n.s.	-
30	6	1.6	0	0.0	n.s.	-
31	3	0.8	5	1.3	n.s.	-
32	9	2.4	4	1.0	n.s.	-
33	3	0.8	0	0.0	n.s.	-
34	2	0.5	0	0.0	n.s.	-
36	1	0.5	1	0.0	n.s.	-
66	1	0.3	1	0.3	n.s.	-
68	14	3.7	3	0.8	n.s.	-

Tabelle 16: Vergleich der HLA-A-Allele von Patienten mit und ohne SAB

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. mit SAB vs. Pat. ohne SAB), RR = relatives Risiko, n.s. = nicht signifikant].

HLA-	SAB (N = 143)		ohne SAB (N = 51)		Pc	RR
	N	Af	N	Af		
B*						
7	41	11.4	12	3.3	n.s.	-
8	16	4.3	12	3.2	n.s.	-
13	11	2.9	3	0.8	n.s.	-
18	11	2.9	2	0.8	n.s.	-
27	14	3.7	5	1.3	n.s.	-
35	25	6.8	12	3.2	n.s.	-
37	3	0.8	2	0.5	n.s.	-
38	4	1.0	1	0.3	n.s.	-
39	8	1.8	2	0.8	n.s.	-
41	3	0.8	1	0.3	n.s.	-
44	38	10.7	18	5.0	n.s.	-
45	2	0.5	0	0.0	n.s.	-
47	1	0.3	0	0.0	n.s.	-
48	1	0.3	0	0.0	n.s.	-
49	1	0.3	0	0.0	n.s.	-
50	5	1.3	0	0.0	n.s.	-
51	14	3.7	6	1.6	n.s.	-
52	4	1.0	0	0.0	n.s.	-
53	0	0.0	2	0.5	n.s.	-
54	0	0.0	0	0.0	n.s.	-
55	0	0.0	1	0.3	n.s.	-
56	2	0.5	0	0.0	n.s.	-
57	12	3.2	2	0.5	n.s.	-
58	3	0.8	0	0.0	n.s.	-
59	0	0.0	0	0.0	n.s.	-
60	19	5.0	4	1.1	n.s.	-
61	5	1.3	1	0.3	n.s.	-
62	8	2.2	21	5.6	0.003	0.14(0.08)
64	0	0.0	0	0.0	n.s.	-
65	3	0.8	1	0.3	n.s.	-
71	0	0.0	0	0.0	n.s.	-
72	0	0.0	0	0.0	n.s.	-
81	1	0.3	0	0.0	n.s.	-

Tabelle 17: Vergleich HLA-B von IA-Patienten mit und ohne SAB

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. mit SAB vs. Pat. ohne SAB), RR = relatives Risiko, n.s. = nicht signifikant].

HLA-	SAB (N = 143)		ohne SAB (N = 51)		Pc	RR
	N	Af	N	Af		
Cw*						
01	7	1.8	3	0.8	n.s.	-
02	18	4.8	5	1.3	n.s.	-
03	35	9.6	10	2.8	n.s.	-
04	34	9.3	16	4.5	n.s.	-
05	21	5.5	10	2.8	n.s.	-
06	37	10.2	8	2.2	n.s.	-
07	77	23.4	23	7.0	n.s.	-
08	3	0.8	2	0.5	n.s.	-
12	17	4.5	4	1.2	n.s.	-
14	5	1.3	0	0.0	n.s.	-
15	3	0.8	4	1.2	n.s.	-
16	8	2.2	9	2.4	n.s.	-
17	6	1.5	1	0.3	n.s.	-
DRB1*						
01	38	10.5	13	3.6	n.s.	-
03	26	7.0	6	1.6	n.s.	-
04	28	7.9	15	3.9	n.s.	-
07	41	11.5	18	5.1	n.s.	-
08	5	1.3	5	1.3	n.s.	-
09	0	0.0	0	0.0	n.s.	-
10	2	0.5	2	0.5	n.s.	-
11	33	9.0	9	2.2	n.s.	-
12	10	2.6	5	1.3	n.s.	-
13	42	11.6	7	1.9	n.s.	-
14	5	1.3	1	0.3	n.s.	-
15	48	13.6	15	4.2	n.s.	-
16	5	1.3	3	0.8	n.s.	-
DQB1*						
02	53	15.2	18	5.2	n.s.	-
0301	54	15.5	18	5.2	n.s.	-
0302	22	5.9	8	2.2	n.s.	-
0303	11	2.9	4	1.0	n.s.	-
0402	4	1.0	5	1.3	n.s.	-
0501	32	8.8	15	4.2	n.s.	-
0502	6	1.5	3	0.8	n.s.	-
0503	5	1.3	0	0.0	n.s.	-
0601	3	0.8	1	0.3	n.s.	-
0602	45	12.8	10	2.6	n.s.	-
0603	11	2.9	3	0.8	n.s.	-
0604	12	3.2	4	1.0	n.s.	-

Tabelle 18: HLA-C-, -DR- und -DQ-Allele von IA-Patienten mit und ohne SAB

[N = Anzahl des bekannten Allels, Af = Allelfrequenz, pc = Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (Pat. mit SAB vs. Pat. ohne SAB), RR = relatives Risiko, n.s. = nicht signifikant].

Da Risikofaktoren wie Diabetes mellitus mit bestimmten HLA-Antigenen assoziiert sind und sich die Patientengruppen mit und ohne SAB hinsichtlich anderer Grunderkrankungen (s. 5.1.2) unterscheiden, sind alle statistischen Analysen zusätzlich unter Ausschluss von Patienten mit Diabetes mellitus und anderen Grunderkrankungen wiederholt worden. Die Analyse zeigen vergleichbare Ergebnisse.

5.4 HLA-Allelfrequenzen und Verlauf der IA

Für den Verlauf einer aneurysmatischen Erkrankung sind neben der Therapie, der peri- und postoperativen Betreuung und dem klinischen Zustand des Patienten, Größe und Lokalisation der Aneurysmen wichtig.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den HLA-Allelfrequenzen der Patienten dieses Kollektivs und der Größe und der Lokalisation des Aneurysmas festgestellt werden. Dennoch besteht eine signifikante Korrelation zwischen den HLA-Allelfrequenzen der Patienten und dem klinischen Zustand und Verlauf der Erkrankung. Die Daten in der vorliegenden Arbeit zeigen ein erhöhtes bzw. erniedrigtes Vorkommen bestimmter Allelfrequenzen bei SAB- und nicht-SAB-Patienten (s. 5.3.2).

Nachfolgend sind die wichtigsten Werte der Analyse von der Patientengruppe und Kontrollpopulation, die eine statistische Signifikanz aufweisen, zusammengefasst.

HLA-	pc ^o	RR ^o	pc	RR	pc*	RR*	pc-W	rR
B*62	n.s.	n.s	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.003	0.14
Cw*06	0.06	1.92	0.021	2.14	n.s.	n.s.	n.s	n.s.
Cw*16	0.013	7.62	n.s.	n.s.	0.0013	15.35	n.s.	n.s
DR*07	0.02	1.83	n.s.	n.s.	0.05	2.12	n.s.	n.s.
DQB1*0603	0.014	0.39	n.s.	n.s.	n.s.	n.s	n.s	n.s.

Tabelle 19: Wichtigste Ergebnisse des HLA-Allele-Vergleichs

[pc° und RR° = IA-Patientenpopulation vs. Kontrollgruppe, pc und RR = Patienten mit SAB vs. Kontrollgruppe, pc^* und RR^* = IA-Patienten ohne SAB vs. Kontrollgruppe, $pc-W$ und rR = IA-Patienten mit SAB vs. Patienten ohne SAB, n.s.= nicht signifikant]

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse signifikante Abweichungen ihrer HLA-Allelfrequenzen: HLA-B62, Cw*06, Cw*16, DRB1*07 und DQB1*0603.

Ein erhöhtes Vorkommen der HLA-Allele DQB1-0603, Cw*06, Cw*16 und HLA-DRB1*07 zeichnet die IA-Patienten aus. Das HLA-B62 und HLA-Cw*16 kommt vermehrt bei IA-Patienten ohne SAB vor.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von HLA-Antigenen auf die Pathogenese eines intrakraniellen Aneurysmas unter Berücksichtigung subarachnoidaler Blutungen.

Im Vergleich zu früheren Untersuchungen auf diesem Gebiet (Ostergaard J.R. et al., 1987; Schievink W.I. et al., 1988; Lye R. et al., 1989; Ryba M et al., 1992 und Sakaguchi J. et al., 1994) hat diese Arbeit folgende Besonderheiten:

Die HLA-Bestimmung der Patienten und des Normalkollektivs erfolgt mit Hilfe der PCR-SSP-Methode, einer auf molekulargenetischer Ebene durchgeführten HLA-Typisierung. Die früheren HLA-Testungen wurden mit Hilfe serologischer Techniken durchgeführt. Die serologische Typisierung ist mit höherer Fehlerrate behaftet (Cruse J., Lewis R., Wang J., 2004). Die Vorteile einer molekulargenetischen Testung gegenüber der serologischen Typisierung liegen darin, dass für die Untersuchung keine lebenden (vitalen) Zellen benötigt werden und mögliche Fehlinterpretationen durch Kreuzaktivitäten der Alloantiseren und monoklonalen Antikörper nicht bestehen. Die Fehlerquoten spiegeln sich in den jeweiligen Arbeiten wieder und beeinflussen das Endergebnis der Arbeiten. Daher ist eine Methode mit niedrigeren Fehlerquoten aussagekräftiger und besser geeignet, da sie zuverlässigere Ergebnisse bei der HLA-Typisierung liefert. Die Typisierung durch PCR-SSP hat sich als wesentlich genauer und zuverlässiger erwiesen. Die einzelnen Proben lassen sich zudem einfacher lagern, transportieren und können mehrfach getestet werden (Cruse J., Lewis R., Wang J., 2004). Molekularbiologisches Arbeiten hat außerdem den Vorteil, dass es eine Typisierung mit kleinen Mengen an Material erlaubt.

Die vorliegende Arbeit umfasst eine große Zahl von Patienten, die nicht vorselektiert sind. In einem Zeitraum von 1997 bis 2003 wurden 194 IA-Patienten am Universitätsklinikum in Essen vorgestellt und in diese Studie eingeschlossen. Die Patienten lassen sich unterteilen in 51 Patienten mit IA ohne SAB und 143 Patienten mit IA mit SAB. Andere Arbeiten auf diesem Gebiet hatten entweder niedrige Patientenzahlen oder die Patienten wurden vorselektiert. Dies schwächt die Aussagekraft einer Untersuchung (Ostergaard J.R. et al., 1987; Schievink W.I. et al., 1988; Lye R. et al., 1989; Sakaguchi J. et al., 1994 und Ryba M. et al., 1992).

Die Ergebnisse von Schievink et al., Lye et al., Sakaguchi et al. und Ryba et al. basieren auf Patientenkollektiven mit jeweils weniger als 60 Patienten. Hinzu kommt die Tatsache, dass die Patienten dieser Kollektive erst nach gesicherter SAB eingebunden wurden und damit vorselektiert waren.

Die Patientengruppe von Schievink W.I. et al. und Sakaguchi J. et al. ausgenommen, bestehen sowohl unsere Patientengruppe als auch die Gruppen von Ostergaard J.R. et al., Lye R. et al. und Ryba M. et al. aus kaukasischem Patientengut.

Diese Arbeit untersucht als erste den HLA-C-Polymorphismus in Hinblick auf Vorkommen und Ruptur eines Aneurysmas. Bislang mangelte es an Möglichkeiten, diese Allele zu erfassen. Die Schwierigkeit, diese Merkmale serologisch vollständig zu erfassen, lag an fehlenden serologischen Antikörpern, die für die serologische Untersuchung essentiell sind, sowie an der niedrigen Expression der HLA-C-Merkmale an den Zelloberflächen. Durch molekulargenetische Methoden ist heute die Untersuchung des HLA-C-Polymorphismus zweifelsfrei möglich. Dabei können serologisch nicht zu bestimmende HLA-C-Allele, die sogenannten „Blank“-Allele, eindeutig definiert werden. Zu diesen ehemaligen „Blank“-Allelen gehören die heutigen HLA-Cw*12- bis -Cw*18-Allele. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind deshalb präziser als die früherer Arbeiten (van der Vlies SA et al., 1998).

Frühere Arbeiten über HLA und IA ließen eine Assoziation zwischen HLA-Allelen und IA vermuten: Ostergaard J.R. et al. (1987) untersuchten 116 IA-Patienten mit Hilfe serologischer Techniken und stellten ein erhöhtes Auftreten der HLA-B7 und HLA-DR2 bei IA-Patienten fest. Ebenfalls mit Hilfe serologischer Methoden untersuchten Norrgard O. et al. (1987) 45 IA-Patienten nach einer möglichen Assoziation mit verschiedenen genetischen Markern, darunter das HLA-System (Klasse I und II), 7 Blutgruppensysteme (ABO, RH, MNS, P, Kell, Lewis und Duffy) und 7 Serumproteinsysteme (Hp, Tf, Gc, Pi, Bf, C3 und C4). Sie fanden eine signifikant erhöhte Frequenz von HLA-A28 und eine signifikant erniedrigte Frequenz von HLA-B40 in der IA-Population. Obwohl eine erhöhte Frequenz von HLA-B7 zu verzeichnen war, wurde keine statistische Signifikanz erzielt. Dies liegt an der Bonferroni-Korrektur, die die Anzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe berücksichtigt. Auch unsere molekulargenetischen Untersuchungen zeigen keine signifikante Erhöhung des HLA-B*7-Allels bei IA-Patienten.

Die Arbeit von Schievink W.I. et al. (1988) zeigte ebenfalls keine signifikante Erhöhung von HLA-DRB1*2 bei 7 der 31 untersuchten IA-Patienten. Mellergard P. et al. (1989) wiesen eine nicht signifikante Erhöhung der HLA-B*7, -DRB1*2 und HLA-Cw*2 auf. Die Vergleichbarkeit der Arbeit von Schievink et al. ist begrenzt, nicht zuletzt, weil die Erhöhung der HLA-Merkmale B*7, DRB1*2 und Cw*2 nicht signifikant war. Außerdem waren die Patienten in dem Kollektiv vorselektiert und die Patientenzahl gering.

Lye R.H. et al. (1989) und Sakaguchi J. et al. (1994) untersuchten 38 bzw. 31 Patienten mit rupturierten IA (SAB-Patienten). Während Lye R.H. et al. eine Erhöhung des HLA-B*7 und eine erniedrigte Frequenz von HLA-DRB1*3 beobachten konnten, verzeichneten Sakaguchi J. et al. eine signifikant erhöhte Frequenz von HLA-A*31 und -DRB1*7 und eine signifikant erniedrigte Frequenz von HLA-B*40 bei der SAB-Patientengruppe.

Ryba M. et al. (1992) stellten ein erhöhtes Vorkommen des HLA-Merkmals DRB1*07 bei 59 SAB-Patienten fest.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten ein höheres Vorkommen von den HLA-B*7 und -DRB1*07 und ein (nicht-signifikantes) niedrigeres Vorkommen von HLA-DRB1*3 und -B*40 im IA-Patientenkollektiv verzeichnet. Allerdings ist dem höheren Vorkommen von HLA-B*07 bei beiden Patientengruppen (mit SAB und ohne SAB) keine statistische Signifikanz zuzuschreiben. Das Vorkommen des HLA-B*40-Allels war in unserer Arbeit unauffällig. Die von der anderen Arbeitsgruppe serologisch untersuchten HLA-B*60 und -B*61 werden molekulargenetisch als HLA-B*40 dargestellt. Somit sind die Arbeiten vergleichbar. Im Gegensatz zu anderen Studien zeigten sich bei der vorliegenden Arbeit weniger Patienten mit dem HLA-Cw*02. Als wichtige Übereinstimmung mit anderen Studien auf diesem Gebiet ist die signifikant erhöhte Frequenz des HLA-DRB1*07-Merkmals sowohl bei IA-Patienten mit SAB als auch bei Patienten ohne SAB nachgewiesen worden.

Im Gegensatz zu früheren Arbeiten zeigt die vorliegende Arbeit zusätzlich folgende wichtige Ergebnisse: eine signifikant erhöhte Frequenz des HLA-Cw*06-Allels bei Patienten mit SAB, bei Patienten ohne SAB waren es die Merkmale HLA-Cw*16 und -DRB1*07, die signifikant erhöht sind. Ein Vergleich zwischen beiden Patientengruppen ergibt eine signifikante Erhöhung des HLA-Cw*06 bei den SAB-Patienten. Ein protektives Allel für die IA-Entstehung mag das DQB1*0603 sein, das bei IA-Patienten der

vorliegenden Arbeit weniger häufig vorkommt als bei einer Kontrollpopulation. So schließen wir auch nicht aus, dass die HLA-Cw*06-, -Cw*16- und HLA-DRB1*07-Allele einen begünstigenden Effekt für die IA-Entstehung haben können. Diese Allele kommen bei IA-Patienten signifikant häufiger vor als bei den Kontrollen. Das HLA-B*62-Allel und -Cw*06 kommen häufiger bei Patienten ohne SAB als bei Patienten mit SAB vor.

Relevant erscheint das niedrigere Vorkommen des HLA-B*62 bei Patienten mit SAB verglichen mit Patienten ohne SAB ($p = 0.003$, $RR = 0.14$). Dieses Allel zeigt als einziges Allel signifikante Unterschiede in seiner Häufigkeit bei IA-Patienten mit einer Blutung und IA-Patienten ohne eine Blutung. Es stellt sich die Frage, welche Rolle das HLA-B*62-Allel für die Aneurysmaentstehung spielt, und gleichzeitig, welchen Einfluss es auf die Aneurysmaruptur ausübt. Weitere Studien mit größerer Anzahl von IA-Patienten sind notwendig, um diese Frage zu klären. Dabei ist wichtig zu klären, welche diagnostische Funktion dieses Allel einnehmen könnte.

Die Unterschiede zwischen dieser Arbeit und früheren Arbeiten erklären die Abweichungen in den Ergebnissen. Diese Unterschiede umfassen die Vorselektion, die Benutzung einer älteren nicht-spezifischen Testungsmethode und niedrigere Patientenzahlen. Die Unterschiede werden umso kleiner, je moderner die Untersuchungsmethode ist und je größer die Patientenzahl ist.

Bei Erkrankungen mit mehreren nicht überschaubaren Risikofaktoren sind wahrscheinlich mehrere unterschiedliche Gene von Bedeutung. Der Einfluss einzelner Faktoren oder einzelner Gene fällt meistens klein aus und ist schwer zu erfassen. Andererseits sind die Einflüsse der verschiedenen Faktoren aufeinander schwer nachvollziehbar. Dies ist z.B. der Fall bei den HLA-Antigenen, die für die Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) dem Natürlichen Killer (NK)-Zellrezeptorensystem angehört (McCann F.E. et al., 2002; Moretta L. et al., 2002).

Molekulargenetische Familien-Analysen zeigen, dass prädisponierende Komponenten für die Entwicklung eines Aneurysmas von Genorten kodiert werden, die auf Chromosom 6, 4, 7, 14 und 19 lokalisiert sind. Von besonderem Interesse sind die Gen-Regionen auf Chromosom 6 und 19, da sie die Genorte des HLA- bzw. des NK-I Zellrezeptorensystems tragen. Beide Gensysteme sind extrem polymorph und polygen und stehen in einer Ligand-Rezeptor-Beziehung.

NK-Zellen sind großkörnige Lymphozyten mit der Fähigkeit, zytotoxisch zu wirken. Auf der Oberfläche von NK-Zellen befinden sich aktivierende und inhibierende Rezeptoren mit regulatorischer Funktion auf die NK-Zellen. Diese Rezeptoren erkennen HLA Klasse I-Moleküle (z.B. HLA-C). Die HLA-spezifischen Rezeptoren fungieren als hemmende (KIR) oder als stimulierende Rezeptoren (NK activating receptors, NKAR), wobei die Funktion der KIR dominant ist. Falls die zu erkennenden HLA-Allele wenig oder nicht vorhanden sind, werden keine hemmenden Signale gesendet und die Zellen werden von NK-Zellen getötet. Bestimmte KIR-Rezeptoren stehen mit den HLA-Cw*-Merkmalen der HLA Klasse I in enger Ligand-Rezeptor-Beziehung. Für die verschiedenen HLA Klasse I-Gene existieren spezifische KIR-Rezeptoren, die bestimmte Varianten erkennen. Z.B. erkennen zwei verschiedene inhibitorische KIR (KIR2DL1 und KIR2DL3) die beiden Varianten eines Polymorphismus des HLA-C; KIR2DL1 (= KIR1) ist mit Cw*2, 4, 5, 6, 12, 15 und Cw*17 assoziiert und KIR2DL2,3 (= KIR2) mit Cw*1, 3, 7, 8, 14 und 16 assoziiert (Janeway C. et al., 2002; Moretta L. et al., 2002).

Grundsätzlich wird die Schwelle der Lymphknotenaktivierung durch inhibitorische Rezeptoren erhöht. Natürliche Killerzellen exprimieren eine große Anzahl an hemmenden Rezeptoren, u.a. die KIR-Rezeptoren. Daher können HLA-Moleküle über die inhibitorischen Rezeptoren Einfluss auf die Lymphknotenaktivierung und damit auf Prozesse in den Organen bzw. Organsystemen ausüben (William A.P. et al., 2005).

Außerdem wird in neueren Studien vermutet, dass das HLA- und das NK-Rezeptorsystem gemeinsam eine Abstoßungsreaktion bei Stammzellentransplantation reguliert (Bignon J.D. und Gagne K., 2005). Die Rolle der NK-Zellrezeptoren und des HLA-Systems in der Entstehung von Diabetes mellitus wird zunehmend klar (Chen Y.G. et al., 2005). Diese Hinweise stützen die Vermutung einer HLA- und NK-Rezeptorenassoziation bei Patienten mit intrakraniellm Aneurysma. Eine Überprüfung dieser Assoziation könnte die Ätiopathogenese der Aneurysma-Entstehung und -Ruptur verständlicher machen.

Eine erhöhte Frequenz des HLA-Cw*16 und die niedrigere HLA-Cw*06-Frequenz können auf ein sogenanntes Kopplungsungleichgewicht mit anderen HLA-Merkmalen zurückzuführen sein. Das HLA-Cw*16 steht in enger Beziehung zum HLA-B44. Unsere erste Vermutung eines funktionellen Kopplungsungleichgewichts zwischen den beiden Allelen lässt sich nicht erhärten. Beide Allele sind häufiger bei IA-Patienten als in den Kontrollgruppen. Bei einem Kopplungsungleichgewicht dieser Allele wäre eine

gegensätzliche Häufigkeit zu erwarten. Trotzdem kann die Untersuchung der NK-Rezeptoren von IA-Patienten neue Aspekte der Assoziation ans Licht bringen. Wegen der nachgewiesenen Verbindung zwischen den HLA-C-Allelen und anderen immunologischen Systemen (z.B. dem Natürliche Killerrezeptor System, NK), können neue Forschungsgebiete erschlossen werden (McCann F.E. et al., 2002).

Arterielle Hypertonie gilt als wichtigster Faktor der IA-Entstehung und -Ruptur. Dennoch ist die Rolle der arteriellen Hypertonie bei einem Raucher, der auch regelmäßig Alkohol trinkt und arteriosklerotisch veränderte Gefäße vorweist, nicht klar zu definieren. Außerdem ist die kausale Beziehung zwischen Rauchen, übermäßigem Alkoholkonsum, arteriosklerotischer Veränderungen der Gefäße, arterieller Hypertonie und Aneurysma nicht einfach herzustellen. Rauchen, Alkoholkonsum und arteriosklerotische Gefäße führen zu einer Gefäßschwäche, aber auch zu Hypertonie. Arterielle Hypertonie allein führt auch zur Gefäßschwäche. Die Tatsache, dass 61 der untersuchten Patienten an mindestens drei Erkrankungen litten, macht deutlich, wie schwierig es ist, die einzelnen Risikofaktoren möglichst unabhängig voneinander zu bewerten.

Weil eine signifikante Anzahl von Patienten beider IA-Patientengruppen an zusätzlichen Erkrankungen wie Niereninsuffizienz, Nephrolithiasis, Hypothyreose, Hyperthyreose, chronisch-obstruktiver Lungenkrankheit und Venen-Thrombose litten, wurde eine Assoziationsanalyse unter Ausschluss von Patienten mit diesen zusätzlichen Erkrankungen durchgeführt. Nach deren Ausschluss ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Erkrankungen zumindest in der Anzahl und im Zusammenhang ihres Auftretens nicht HLA-assoziiert sind.

Ähnlich fällt die Analyse der IA-Patienten mit und ohne Berücksichtigung der Patienten mit Diabetes mellitus in beiden Patientenpopulationen aus. Das Auftreten von Typ II-Diabetes mellitus wird mit HLA-DR3 und -DR4 assoziiert (Fugger L. et al., 2000). Diese Allele haben bisher keine Assoziation mit Aneurysmen gezeigt. Deshalb ist es nachvollziehbar, dass es in der hier untersuchten Patientenpopulation zu keinen nennenswerten Unterschieden der Ergebnisse kam. Eine Erklärung des gehäuftem Auftretens von IA bei Typ II-Diabetes mellitus-Patienten liegt wahrscheinlich nicht an HLA-Assoziationen. Andere Faktoren, wie die veränderte Gefäßwand und die veränderten Fließeigenschaften in diesen Gefäßen, könnten die Aneurysma-Neigung besser erklären.

Weil einzelne Gene oder jeder Faktor zur Entstehung und Ruptur von Aneurysmen beiträgt, sind große Kollektive von Aneurysmapatienten mit gleichen Merkmalen nötig, um eine standfeste Aussage zu treffen. Als genetische Marker kommen folgende Gene in Betracht, die neben oder in Kombination mit dem HLA eine große Aussagekraft hätten:

Das auf Chromosom 2q31 lokalisierte Kollagen Typ-III-Gen und das Kollagen Typ-I-Gen (auf Chromosom 7q22) gehören zu den fibrillären Kollagenen und sind wegen ihrer Rolle beim Aufbau arterieller Gefäßwände von Bedeutung (Ostergaard et al., 1989). Durch spezifische Wechselwirkungen tragen Kollagene zur Elastizität und Festigkeit der Gefäßwand bei. Der Aufbau einer Gefäßwand wird auch von anderen Faktoren beeinflusst, darunter der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF), der in-vitro zu einer Proliferation von Endothelzellen führt und die Apoptose mikrovaskulärer Gefäßzellen verhindert. 1996 fanden Carmeliet et al. heraus, dass es beim Fehlen eines einzigen VEGF-Allels zur Bildung abnormaler Gefäße kommt. Es gibt eine Korrelation zwischen dem VEGF-Spiegel im Urin mit dem Ausmaß der Proteinurie bei Patienten mit folgenden Gefäßerkrankungen: IgA-Nephropathie, Minimal Change Nephropathie und Präeklampsie (Matsumoto K. und Kanmatsuse K., 2001). Neuere Studien vermuten eine Assoziation zwischen dem auf Chromosom 6p12 lokalisierten VEGF und der Größe eines Aneurysmas (Sandalcioğlu I.E. et al., 2006). Somit ist ein Kopplungsungleichgewicht mit dem IA-assoziierten HLA-System nicht auszuschließen. Sowohl Kollagen als auch VEGF beeinflussen das Wachstum und die Widerstandsfähigkeit der Gefäße. Die Hälfte der IA-Patienten in einer Studie litten an einem Defekt des Kollagen Typ III (Ostergaard et al., 1989). Die oben beschriebenen Gendefekte wurden bei den IA-Patienten der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Eine HLA-Untersuchung von Patienten mit Gendefekten könnte Aufschluss geben über die Rolle dieser Schwäche in der Entstehung und Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas.

Andere Bestandteile der Gefäßwand wie Fibrin, Elastin und Kollagen IV scheinen eine chromosomale Assoziation zu haben. Das Vorkommen hoher bzw. niedriger Plasmakonzentration von Fibrillin, Elastin, Endothelin, Polycystin, Kollagen IV und Protease Inhibitor bei SAB-Patienten ist ein bekanntes Phänomen (Zhang B. et al., 2003). Ähnliche Untersuchungen größerer IA-Patientengruppen könnten zu einem besseren Verständnis dieser Krankheit führen. Zusätzlich könnten auch die sogenannten „Candidate genes“ wie Endoglin, Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE), interzelluläres

Adhäsions Molekül-1 (ICAM-1) und Phospholipase C im Zusammenhang mit Aneurysmen und HLA untersucht und analysiert werden. Diese „Candidate genes“ regulieren den Aufbau extrazellulärer Matrix, die Zellwanderung und die Zelladhäsion. Sie werden verstärkt exprimiert bei IA-Patienten (Zhang B. et al., 2003). Hiermit wird erhofft, dass zusätzlich oder in Verbindung zu HLA eine Markerkombination festgestellt wird, die die Ätiopathogenese von IA verständlicher macht und die Diagnose der IA erleichtert.

In der vorliegenden Arbeit konnten die grundsätzlichen, allgemein bekannten Befunde bestätigt werden, dass IA erst nach der zweiten Lebensdekade vermehrt auftreten und dass Frauen doppelt so häufig von einer SAB betroffen sind wie Männer. Warum überwiegend Frauen an IA leiden, ist immer noch ungeklärt. Fest steht, dass Frauen an Autoimmunerkrankungen (wie die Kollagenosen) bis zu neunmal häufiger erkranken als Männer (Hahn J.M., 2003). Diese Erkrankungen betreffen besonders die Gefäßbindegewebe. Es stellt sich die Frage, ob die spezielle Hormonsituation der Frau eine Rolle für die Entstehung von IA spielt. Interessanterweise zeigte eine Studie einen Zusammenhang zwischen der regelmäßigen Einnahme oraler Kontrazeptiva und einer höheren Aneurysma- und Blutungsrate (Johnston S.C. et al., 1998). Obwohl kein Patient unseres Kollektivs an Kollagenosen litt, weisen gängige Lehrmeinungen auf einen Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und der ungleichen Verteilung zugunsten des weiblichen Geschlechts hin (Hahn J.M., 2005; Herold G., 2005; Raabe A. et al., 2005). Die Erklärung dieser Assoziation von IA und dem Geschlecht könnte auf chromosomaler Ebene liegen. Da Männer mit dem XY-Chromosom und Frauen mit dem XX-Chromosom ausgestattet sind, wird eine genaue Untersuchung in dieser Hinsicht empfohlen.

Mit dem Alter steigt das Risiko ein IA zu beherbergen, auch die Größe der gefundenen Aneurysmen steigt mit dem Alter, jedoch das Risiko an einer SAB zu erkranken steigt nicht (Heiskanen O. und Vikki J., 1981; Wiebers D.O. et al., 1987). Während der ersten beiden Lebensdekaden sind mehr männliche Individuen von IA betroffen als weibliche. Dieses Ungleichgewicht ändert sich jedoch ab der dritten Lebensdekade (Heiskanen O. und Vikki J., 1981; Wiebers D.O. et al., 1987). Hier beträgt das Verhältnis von weiblich zu männlich 60 zu 40, wobei Studien von Juvela S. et al. (1993) und Ingall T.J. et al. (2000) eine erhöhte Rupturrate bei Frauen zwischen dem 20. und 70. Lebensjahr aufzeigten (Wardlaw J.M. und White P.M., 2000).

Ingall et al. (2000) dokumentierten einen Altersgipfel von 50 Jahren, der vergleichbar ist mit dem errechneten Altersgipfel dieser Arbeit von rund 51 Jahren für die IA-Patienten. Außerdem stellten sie, wie bei dem Patientenkollektiv dieser Arbeit, eine höhere Inzidenz von Aneurysmen bei Frauen fest.

Sowohl die Verteilung der Aneurysmen an den Haupthirnarterien als auch die beschriebenen Risikofaktoren der IA mit nicht-signifikanten Abweichungen stehen im Einklang mit den gängigen Lehrmeinungen: Während Kunze eine Verteilung der Hirnaneurysmen zu jeweils 35 % an A. cerebri anterior und an A. carotis interna und 22 % an A. cerebri media beschreibt, berichten Fox und Drake über eine Häufigkeit von 39 %, 30 % und 22 % der IA an ACA, ACI bzw. MCA (Kunze K., 1999; II Drake C.G., 1981; III Steinmetz H. und Raabe A., 2004). Die Aneurysmen der Patienten dieser Arbeiten verteilten sich an den Arterien zu jeweils einem Drittel an A. cerebri anterior und A. carotis interna, ein Fünftel an A. cerebri media und ein Zehntel an vertebrobasilärer Kreislauf.

Zusammengefasst ist die genaue Ätiopathogenese der IA nicht sicher geklärt. Frühere Arbeiten geben Grund zur Annahme, dass sowohl erworbene als auch genetische Faktoren für die Entstehung von IA wichtig sind. Der komplexe genetische Hintergrund eines IA-Vererbungsmusters ist durch die bisher nicht überschaubaren Wechselwirkungen verschiedener genetischer und erworbener Faktoren bedingt. Die Rolle einzelner Faktoren ist unterschiedlich und manchmal nur in Kombination mit anderen Faktoren relevant (Animesh A.S. et al., 1990; Kissela B.M. et al., 2002; Ruigrok W.M. et al., 2005). Demnach sind die Kombinationen von genetischen und erworbenen Faktoren, die zu IA oder SAB führen von Wichtigkeit und nicht nur ein einziger Faktor oder mehrere einzelnen Faktoren.

Das gehäufte Auftreten von IA in einigen Familien und die Assoziation von IA mit angeborenen vaskulären Erkrankungen, wie dem Marfan Syndrom, dem Ehlers Danlos Syndrom und dem α -1-Antitrypsinmangel, stützen die These der genetischen Disposition (Schievink W.I., 1997). Es besteht ein bis zu siebenfach erhöhtes Risiko bei erstgradigen Verwandtschaften von Patienten mit IA, eine IA-bedingte SAB zu entwickeln. Darüber hinaus haben ca. 10 % der SAB Patienten einen Verwandten mit symptomatischem oder asymptomatischem IA (Ronkainen A. et al., 1997; Wills S. et al., 2003; Ruigrok W.M. et al., 2005). Ein Zusammenhang zwischen vaskulärer Erkrankung und HLA-Phänotyp ist

aus Untersuchungen an Patienten mit Bauchortenaneurysmen bekannt (Rasmussen T.E. et al., 2001).

Es bedarf außer invasiven und nicht-invasiven radiologischen Untersuchungen einer effektiven Methode, die Verwandten eines Patienten mit sporadisch aufgetretener SAB auf IA zu untersuchen. Wiederholte „Screenings“ können notwendig sein, um neu gebildete IA nachzuweisen. Die Screeningmöglichkeiten, die zurzeit zur Verfügung stehen, CT-Angio, DAS oder Kernspinaangiographie, sind entweder invasiv, teuer oder gehen mit einer Strahlenbelastung der Patienten einher. Im Gegensatz bedarf die HLA-Testung lediglich einer Blutentnahme und kann schon jetzt routinemäßig eingesetzt werden. Weiterhin könnte ein „Screening“ mit Biomarkern oder Marker-Kombinationen nützlich sein für Verwandte eines Patienten mit aneurysmatischer SAB. Zu den Biomarkern könnten das HLA, der VEGF, die „Candidate genes“, die Kollagene und die NK-Zellrezeptoren zählen. Genotypische Untersuchungen der Verwandten können dazu beitragen, dass die betroffenen Verwandten identifiziert werden, bevor es zu einer Blutung aus einem bis dahin unbekanntem Aneurysma kommt (Wardlaw J.M., White P.M., 2000; Rasmussen T.E. et al., 2001; Cruse J. et al., 2004; Ruigrok W.M. et al., 2005).

Die meisten Bindegewebs- und vaskulären Erkrankungen haben eine genetische Komponente, deshalb werden Untersuchungen der genetischen Merkmale, darunter Untersuchungen der HLA-Merkmale, an den betroffenen Patienten durchgeführt. Solche Untersuchungen erweisen sich als hilfreich in der Diagnostik und beim „Screening“ dieser Patienten (Adamson J. et al., 1994; Svejgaard A. et al., 1982; Linn F.H. et al., 1996). Aus diesem Grund kann die Untersuchung nach einer HLA-Assoziation bei IA-Patienten erfolgversprechend sein für das „Screening“ und die frühzeitige Einleitung von weiteren diagnostischen Schritten zur Klärung. Um die Aussagekraft des Screenings mittels HLA-Typisierung zu stärken, können zusätzliche Testungen anderer Genorte, wie der NK-, Fibrillin-, Endothelin- und Kollagen III-Gene, hilfreich sein.

7 Zusammenfassung

Subarachnoidale Blutungen (SAB) aufgrund eines intrakraniellen Aneurysmas (IA) sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität behaftet. Bei einigen Patienten wird IA jedoch als Zufallsbefund festgestellt. Bei diesen Patienten stellt sich die Frage nach der geeigneten Behandlung, um eine drohende Blutung abzuwenden. Hierbei müssen Blutungsrisiko gegen operatives Risiko abgewogen werden. Daher ist aus klinischer Sicht von größter Bedeutung, einen Marker oder eine Marker-Kombination zu etablieren, durch die Patienten mit hohem Risiko für eine SAB identifiziert werden können. Das gehäufte familiäre Auftreten von IA sowie die Assoziation von IA mit Erkrankungen, die genetisch mitbedingt werden, deuten auf genetische Komponenten in der Ätiopathogenese von IA hin. Diese Komponenten werden von Genorten kodiert, die u.a. auf Chromosom 6p lokalisiert sind. Diese Chromosomen tragen die Genorte des HLA-Systems. Aus Untersuchungen von Patienten mit Bauchortenaneurysmen ist bereits eine Assoziation zu HLA-Allelen bekannt. Weiterhin vermuten mehrere Studien eine Beziehung zwischen HLA und IA.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mit Hilfe der molekulargenetischen Methode 194 nicht vorselektierte IA-Patienten untersucht. Die Allelfrequenzen der IA-Patienten wurden mit den Allelfrequenzen von 174 Kontrollen verglichen. Signifikant erniedrigte Frequenzen des HLA-DQB1*0603 lagen bei IA-Patienten vor. Bei Patienten mit nicht rupturierten IA waren die Allele HLA-B62, -Cw*16 und -DRB1*07 signifikant erhöht. Das HLA-Cw*06 war signifikant erhöht in der SAB-Patientengruppe.

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse lassen sich folgende Aufgabenstellungen dieser Doktorarbeit klären: Es ist noch wahrscheinlicher, dass HLA mit IA assoziiert ist; dass bestimmte erworbene Risikofaktoren mit IA assoziiert sind; dass sich die Verteilung von HLA-Merkmalen bei IA-Patienten mit und ohne SAB unterscheidet.

Diese Arbeit lässt die Etablierung einer Marker-Kombination, die den Einfluss von HLA, VEGF, Kollagenen, „Candidate genes“ und NK-Zellrezeptoren u.a. auf IA berücksichtigt, noch wahrscheinlicher erscheinen. Deshalb empfiehlt es sich, Analysen dieser Faktoren bei einer größeren IA-Patientengruppe durchzuführen.

8 Literaturverzeichnis

- 1) Adamson J., Humphries S.E., Ostergaard J.R., Voldby B., Richards P., Powell J.T. (1994): Are cerebral aneurysms atherosclerotic?. *Stroke*. 25, 963-966.
- 2) Albert E. (1997): Immungenetik. In: Gemsa D., Kalden J.R., Resch K. (Hrsg.): *Immunologie: Grundlage - Klinik - Praxis*. 4. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme
- 3) Animesh A.S., Lopez M.T., Mc Devitt H.O. (1990): Autoimmune Diseases: The failure of self tolerance. *Science*. 248, 1380-1387.
- 4) Bignon J.D., Gagne K. (2005): KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol*. 17(5), 553-599.
- 5) Broderick J.P., Brott T., Duldner J.E., Tomsick T., Leach A. (1994): Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 25, 1342-1347.
- 6) Campell R.D., Trowsdale J. (1993): Map of the human MHC. *Immunol Today*. 14, 349-352.
- 7) Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declerq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A. (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573), 435-439.
- 8) Chen Y.G., Choisy-Rossi C.M., Holl T.M., Chapman H.D., Besra G.S., Wilson S.B., Serreze D.V. (2005): Activated NKT cells inhibit autoimmune diabetes through tolerogenic recruitment of dendritic cells to pancreatic lymphnodes. *J Immunol*. 174(3), 1196-1204.
- 9) Cruse J., Lewis R., Wang J. (2004): *Immunology Guidebook*. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford (usw.): Elsevier Academic press.
- 10) Denzin L.K., Cresswell P. (1995): HLA-DM induces CLIP dissociation from HMC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell*. 82,155-165.
- 11) Ellegalla D.B., Day A.L. (2005): Ruptured cerebral aneurysms. *NEJM*. 352; 2, 121-124.
- 12) Ferencik S., Grosse-Wilde H. (1997): Caucasian German normal. In: Terasaki P.I., Gjertson D.W. (Eds): *HLA 1997*. S. 222-223.

- 13) Fisher C.M., Kistler J.P., Davis J.M. (1980): Relationship of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualised by computer tomography scanning. *Neurosurgery*. 6,1-9.
- 14) Flomenberg N., Baxter-Lowe L.A., Confer D., Fernandez-Vina M., Filipovich A., Horowitz M., Hurley C., Kollmann C., Anasetti C., Noreen H., Begovich A., Hildebrand W., Petersdorf E., Schmeckpeper B., Setterholm M., Trachtenberg E., Williams T., Yumis E., Weisdorf D. (2004): Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*. 104, 1923-1930.
- 15) Fugger L., Tisch R., Libau R., van Endert P., Mcdevitt O.H. (2000): The Role of Human Major Histocompatibility Complex (HLA) Genes in Disease. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. (Eds.): *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease*. 8. Edition, Vol. I. McGraw-Hill companies.
- 16) Garcia K.C., Degano M., Pease L.R., Huang M., Peterson P.A., Teyton I., Wilson I.A. (1998): Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide MHC antigens. *Science*. 279, 1166-1172.
- 17) Hahn J.M. (2003): *Checkliste Innere Medizin*. 4. Auflage. Stuttgart und New York. Thieme Verlag.
- 18) Heemels M.T., Ploegh H. (1995): Generation, translocation and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem*. 64, 463-491.
- 19) Heiskanen O., Vikki J. (1981): Intracranial aneurysms in children and adolescents. *Acta Neurochir*. 59, 55-63.
- 20) Herold G. (2005): *Innere Medizin*. Köln. Vertrieb durch Autor.
- 21) Hunt W.E., Hess R.M. (1968): Surgical risk as related to time intervention in the repair of intracranial aneurysms. *J Neurosurg*. 28, 14-20.
- 22) Ingall T.J., Asplund K., Mahonen M., Bonita R. (2000): A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. *Stroke*. 31, 1054-1061.
- 23) International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. (2003): natural history, clinical outcome, and risk of surgical and endovascular treatment. *Lancet*. 362, 103-110.
- 24) Janeway C., Travers P., Walport M., Schlomchik M. (2002): *Immunologie*. Heidelberg, Berlin. Spektrum Akademischer Verlag.

- 25) Johnston S.C., Selvin S., Gress D.R. (1998): The burdens, trends and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 50, 1413-1418.
- 26) Johnston S.C., Wilson B.C., Halbach V.V., Higashida R.T., Dowd C.F., McDermott M.W., Applebury C.B., Farley T.L., Gress D.R. (2000): Endovascular and surgical treatment of unruptured cerebral aneurysms: comparison of risks. *Ann Neurol*. 48, 11-19.
- 27) Junjua N., Mayer S.A. (2002): Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Lancet*. 2, 359(9309): 863-873.
- 28) Juvela S., Porras M., Poussa K. (2000): Natural history of unruptured intracranial aneurysms: probability of and risk factors for aneurysm rupture. *J Neurosurg*. 93, 379-387.
- 29) Juvela S., Hillbom M., Numminen H., Koskinen P. (1993): Cigarette smoking and alcohol consumption as risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 24, 639-646.
- 30) Kappes D., Strominger J. (1988): Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Ann Rev Biochem*. 57, 991-1028.
- 31) Kissela B.M., Sauerbeck L., Woo D., Khoury J., Carrozzella J., Pancioli A., Jauch E., Moomaw C.J., Shukla R., Gebel J., Fontaine R., Broderick J. (2002): Subarachnoid hemorrhage : a preventable disease with heritable component. *Stroke*. 33(9), 2152-2153.
- 32) Klein J., Sato A. (2000): The HLA System. *NEJM*. 343, 702-709.
- 33) Kunze K. (1992): *Lehrbuch der Neurologie*. Stuttgart, New York. Thieme.
- 34) Le Bouteiller P. (1994): HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol*. 14, 89-129.
- 35) Linn F.H., Rinkel G.J., Algra A., van Gijn J. (1996): Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis. *Stroke*. 27, 625-629.
- 36) Lye R.H., Dyer P.A., Sheldon S., Antoun N. (1989): Are HLA antigens implicated in the pathogenesis of non-haemorrhagic deterioration following subarachnoid haemorrhage?. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 52(10), 1197-1199.
- 37) Male D. (2001): T-cell receptors and major histocompatibility complex molecule. In: Roitt I., Brostoff J., Male D. (Eds.): *Immunology*. Edinburgh, London, New York, Philadelphia. u.s.w. Mosby.

- 38) Matsumoto K., Kanmatsuse K. (2001): Elevated vascular endothelial growth factor levels in the urine of patients with minimal change nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 55, 269-274.
- 39) McCann F.E., Suhling K., Carlin L.M., Eleme K., Taner S.B., Yanagi K., Vanherberghen B., French P.M., Davis D.M. (2002): Imaging immune surveillance by T cells and NK cells. *Immunological Reviews*. 189, 179-192.
- 40) Mellergard P., Ljunggren B., Brandt L., Johnson U., Holtas S. (1989): HLA-typing in a family with six intracranial aneurysms. *Br J Neurosurg*. 3(4), 479-485.
- 41) Milner C.M., Campbell R.D. (1992): Genes, genes and more genes in the human major histocompatibility complex. *Bioessays*. 14, 565-567.
- 42) Moretta L., Bottino, Daniela P., Mingari M.C., Biassoni R., Moretta A. (2002): Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* 32, 1205-1211.
- 43) Nakagawa T., Hashi K., Kurokawa Y., Yamamura A. (1999): Family history of subarachnoid hemorrhage and the incidence of asymptomatic, unruptured cerebral aneurysms. *J Neurosurg*. 91, 391-395.
- 44) Neefjes J.J., Schumacher T.N., Ploegh H.L. (1991): Assembly and intracellular transport of major histocompatibility complex molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 3, 601-609.
- 45) Neefjes J.J., Stollorz V., Peters P.J., Geuze H.J., Ploegh H.L. (1990): The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell*. 61, 171-183.
- 46) Neil-Dwyer G., Bartlett J.R., Nicholls A.C., Narcisi P., Pope F.M. (1987): Collagen deficiency and ruptured cerebral aneurysms. A clinical and biochemical study. *J Neurosurg*. 59, 16-20.
- 47) Norrgaard O., Beckman G., Beckman L., Cedergren B., Fodstad H., Anquist K.A. (1987): Genetic markers in patients with intracranial aneurysms. *Hum Hered.* 37, 255-259.
- 48) Ostergaard J.R. (1989): Risk factors in intracranial saccular aneurysms. Aspects on the formation and the rupture of aneurysms and the development of cerebral vasospasm. *Acta Neurol Scand.* 80(2), 81-98.
- 49) Ostergaard J.R., Bruun-Petersen G., Lamm L.U. (1987): HLA antigens and complement types in patients with intracranial saccular aneurysms. *Tissue Antigens*. 28(3), 176-181.

- 50) Ottinger H.D., Ferencik S., Beelen D.W., Lindemann M., Peceny R., Elmaagacli A.H., Grosse-Wilde H. (2004): Impact of HLA-A, B, C allele mismatches on outcome after unrelated blood stem cell transplantation in whites. *Transplantation*. 78, 1077-1080.
- 51) Raabe A., Beck J., Berkefeld J., Deinsberger W., Meixenberger J., Schmiedek P., Seifert V., Steinmetz H., Unterberg A., Vajkoczy P., Werner C. (2005): Empfehlungen zum Management der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung. *Zentralblatt Neurochirurgie*. 66, 79-91.
- 52) Rasmussen T.E., Hallett J.W. Jr., Harmsen W.S., Schulte S., O'Fallon W.M., Weyand C.M. (2001): Genetic similarity in inflammatory and degenerative abdominal aortic aneurysms: a study of human leukocyte antigen class I disease risk genes. *J Vasc Surg*. 34(1), 84-89.
- 53) Rasmussen T.E., Hallett J.W. Jr., Tazelaar H.D., Miller V.M., Schulte S., O'Fallon W.M., Weyand C.M. (2002): Human leukocyte antigen class II immune response genes, female gender and cigarette smoking as risk and modulating factors in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 35(5), 988-993.
- 54) Rinkel G.J., Djibutu M., van Gijn J. (1998): Prevalence and risk factors of rupture of intracranial aneurysms: a systemic review. *Stroke*. 29, 251-256.
- 55) Ronkainen A., Miettinen H., Karkola K., Papinoha S., Vanninen R., Puranen M., Hernesniemi J. (1998): Risk of harbouring an unruptured intracranial aneurysm. *Stroke*. 29, 359-362.
- 56) Ruigrok Y.M., Rinkel G.J., Wijmenga C. (2005): Genetics of intracranial aneurysms. *Lancet Neurol*. 4, 179-189.
- 57) Ryba M., Grieb P., Podobinska I., Iwanska K., Pastuszko M., Gorski A. (1992): HLA antigens and intracranial aneurysms. *Acta Neurochir*. 116(1), 1-5.
- 58) Sakaguchi J., Takeshita M., Kagawa M., Izawa M., Takakura K. (1994): HLA-type of cerebral vasospasm patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosuurg Rev*. 17, 67-71.
- 59) Sandalcioglu I.E., Wende D., Eggert A., Regel J.P., Stolke D., Wiedemayer H. (2006): VEGF plasma levels in nonruptured intracranial aneurysms. *Neurosuurg Rev*. 29(1), 26-29.
- 60) Schievink W.I. (1997): Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 40(4), 651-662; discussion 662-653.

- 61) Schievink W.I., De Waal L.P., Hageman L.M., Van der Werf A.J. (1988): Intracranial aneurysm and HLA-DR2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 52(6), 883.
- 62) Schirmer M. (2005): *Neurochirurgie*. 10. Auflage. München. Elsevier.
- 63) Schwimmbeck P.L., Yu D.T.Y. (1987): Autoantibodies to HLA B27 in sera of HLA B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiters syndrome. Molecular mimicry with *Klebsiella pneumoniae* as potential mechanism of autoimmune diseases. *J Exp Med*. 166, 173-181.
- 64) Snell, G. (1941): *Biology of the Laboratory Mouse*. Dover.
- 65) Steiner H.H., Unterberg A. (1999): Die akute Subarachnoidalblutung. In: Schwab S., Krieger D., Müllges W., Hamann G., Hacke W. (Hrsg): *Neurologische Intensivmedizin*. S. 386-404. Berlin, Heidelberg, New York (usw.). Springer.
- 66) Steinmetz H., Raabe A. (2004): Subarachnoidalblutung. In: Sitzler M., v. Stuckrad-Barre S., Schmutzhard E. (Hrsg): *Neurologische Notfall- und Intensivmedizin*. S. 202-208. München, Jena. Elsevier.
- 67) Stieglitz H., Fosmire S., Lipsky P. (1989): Identification of a 2-Md plasmid from *Shigella flexneri* associated with reactive arthritis. *Arthr Rheum*. 32, 937-946.
- 68) Svejgaard A., Platz P., Ryder L.P. (1982): HLA and disease- a survey. *Immunol Rev*. 70, 193-218.
- 69) Uehara T., Tabuchi M., Mori E. (1998): High frequencies of unruptured IA in female patients with ischaemic heart disease. *J Neurosurg Psychiatry*. 64, 536-538.
- 70) Van Rood J.J., Eernisse J.G., van Leeuwen A. (1958): Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature*. 181, 1735-1736.
- 71) van der Vlies S.A., Voorter C.E., van den Berg-Loonen E.M. (1998): A reliable and efficient high resolution typing method for HLA-C using sequence-based typing. *Tissue Antigens*. 52(6), 558-568.
- 72) Wardlaw J.M., White P.M. (2000): The detection and management of unruptured intracranial aneurysms. *Brain*. 123, 205-221.
- 73) Wiebers D.O., Whisnant J.P., Sundt T.M. Jr., O'Fallon W.M. (1987): The significance of unruptured intracranial saccular aneurysms. *J Neurosurg*. 66, 23-29.
- 74) Weir B. (2002): Unruptured intracranial aneurysms: a review. *J Neurosurg*. 96, 3-42.
- 75) Weyand C.M., Goronzy J.J. (1997): HLA Krankheitsassoziationen. *J. Mol. Med*. 75, 772-785.
- 76) William A.P., Bateman A.R., Khakoo S.I. (2005): Hanging in the balance. KIR and their role in disease. *Mol Interv*. 5(4), 226-240.

- 77) Wills S., Ronkainen A., Van der Voet M., Kuivaniemi H., Helin K., Leinen E., Frosen J., Niemela M., Jaaskelainen J., Hernesniemi J., Tromp G. (2003): Familial intracranial aneurysms: an analysis of 346 multiplex Finnish families. *Stroke*. 34(6), 1370-1374.
- 78) Zhang B., Fugleholm K., Day L.B., Ye S., Weller R.O., Day I.N. (2003): Molecular pathogenesis of subarachnoid haemorrhage. *Int J Biochem Cell Biol*. 35(9), 1341-1360.
- 79) Zinkernagel R.M., Doherty P.C. (1974): Restriction of in vitro T Cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogenic system. *Nature*. 248, 701-721.

9 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACA	Arteria cerebri anterior
ACI	Arteria carotis interna
AcerebA	Arteria cerebelli anterior
AcerebP	Arteria cerebelli posterior
AcoA	Arteria communicans anterior
AcoP	Arteria communicans posterior
ACP	Arteria cerebri posterior
ADPKD	Autosomale dominante polyzystische Nierenkrankheit
ADH	Anti diuretisches Hormon
AS	Aminosäure
BA	Basilararterie
°C	Grad Celsius
CT	Computer Tomographie
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure = DNS
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
GOS	Glasgow Outcome Scale
GVHD	Graft-versus-host-disease
HH	Hunt und Hess
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozyte Antigen
IA	Intrakranielle Aneurysmen

ICB	Intrazerebrale Blutung
ISUIA	International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms
Kb	Kilobasen
kD	Kilodalton (relatives Molekulargewicht)
KIR	Killer immunglobulin-like receptor
L	Liter
m	Männlich
mA	Milliamper
ml	10^{-3}
MCA	Arteria cerebri media
MHC	Major Histocompatibility Complex (= HLA beim Menschen)
MR	Magnetic Resonance
MRT	Magnetic Resonance Tomography
ng	nanogram
NK	Natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Nacl-Lösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PICA	Arteria cerebelli inferior posteriore
POX	Peroxidase
s	Sekunde
SAB	Subarachnoidal Blutung
SIADH	Syndrome der Inadäquate ADH Ausschüttung
SSP	Sequenzspezifische Primer
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris, Borat, EDTA
TCR	Thymus Zellrezeptor

TIA	Transischämische Attacke
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UV	Ultra Violet
V	Volt
ul	10^{-6}
U/min	Umdrehungen pro Minute
VA	Vertebrale Arterie
w	Weiblich
W	Watt

10 Anhang

10.1 Abbildungen

<u>Abbildung 1 Diagnostisches und therapeutisches Vorgehen bei Verdacht auf Subarachnoidalblutung, nach Steiner H.H. und Unterberger A., 1999.....</u>	11
<u>Abbildung 2 Coiling (A) und Clipping (B) bei IA (Johnston S.C. et al., 2000).....</u>	12
<u>Abbildung 3 Genkarte Chromosom 6.....</u>	14
<u>Abbildung 4 Auswertungsprotokoll für HLA-DRB1* und -DQB1.....</u>	26

10.2 Tabellen

<u>Tabelle 1 Vergleich des Vorkommens von IA an intrakraniellen Arterien.....</u>	7
<u>Tabelle 2 Klinische Gradeinteilung der SAB; Hunt und Hess, 1968.....</u>	9
<u>Tabelle 3 Fisher Einteilung anhand von CT-Aufnahmen bei IA; Fisher et al., 1980.....</u>	9
<u>Tabelle 4 HLA Krankheitsassoziationen.....</u>	16
<u>Tabelle 5 HLA Klasse I und II-Amplifizierung.....</u>	24
<u>Tabelle 6 Demographisches Profil der Patienten.....</u>	28
<u>Tabelle 7 Lokalisation der IA.....</u>	30
<u>Tabelle 8 Risikofaktoren bei Aneurysma.....</u>	31
<u>Tabelle 9 Verteilung der HLA-A und -C Allele von Patienten und dem Normalkollektiv.....</u>	34
<u>Tabelle 10 Vergleich der HLA-B Allele von Patienten und dem Normalkollektiv.....</u>	35
<u>Tabelle 11 Vergleich HLA-DR Allele von Patienten und Normalkollektiv.....</u>	36
<u>Tabelle 12 Verteilung der HLA-DQ Allele von IA Patienten und Normalkollektiv.....</u>	37
<u>Tabelle 13 Vergleich HLA-A Allele von Patienten mit und ohne SAB mit dem Normalkollektiv.....</u>	38
<u>Tabelle 14 Vergleich HLA-B Allele von Patienten mit und ohne SAB mit dem Normalkollektiv.....</u>	39
<u>Tabelle 15 HLA-C-, -DR- und -DQ Allele von Patienten mit und ohne SAB mit dem Normalkollektiv.....</u>	40
<u>Tabelle 16 Vergleich der HLA-A Allele von Patienten mit und ohne SAB.....</u>	41
<u>Tabelle 17 Vergleich HLA-B von IA Patienten mit und ohne SAB.....</u>	42
<u>Tabelle 18 HLA-C-, -DR- und -DQ Allele von IA Patienten mit und ohne SAB.....</u>	44
<u>Tabelle 19 Wichtigste Ergebnisse des HLA Allele Vergleichs.....</u>	44

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken – an dieser Stelle vor allem für die Möglichkeit zu studieren. Und ich bedanke mich für die endlose Unterstützung im Laufe meines bisherigen Lebens. Ich bedanke mich innig bei meiner Frau, Dr. Elisabeth Siewe, für ihre Liebe, ihre Ratschläge und die stete Aufmunterung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Grosse-Wilde für die interessante und praxisnahe Aufgabenstellung meiner Doktorarbeit. Den reibungslosen Ablauf dieser Arbeit verdanke ich der wissenschaftlichen Betreuung, Anregungen und kritischen Beurteilung durch Frau Dr. V. Rebmann, Herrn Dr. J. Regel und Herrn Dr. S. Ferencik. Für die Einarbeitung in die HLA-Testung danke ich Herrn Dr. S. Ferencik. Herr Dr. J. Regel gab mir wichtige Einblicke in das Thema der intrakraniellen Aneurysmen. Frau Dr. V. Rebmann danke ich für die Koordinationshilfe beider Fachgebiete. Allen dreien danke ich für die kritische Beurteilung der vorliegenden Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie des Universitätsklinikums Essen danke ich für ihre Ratschläge, ihre Hilfsbereitschaft und ihre aufmunternden Worte zum Gelingen meiner Arbeit.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Noutchangoin Njawe Siewe
Geburtsdatum	14.11.1976
Geburtsort	Tiko-Fako (Kamerun)
Wohnort	Wuppertal
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung und Studium

09/1981 – 07/1988	St. Joseph's Primary School Tiko, Kamerun Abschluss: First School Leaving Certificate
09/1988 – 07 /1993	Government Bilingual High School Kumba, Kamerun Abschluss: General Certificate of Education (GCE), Ordinary Level
09/1993 – 07/1995	Cameroon College of Arts & Science Kumba, Kamerun Abschluss: GCE Advanced Level
09/1995 – 09/1997	Imperial College of Arts & Science Tiko, Kamerun Ausbildung zum Junior High School Lehrer für Physik und Chemie
12/1997 – 07/1998	Deutschkurs, Universität Kiel. Abschluss: PNdS
10/1998 – 07/2001	Studium der Humanmedizin, Universität Kiel
03/2001	Physikum, Universität Kiel
03/2001 – 07/2001	Freisemester BSE-Testung, Labor Dr. Ballies, Kiel
10/2001 – 10/2005	Studium der Humanmedizin, Universität Duisburg-Essen
08/2002	1. Abschnitt Ärztliche Prüfung
08/2004	2. Abschnitt Ärztliche Prüfung
10/2005	3. Abschnitt Ärztliche Prüfung
01/2006 – 05/2006	Assistenzarzt, Evangelisches Krankenhaus Oberhausen
07/2006 – dato	Assistenzarzt, Frauenklinik Kliniken St. Antonius Wuppertal