

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik
- Innere Medizin A -
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -

**Molekulargenetische Untersuchung von HLA-DPB 1 bei HLA A, B, DR und DQ
identischen Knochenmark-Spender und -Empfänger Geschwisterpaaren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Michael Mohr

aus Dortmund

2003

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H.Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. H. Serve
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Bielack

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2003

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Genomische Organisation des MHC-Komplexes	4
1.2 Aufbau der MHC-Moleküle	7
1.2.1 Tertiärstruktur der HLA Klasse I Moleküle	7
1.2.2 Tertiärstruktur der HLA Klasse II Moleküle	8
1.3 Funktion der HLA-Moleküle	10
1.3.1 Antigen Präsentation	11
1.3.2 Das TCR Repertoire	14
1.3.3 Allogene Erkennung der HLA Antigene	15
1.4. Die Entwicklung der HLA-Typisierung	18
1.4.1 Die serologische HLA-Typisierung	18
1.4.2 Molekulargenetische HLA-Typisierung	20
1.5 Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD)	21
1.5.1 Akute GvHD	21
1.5.2 Chronische GvHD	23
1.6 Die HLA-DP Antigene	24
1.6.1 Genorganisation und Aufbau der HLA-DP Antigene	24
1.6.2 Bedeutung der HLA-DP Antigene	25
1.6.2.1 Assoziation von HLA-DP Antigenen mit Erkrankungen	25
1.6.2.2 HLA-DPB1 und Knochenmarktransplantation (KMT)	27
1.7 Ziel dieser Studie	29
1.7.1 Methodische Ziele	29
1.7.2 Klinische Ziele	29
2. MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 DNA-Proben	31

2.2	Patientenkollektiv	32
2.3	DNA-Isolierung	32
2.4	PCR-Bedingungen	33
2.5	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.6	PCR-SSO Reverse Dot Blot-Verfahren	35
2.6.1	Oligonukleotide	35
2.6.1.1	Design	35
2.6.1.2	Synthese der poly dT-tails	37
2.6.1.3	Crosslinking der Oligonucleotide mit Nylonmembranstreifen	37
2.6.2	Hybridisierung	38
2.6.3	Waschen	38
2.6.4	Detektion positiver Signale	38
2.6.5	Interpretation	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.2	PCR Amplifizierung	40
3.1.2	Hybridisierung	41
3.2	Patientenproben	42
3.2.1	Allelhäufigkeiten	42
3.2.1	HLA-DPB1 Inkompatibilität	43
4.	DISKUSSION	46
4.1	Bedeutung der molekulargenetischen HLA-Typisierung	46
4.2	Bedeutung der HLA-DP Typisierung	46
4.3	HLA-DPB1 Mismatches	47
5.	ZUSAMMENFASSUNG	51
	LITERATUR	53
	LEBENS LAUF	64

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinischen Klinik und Poliklinik
- Innere Medizin A -
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Serve
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Bielack

ZUSAMMENFASSUNG

Molekulargenetische Untersuchung von HLA-DPB 1 bei HLA A, B, DR und DQ identischen
Knochenmark-Spender und -Empfänger Geschwisterpaaren

Mohr, Michael

Zur Bedeutung der HLA-DP Antigene als Transplantationsantigene im Rahmen der HD-Chemotherapie mit anschließender allogener Stammzelltransplantation gibt es bisher nur wenige Studien mit geringen Fallzahlen und widersprüchlichen Ergebnissen. Die Möglichkeiten der serologischen HLA-DP Typisierung sind sehr beschränkt; lediglich 6 Phänotypen lassen sich so bestimmen. Demgegenüber stehen aktuell 92 HLA-DPB1 Allele, die sich mit molekulargenetischen Untersuchungen unterscheiden lassen. Die rechnerische Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zwischen HLA-DRB1 und-DPB1 im Verlauf einer meiotischen Teilung liegt bei einer Entfernung von 0,9 Millionen Basenpaaren (=0,9cM), bei 0,9%. Frühere Untersuchungen zur Auswirkung einer DPB1 Inkompatibilität im Rahmen der allogenen KMT bei HLA-A und B (Klasse I) und DRB1 und DQB1 (Klasse II) identischen Geschwistern ergaben eine Rekombinationsrate von bis zu 2,7%. Eine Rekombinationsrate von 2,7% würde wiederum rechnerisch zu einer Inkompatibilität in 10,8% der Fälle führen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der molekulargenetischen Analyse der HLA-DPB1 Merkmale von Geschwisterpaaren, zwischen denen eine allogene Knochenmarktransplantation durchgeführt wurde bzw. geplant war und die im Rahmen der im Vorfeld durchgeführten Familienuntersuchungen als HLA identisch getestet wurden. Für diese Arbeit und die weitere Routinediagnostik wurde das PCR-SSO Reverse Dot Blot-Verfahren etabliert. Anschließend erfolgte die Typisierung von 203 Proben von 91 Patienten und deren 1-3 Geschwistern. Ziel dieser Untersuchungen sollte die Bestimmung der Häufigkeit von HLA-Inkompatibilität in unserem Kollektiv und eine Korrelation zwischen eventueller DPB1 Inkompatibilität und dem Verlauf einer Knochenmarktransplantation sein. Von den 91 Patienten zeigte sich in einem Fall eine Inkompatibilität mit dem potentiellen Knochenmarkspender. Die weitere Segregationsanalysen ergaben jedoch, dass diese nicht auf eine Rekombination, sondern auf eine unterschiedliche Verteilung der Haplotypen bei HLA A, B, DRB1 und DQB1 homozygoter jedoch DPB1 heterozygoter Mutter zurückzuführen war.

Anhand des untersuchten Patientenkollektives konnte eine gegenüber der rechnerisch erwarteten erhöhte Rekombinationsrate zwischen HLA-DRB1 und -DPB1 nicht bestätigt werden. Die molekulargenetische HLA-DPB1 Diagnostik bei ansonsten HLA identischen Geschwisterpaaren erscheint somit nicht sinnvoll.

1. EINLEITUNG

Die Hochdosis (HD)-Chemotherapie mit anschließender Knochenmarktransplantation (KMT) bzw. peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSZT) wurde im Laufe der letzten zwanzig Jahre aus dem experimentellen Stadium zu einer ausgereiften und effektiven Behandlung benignen und malignen hämatologischer Erkrankungen entwickelt. Die Indikationen zur HD-Therapie sind inzwischen auf die Therapie solider maligner Tumoren im Rahmen von randomisierten Studien ausgeweitet worden (*Schmitz et al. 1996*).

Grundsätzlich unterschieden werden die autologe KMT, d.h. die Retransfusion eigener, vor Beginn der HD-Chemotherapie gewonnener, hämatopoetischer Stammzellen, und die allogene KMT, d.h. die Transfusion hämatopoetischer Stammzellen eines Spenders. In beiden Fällen dient die Stammzelltransfusion dem Abfangen der Hämatotoxizität der hochdosierten Chemotherapie. In bezug auf das Wirkprinzip der Therapie im Rahmen der autologen und allogenen KMT bestehen jedoch wesentliche Unterschiede. Als entscheidend bei der allogenen KMT hat sich die zusätzliche Übertragung immunkompetenter Lymphozyten, die für die Elimination verbliebener Tumorzellen bedeutend sein kann, erwiesen (*Kolb et al. 1995*). Mit dieser immunologischen Komponente geht jedoch auch eines der wesentlichen Probleme der allogenen KMT einher; denn die Wirkung der Spender-Lymphozyten richtet sich nicht nur gegen maligne (Graft-versus-tumor (GVT)-Effekt), sondern auch gegen gesunde Zellen des Empfängers (graft-versus-host (GVH)-Effekt). Die aktuellen Indikationen zur HD-Therapie sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Wesentlich für die immunologische Komponente bei allogener KMT sind die Gewebeverträglichkeitsantigene (HLA-Merkmale). Diese schränken die Kompatibilität von fremdem Knochenmark stark ein, weshalb in den letzten Jahren die Untersuchungsmöglichkeiten dieser Merkmale perfektioniert worden sind (*Ottlinger et al. 1997*).

Erkrankung:	Stadium/Risiko:
AML	1.CR 1.PR, 2. oder spätere CR, Rezidiv, refr. AML
MDS	RA, RAS mit klon. Marker Progressive Zytopenie RAEB, RAEB-T
ALL	1. CR , Hochrisiko; t(9;22), t(4;11) 2. CR, PR
MPS	CML: chronische Phase, Akzeleration, Blastenkrise OMF
Lymphome	Plasmocytom Follikuläre Lymphome, St. III-IV Mantelzell-Lymphom Hochmaligne NHL (Rezidiv nach autologer PBSCT) M. Hodgkin (Rezidiv nach autologer PBSCT) CLL
Schwere aplastische Anämie	Alle bis 40 Jahre
PNH	Nach Komplikationen
Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID)	Alle
Andere kombinierte Immundefekte	Alle
Juvenile Osteopetrose	Alle
Fanconi-Anämie	Bei Progress
Neutrophilendefekt e: M. Kostman, septische Granulomatose	Versager auf G-CSF bzw. auf Infektionsprophylaxe
Homozygote β - Thalassämie, Sichelzellanämie	Fakultativ
Angeborene Stoffwechsel- Erkrankungen	Fakultativ

**Tabelle 1: Indikation zur HD-Chemotherapie m. allogener KMT/PBSCT
(mod. n. Link et al. 1997) CR: komplette Remission, PR: partielle Remission**

Im Vorfeld einer KMT werden heute zuerst die engsten Verwandten auf ihre HLA-Kompatibilität für HLA-A und -B (Klasse I) und HLA-DRB1 und DQB1 (Klasse II) Merkmalen überprüft. Optional können noch Klasse I HLA-C und Klasse II DPB1 getestet werden; hier führen jedoch Inkompatibilitäten nicht zum Ausschluss einer KMT. Ergibt sich dabei keine zur Transplantation geeignete Konstellation, wird die Suche auf den erweiterten Familienkreis ausgeweitet; bei weiterem Misserfolg kann eine Fremdspendersuche eingeleitet werden. In dem Fall, dass sich ein ausreichend HLA-kompatibler Spender findet, wurde die Verträglichkeit früher noch ergänzend durch die sog. gemischte Lymphozytenkultur (*mixed lymphocyte culture*, MLC) überprüft. Aufgrund der zunehmenden Erfahrungen im Bereich der allogenen KMT und der molekulargenetischen Diagnostik haben sich solche Funktionstests für die Routinediagnostik als nicht mehr notwendig erwiesen (*Ottinger et al. 1997*).

Trotz der ausgereiften Methoden zur Bestimmung der Gewebeverträglichkeit und der vielfältigen medikamentösen Möglichkeiten einer Abstoßungsreaktion zu begegnen, bleibt ein nicht unerhebliches Risiko einer unerwarteten Abstoßung bestehen. Die besten Prognosen haben Knochenmarktransplantationen zwischen HLA-identischen Geschwistern, wobei die rechnerische Wahrscheinlichkeit für Geschwister HLA-identisch zu sein, lediglich 25% beträgt. Rechnerisch ergibt sich, bei der heutzutage üblichen Familiengröße, eine Wahrscheinlichkeit von unter 20% für einen Patienten, ein HLA-identisches Geschwister zu haben. In der Praxis werden jedoch für ca. 25-30% der Patienten HLA-kompatible Familienspender und für 50-70% der Patienten ohne Familienspender nichtverwandte Spender gefunden (*Ottinger et al. 1994*; *Link et al. 1997*).

Neben der statistischen Unwahrscheinlichkeit kann ein weiterer Grund für eine HLA-Inkompatibilität zwischen Geschwistern ein "crossing-over"-Ereignis im Bereich des MHC-Komplexes bei der meiotischen Teilung sein. Zur Häufigkeit solcher "crossing-over"-Ereignisse gibt es unterschiedliche Angaben (*Steinmetz et al. 1987*). In dieser Arbeit wurde die Rekombinationsrate zwischen den HLA-DPB1 und HLA-DQB1 Genorten untersucht.

Einige der hier kodierten Gene stehen in enger Beziehung zur Antigenpräsentation, z.B. die Gene LMP1 und 7 des Proteosoms und die Tap 1 und 2 Gene, die ihre Rolle in der Antigenprozessierung haben. Andere Gene, z.B. das der 21-Hydroxylase sind gut bekannt, stehen aber in keinem direkten Zusammenhang zum Immunsystem. Weitere hier bekannte Gene sind die der Komplementfaktoren C4, C2, des Faktor B, der TNF α und β und die der Hitzeschockproteine.

Die MHC-Moleküle sind polygen, werden also von verschiedenen Genen kodiert. Eine noch größere Variation wird durch ihren Polymorphismus bedingt, d.h. für jeden der Genorte gibt es multiple Allele. So sind z.B. für den HLA-DPB1 Genort 92 verschiedene Allele bekannt (*Steven G.E. Marsh; Anthony Nolan Research Institute*).

Als Kopplungsungleichgewicht bezeichnet man die Tatsache, dass einige HLA-Allele häufiger miteinander gekoppelt vorkommen als ihre Gesamthäufigkeit rechnerisch erwarten ließe. Untersuchungen von Typ I Diabetes (IDDM)-Patienten haben z.B. ergeben, dass das bei ihnen gehäuft gefundene DPB1*0202 Allel in 64% mit dem DRB1*0301 Allel gekoppelt auftrat, dessen Assoziation mit dem IDDM bekannt ist. Nach den Gesamthäufigkeiten berechnet, sollte die Kopplung jedoch nur 12% betragen (*Buyse et al. 1993*).

Die Allele eines Gens werden untereinander codominant exprimiert. Aufgrund der hohen Zahl der Allele ist die Wahrscheinlichkeit, heterozygot zu sein, hoch; sie liegt bei ca. 90%.

Der Polymorphismus der einzelnen Allele beschränkt sich meist auf einen kleinen Bereich, der für die antigenbindende Spalte des Moleküls kodiert. Für HLA-DPB1 kodiert Exon 2 für den polymorphen Bereich der peptidbindenden Stelle (Abb. 3).

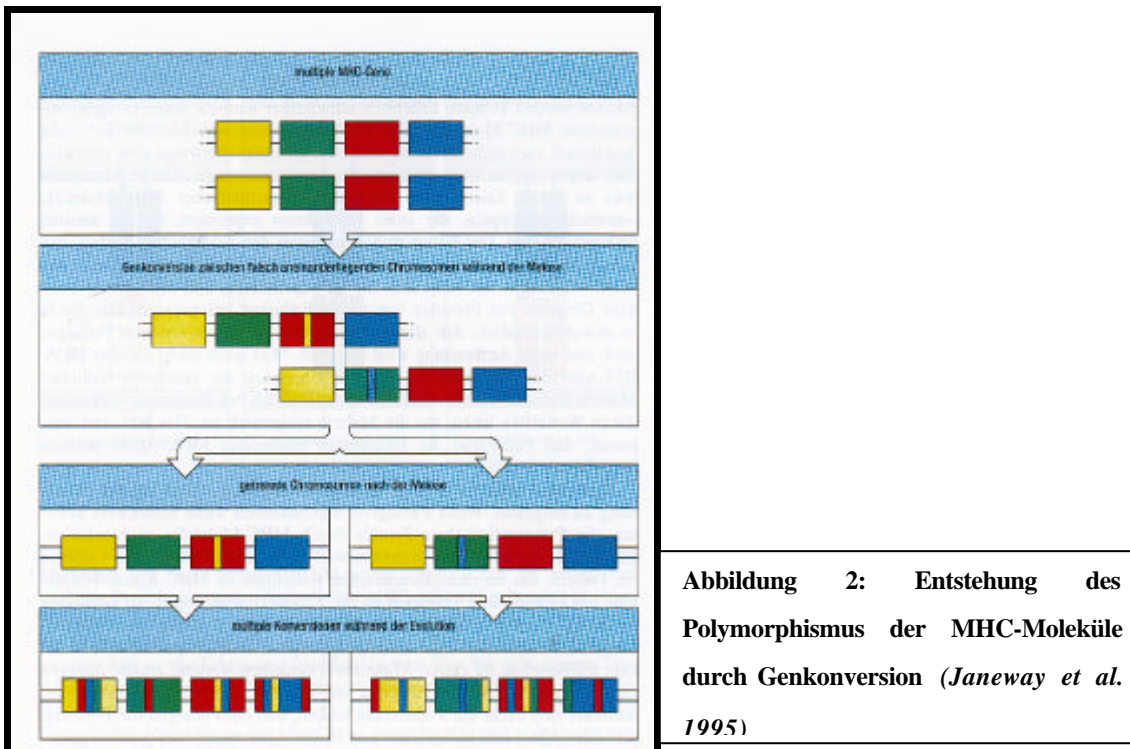
Die durch den Polymorphismus entstehenden Unterschiede in der Antigenpräsentation haben Einfluss auf die Effektivität der zellulären Immunität, denn nicht jedes prozessierte Antigen passt in gleichem Maße in jede Peptidbindungsstelle. Durch eine große Zahl verschiedener

MHC-Moleküle wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sich jeweils eine zur Antigenpräsentation geeignete Peptid-MHC-Konstellation findet.

Ein ähnliches Phänomen liegt den sogenannten "crossing-over"-Ereignissen zu Grunde. Hierbei kommt es während der Meiose zum Austausch ganzer Genorte zwischen den Chromosomen. Dieser Austausch ist ein physiologischer Vorgang, der neben Mutation und Selektion eine der Grundlagen der Artenentwicklung im Laufe der Evolution bildet.

Die Häufigkeit von "crossing-over"-Ereignissen zwischen zwei Genorten ist in erster Linie von der Entfernung beider Genorte auf dem Chromosom abhängig. Rechnerisch liegt die Wahrscheinlichkeit für ein "crossing-over"-Ereignis bei circa einem Prozent pro einer Million (= 1cM-Centimorgan) Basenpaaren. Im Bereich des MHC (3,5cM) würde das bedeuten, dass es in 3,5% der meiotischen Teilungen zu einer neuen Rekombination kommt. Im Falle einer KMT zwischen Geschwistern hieße dies, die Wahrscheinlichkeit einer HLA-Identität reduziere sich von 25% auf ca.18% (*Bender, 1989*).

Ein "crossing-over"-Ereignis verläuft jedoch nicht immer nach dieser Zufallswahrscheinlichkeit, sondern es gibt Orte, zwischen denen es wesentlich häufiger als erwartet zu Rekombinationen kommt, sogenannte "recombination-hotspots". Andererseits gibt es auch Abschnitte im Chromosom, zwischen denen Rekombinationen wesentlich seltener vorkommen, als es rechnerisch zu erwarten wäre. So beträgt die Rekombinationsrate zwischen HLA-A und -B bei einer Entfernung von 1,3 cM lediglich 0,8%. Demgegenüber gilt die Region zwischen DRB1 und DPB1 mit 0,9 cM und einer Rekombinationsrate von bis zu 2,7% als möglicher "hotspot" (*Nomura et al. 1991; Steinmetz et al. 1987; Bender, 1989*).



1.2 Aufbau der MHC-Moleküle

Die MHC Klasse I und II Moleküle sind membranständige Glykoproteine. Sie bilden mit ihren jeweils 2 Ketten, α und β , vier Domänen aus. Die MHC Klasse I Moleküle bestehen aus einer schweren α -Kette und dem, nicht im Bereich des MHC kodierten, β 2-Mikroglobulin (β 2m, Chromosom 15) (Bjorkman *et al.* 1987). Die Verankerung in der Zellmembran erfolgt nur durch die α -Kette. Demgegenüber werden sowohl die α - , als auch die β -Kette der HLA Klasse II Antigene im MHC-Komplex codiert. Beide Ketten sind in der Zellmembran verankert.

1.2.1 Tertiärstruktur der HLA Klasse I Moleküle

Die Tertiärstruktur der HLA Klasse I Moleküle konnte durch Röntgenstrukturanalysen ermittelt werden (*Bjorkman et al. 1987; Garret et al. 1989; Madden et al. 1992*). Ein HLA Klasse I Molekül besteht aus zwei Paaren von strukturell homologen Domänen. Ein Paar stellen die proximal gelegenen $\alpha 3$ und die $\beta 2m$ Domäne da, während das zweite Paar von den distal der Membran gelegenen Domänen $\alpha 2$ und $\alpha 3$ gebildet wird. Die $\alpha 3$ und die $\beta 2m$ Domäne ordnen sich in Form einer β -Sandwich Struktur identisch zur Struktur der konstanten Region von Immunglobulinen. Die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen lagern sich dieser Struktur auf und bilden zwei α Helices, welche zwischen sich einen tiefen Spalt ausbilden, der als antigenbindende Stelle dient. Die Antigenbindung erfolgt bei den HLA Klasse I Molekülen an den Enden der Peptide. Die Länge der gebundenen Peptide beträgt in der Regel 8-10 Aminosäuren. Das $\beta 2m$ interagiert mit allen drei Domänen und stabilisiert die Tertiärstruktur der HLA-Klasse I Moleküle. Weiterhin ist das $\beta 2m$ für die Biosynthese und Expression der HLA-Klasse I Moleküle mitverantwortlich. Ein Verlust an $\beta 2m$ entspräche daher einem kompletten Verlust an HLA-Klasse I Molekülen.

Die Genstruktur der HLA-Klasse I Moleküle ist erstmals 1984 für die HLA-A3 und Cw3 allele gezeigt worden (*Strachan et al. 1984; Sodoyer et al. 1984*). Das HLA-Klasse I Gen trägt die prinzipiellen Eigenschaften aller Eucaryonten-Gene. Die kodierenden Abschnitte (exons) werden unterbrochen von nicht kodierenden Abschnitten (introns), welche mehr als 2/3 der Gesamtlänge des Gens ausmachen.

1.2.2 Tertiärstruktur der HLA Klasse II Moleküle

Die Tertiärstruktur der HLA Klasse II Moleküle konnte 1993 durch die Röntgenstrukturanalyse von HLA DR1 gezeigt werden (*Brown et al. 1993*). Parallel zu den Klasse I Molekülen bilden auch hier die $\alpha 2$ und die $\beta 2$ Domäne eine proximal der Membran liegende Struktur, die der konstanten Region der Immunglobulin-Schwerketten entspricht. Die

distal der Membran gelegenen polymorphen $\alpha 1$ und $\beta 1$ Domänen bilden hier den peptidbindenden Spalt aus.

Im peptidbindenden Spalt der HLA Klasse II Moleküle wird nur der Mittelteil der Peptide gebunden, damit besteht die Möglichkeit größere Peptide ohne Begrenzung auf eine Aminosäuren-Zahl zu binden (s. Abb. 3).

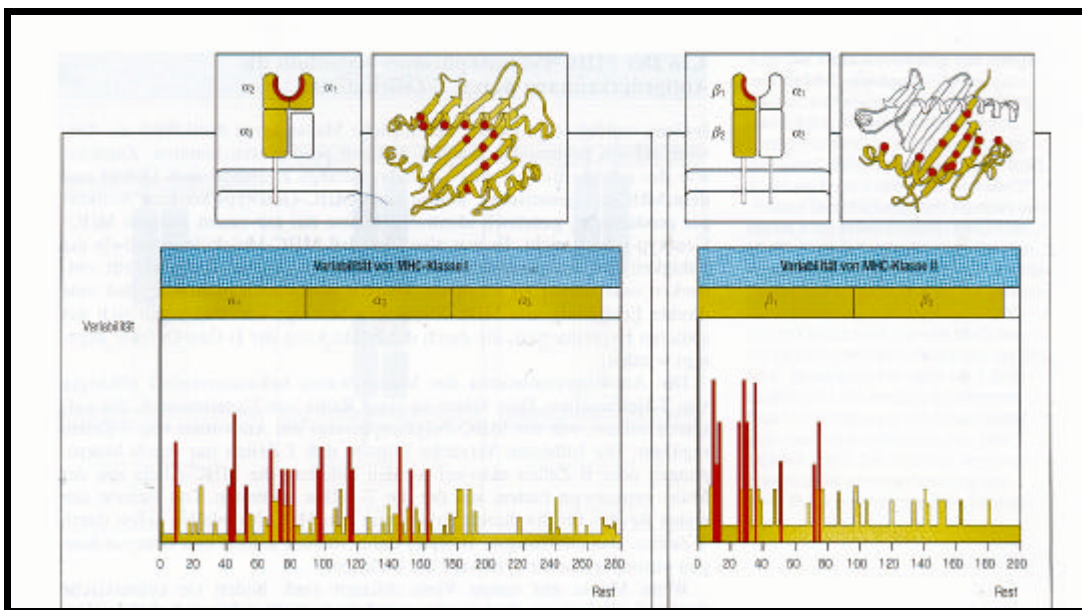


Abbildung 3: Genstruktur und Polymorphismus der MHC-Moleküle (Janeway et al. 1995)

Die Genstruktur der α -Ketten wird von A-Genen, die der β -Ketten von B-Genen kodiert. Aus diesem Grund werden die für die HLA Klasse II DR, DQ und DP kodierenden Gene DRA und DRB, DQA und DQB sowie DPA und DPB bezeichnet. In der HLA-DR Region liegt ein für die α -Kette kodierendes invariantes Gen, DRA, demgegenüber gibt es neun polymorphe DRB-Gene, von denen 5 Pseudogene sind (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8, DRB9). DRB1 kodiert die serologisch erfassbaren Spezifitäten DR1-18 und erbringt die überwiegende immunologische Leistung.

Auch die HLA-DQ und DP Regionen bestehen aus verschiedenen Genen. Im Gegensatz zur DR-Region liegen hier neben den zwei bzw. drei B-Genen auch zwei A-Gene. Die Gene

DQA1, DQB2, DQB3, DPA2 und DPB2 sind jedoch Pseudogene. Die verschiedenen HLA Klasse II Gene gleichen sich in ihrer Struktur, 94% werden von nicht kodierenden Sequenzen gebildet, während die übrigen 6% kodieren. Exon 1 kodiert für das Signal-Peptid, Exon 2 für die polymorphe β 1-Domäne, Exon 3 für die nicht variable β 2-Domäne, während die Exons 4-6 für transmembrane und cytoplasmatische Regionen kodieren (für DRA nur Exons 4+5).

Da es bei der Bindung eines Antigens nur auf einen kleinen Teilbereich der Peptidstruktur ankommt, kann eine große Zahl ansonsten unterschiedlicher Peptide von gleichartigen MHC-Molekülen präsentiert werden. Die Präsentation gilt dem T-Zellrezeptor der CD8- bzw. CD4-Zellen, bei dem es sich um ein membranständiges Glykoprotein, das dem FAB-Fragment der Immunglobuline gleicht, handelt (Abb. 4).

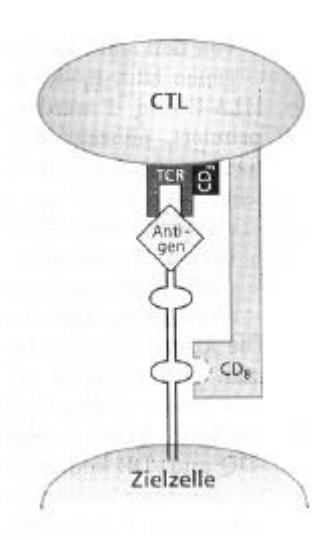


Abbildung 4: Antigenerkennung durch MHC restringierte zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) (Schmoll et al. 1996)

1.3 Funktion der HLA-Moleküle

Lymphozyten sind die Vermittler der Antigen-spezifischen Immunantwort. Es werden zwei Gruppen von Lymphozyten unterschieden, zum einen die B-Lymphozyten, deren Aufgabe in erster Linie in der Produktion von Immunglobulinen besteht und zum anderen die T-Lymphozyten, welche vielfältige Aufgaben, wie z.B. die Interaktion mit B-Lymphozyten zur

Immunreaktion und die spezifische Abtötung Virus infizierter Zellen, haben. Schlüsselemente der T-Zell vermittelten Immunität sind der T-Zell-Receptor und die HLA-Moleküle.

Die HLA-Moleküle wurden erstmals im Zusammenhang mit Gewebetransplantationen entdeckt. Ihre eigentliche immunologische Bedeutung liegt jedoch in ihrer Rolle bei der T-Zell vermittelten Immunantwort. HLA Klasse I und II Antigene haben in diesem Zusammenhang eine ähnliche Funktion. Die Voraussetzung für die Erkennung eines Pathogens bzw. einer durch ein Pathogen infizierten Zelle durch zytotoxische T-Zellen ist die Präsentation einer antigenen Struktur des Pathogens durch HLA-Moleküle an der Zelloberfläche. Diese HLA-Moleküle müssen identisch zu denen der T-Zelle sein. Dieser Zusammenhang wird als MHC Restriktion bezeichnet. Die Entdeckung der MHC-Restriktion 1974 wurde 1996 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie für Zinkernagel und Doherty gewürdigt (*Zinkernagel et al., 1974*).

Unterschiede ergeben sich in der Verteilung der HLA Klasse I und II Antigene auf verschiedenen Zellen, in der Präsentation an T-Zellen und in der unterschiedlichen Prozessierung der jeweils präsentierten Antigene.

Die beträchtlichen Sequenzunterschiede zwischen den jeweils drei HLA Klasse I und II Genorten weisen darauf hin, dass eine gewisse funktionelle Spezialisierung sowohl der HLA A, B und C, als auch der HLA DR, DQ und DP Loci existiert. Die Existenz von mehr als einem Genort erhöht die antigenpräsentierende Kapazität einer Spezies.

1.3.1 Antigen Präsentation

HLA Klasse I und II Moleküle präsentieren ein unterschiedliches Peptidspektrum. Klasse I Moleküle sind für die Präsentation von Peptiden aus endogen synthetisierten autologen oder viralen Proteinen verantwortlich (*Pieters et al. 1997; Morrisson et al 1986*). Die Präsentation endogen synthetisierter Proteine in Form von Peptiden in HLA Klasse I

Molekülen erlaubt dem Immunsystem das Innere der Zellen auf das Vorhandensein normaler oder pathologischer Proteine zu überprüfen. Demgegenüber präsentieren die Klasse II Moleküle Peptide aus endozytierten Proteinen (*Pieters et al. 2000*).

Beide Molekülklassen besitzen dementsprechend unterschiedliche intrazelluläre Prozessierungswege für die Peptidbindung. So werden HLA Klasse I schwere Ketten, β_2 Mikroglobulin und das jeweilige antigene Peptid im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zusammengesetzt und anschließend über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (*Goldberg et al. 1992; Townsend et al. 1989; Rajan et al 1987*) (s. Abb.5).

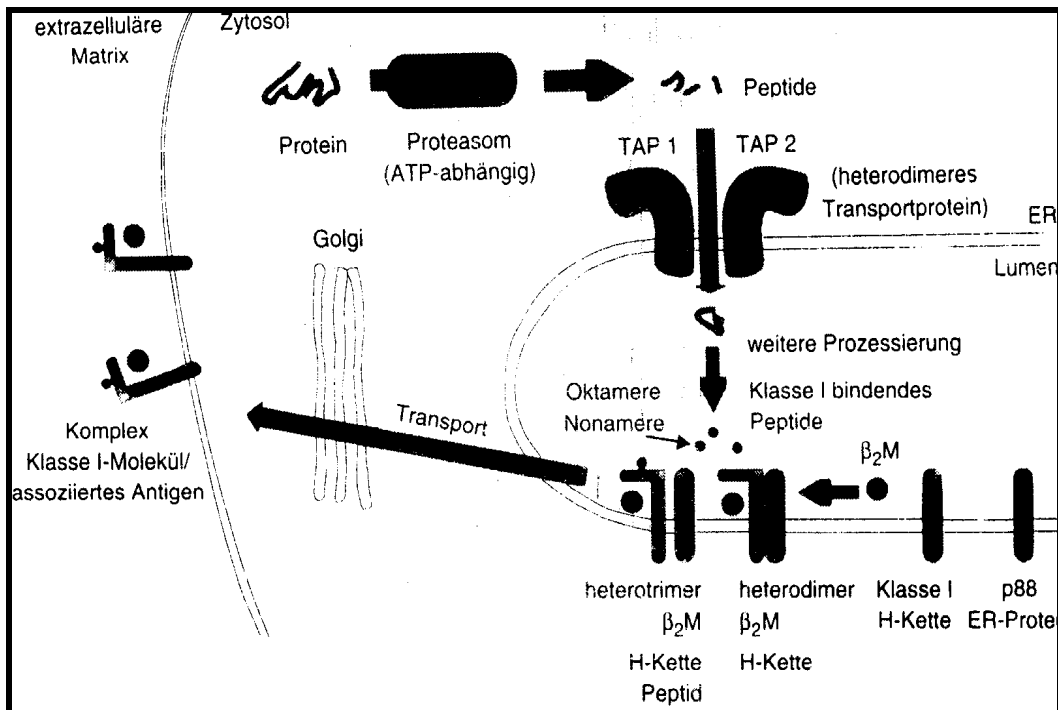


Abbildung 5: Mechanismen der Antigenengenerierung und -präsentation durch MHC-Moleküle der Klasse I (*Schmoll et al. 1996*)

Obwohl auch HLA Klasse II Moleküle im ER als Golgi-Vesikel abgeschnürt werden, kommt es erst nach Verschmelzung mit endozytierten Vesikeln bzw. Endosomen zur Beladung mit dem antigenen Peptid und zum anschließenden Transport zur Zellmembran (*Hedley et al.*

1994). Die Ursache für die späte Beladung mit einem Peptid liegt in der Blockade der PBS durch die invariante Kette, die unabhängig vom HLA Genkomplex auf Chromosom 5 kodiert wird und deren Expression mit derjenigen der HLA Klasse II Antigene regulatorisch koordiniert wird. (Lee et al.1995). Dieses Polypeptid assoziiert mit den Klasse II Ketten im ER und besetzt die Peptidbindungsstelle. Erst nach Fusion mit einem Endosom erfolgt eine proteolytische Spaltung der IV und eine HLA-DM katalysierte Freigabe der Bindungsstelle für ein prozessiertes Antigen. Von dieser strikten Einteilung der Präsentation endogener Peptide durch Klasse I und exogener Peptide durch Klasse II sind Ausnahmen beschrieben worden. (Nuchtern et al 1990; Moore et al 1988)

Insbesondere in der ontogenetischen Entwicklung der immunologischen Toleranz gegenüber autologen Proteinen präsentieren beide HLA Klassen endogene Peptide (Guery et al 1995) (s.Abb. 6).

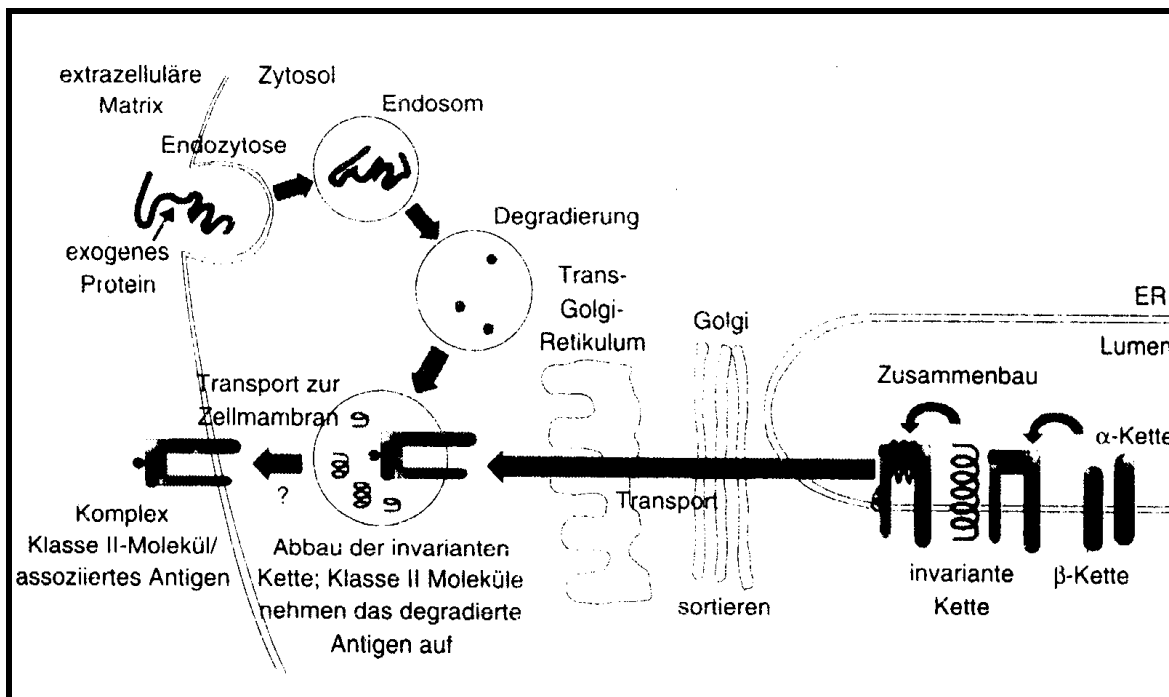


Abbildung 6: Mechanismen der Antigenengenerierung und -präsentation durch MHC-Moleküle der Klasse II (Schmoll et al.1996)

1.3.2 Das TCR Repertoire

Das individuelle T Zell-Rezeptor- (TZR) Repertoire wird durch eine Vielzahl verschiedener T-Lymphozyten repräsentiert, deren TZR eine unterschiedliche Spezifität aufweisen und mit einem bestimmten, von HLA Molekülen präsentierten, antigenen Epitop reagieren können. Die TZR Diversifizierung erfolgt durch TZR Genrearrangements während der Ontogenese. (*Snodgrass et al 1985; Chien et al 1987*). Jedes der vier TZR Gene, die für die beiden TZR Typen $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ kodieren, besteht aus mehreren genetischen Elementen (V(ariabel), D(iversity), J(oining) und C(onstant)) (*Davis et al 1995*). Die zufällige Kopplung der V, D und J Segmente mit der konstanten Genregion und die charakteristische Kombination von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ Ketten definiert die TZR Spezifität. Die Genrearrangements reflektieren die Struktur der hypervariablen TZR Bereiche, bei denen drei 'Complementarity-Determining Regions' (CDRs) abgegrenzt werden können (*Patten et al. 1984*). CDR1 und CDR2 werden ausschließlich durch die V-Gene kodiert, während die dazwischen liegende CDR1 und CDR2 verbindende CDR3 durch Kopplung der V-Segmente mit den D und J Fragmenten entsteht. Dies führt zu einer Konzentration der TZR Diversität auf dessen zentralen Bereich und einer relativen Konstanz der Randzonen (*Boniface et al 1995*).

Die HLA/Peptid-Komplexe bestimmen während der Ontogenese über das individuelle TZR-Repertoire. In der frühen Phase der Ontogenese wandern unreife T-Lymphozyten aus dem Knochenmark in den Thymus, wo das TZR Genrearrangement stattfindet und TZRn exprimiert werden. Während dieser Thymusphase der T-Zellreifung wird das individuelle TZR-Repertoire festgelegt, indem unreife T Zellen peptidtragenden Klasse I und Klasse II Molekülen ausgesetzt werden. Potentiell autoreaktive Zellen mit Rezeptoren, die zu stark mit diesen Komplexen interagieren, werden eliminiert. Diese klonale Deletion führt zur negativen Selektion autoreaktiver T Zellen und stellt die Basis für die Entwicklung der Toleranz gegenüber Selbst-Proteinen dar. T-Lymphozyten, die HLA-Moleküle in der Abwesenheit von Selbst-Peptiden erkennen, werden positiv selektioniert. Negative Selektion kann gegenüber allen Proteinen erfolgen, die im Thymus gebildet oder von ihm aus dem Blut aufgenommen werden können (*Boyd et al. 1991; Dembic et al. 1994*). Für Proteine, die nicht im Thymus präsentiert werden, findet keine klonale Deletion statt (*Gammonet al 1989; Imberti et al.*

1993). Für diese Proteine sind alternative Mechanismen zur Induktion einer peripheren Toleranz beschrieben worden (Moharan *et al* 1989). Die potentiell autoreaktiven T Zellen werden in diesem Fall jedoch nicht eliminiert, sondern nur inaktiviert. Diese Form der Inaktivierung ist an die ständige Anwesenheit des Antigens gebunden. Es gibt Hinweise, dass dieser Status der peripheren Toleranz über die Suppression CD4+ T Zellen durch CD8+ T Suppressor Zellen vermittelt wird. Die Präsentation des antigenen Peptids an die CD4+ T-Lymphozyten soll in diesen Fällen HLA-DQ restringiert sein (Salgame *et al.* 1991). Die Entstehung der immunologischen Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen ist somit an die individuelle HLA-Antigen-Ausstattung und deren Kapazität zur Präsentation antigenen Peptids gebunden. Toleranz kann nur gegenüber solchen Proteinen induziert werden, die als antigenes Peptid von den eigenen HLA-Molekülen präsentiert werden können. Umgekehrt kann eine spezifische Immunität gegenüber einem Fremdanigen nur dann entstehen, wenn das antigenes Peptid im Komplex mit dem individuellen HLA-Molekül keine Ähnlichkeit zu im Thymus präsentierten Selbst-Peptiden besitzt.

1.3.3 Allogene Erkennung der HLA Antigene

HLA Antigene spielen eine Schlüsselrolle für die Fähigkeit des Immunsystems, zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheiden zu können. Die Konsequenz dieser Leistung bedeutet zum einen, dass der Organismus vor invadierenden Fremdorganismen geschützt werden kann, aber zum anderen auch, dass allogene Transplantate abgestoßen werden. Die prinzipiellen Zielstrukturen der Immunantwort auf das allo-Transplantat sind die allo-genen HLA Moleküle selbst (Steinmuller 1985; Krensky *et al* 1990). Die T-Zellerkennung dieser HLA Antigene ist das erste und zentrale Ereignis, das die Organabstoßung einleitet. Es gilt als gesichert, dass das Ausmaß immunologischer Abstoßungsreaktionen gegen ein transplantiertes Organ deutlich vermindert ist, wenn eine höchstmögliche Übereinstimmung für die HLA-Antigene besteht. Das individuelle TZR Repertoire, das im Thymus positiv selektioniert worden ist, erkennt Fremdanigene als prozessierte Oligopeptide, die in der PBS der eigenen HLA Moleküle präsentiert werden (Davis *et al.* 1995). Diese Restriktion der T Zellen auf die

eigenen HLA Antigene steht der Beobachtung entgegen, dass ca. 1-10 % des normalen T Zell-Repertoires in der Lage ist, allogene HLA Moleküle zu erkennen (*Sherman et al 1993; Lombardi et al 1990*). Die bisher verfügbaren klinischen und experimentellen Daten liefern noch keine endgültige Erklärung für dieses Phänomen. Die Mechanismen der allogenen Erkennung sind daher zum Teil noch hypothetisch.

Nach derzeitigem Kenntnisstand existieren zwei Wege der allogenen Erkennung, die sich nicht notwendigerweise gegenseitig ausschließen und gleichzeitig oder versetzt ablaufen können (*Liu et al.1993*). Bei der sog. „direkten allogenen Erkennung“ reagieren T Lymphozyten mit den intakten HLA Molekülen des Spenders und lösen als CD8+ T Lymphozyten eine zytotoxische oder als CD4+ T Lymphozyten eine regulatorische Immunantwort aus. Bei der sog. „indirekten allogenen Erkennung“ reagieren CD4+ T Lymphozyten mit prozessierten HLA Molekülen des Spenders, die von HLA Klasse II Antigenen des Empfängers präsentiert werden und eine regulatorische Immunantwort durch Aktivierung spenderspezifischer, zytotoxischer T Lymphozyten oder B Zellen auslösen. Beide Modelle werden durch zahlreiche experimentelle Daten gestützt. Die indirekte Erkennung steht im Einklang mit der HLA Selbst-Restriktion der T Lymphozyten. Dieser Weg der allogenen Immunisierung soll vor allem bei der chronischen Transplantatabstoßung bedeutsam sein. Der Mechanismus der direkten Erkennung, der insbesondere für akute Abstoßungen verantwortlich sein soll, erfordert zusätzliche Erklärungen.

Nach Lechler und Mitarbeitern (*Lechler et al 1990; Lechler et al 1992; Warrens et al 1994*) ergeben sich zwei Möglichkeiten der direkten allogenen Erkennung. Im Falle einer Ähnlichkeit der mit dem TZR interagierenden Seitenketten der α -Helices zwischen Spender- und Empfänger- HLA Molekül, erkennen die T Zellen auf den allogenen HLA Antigenen spenderspezifische Peptide als fremd und initiieren eine Abstoßung. Die vom Spender präsentierten Peptide können Fragmente seiner eigenen HLA Moleküle sein. Im Falle von starken Unterschieden zwischen der spender- und empfängerseitigen TZR Bindungsstelle erkennen die T Zellen ausschließlich das allogene HLA Molekül unabhängig vom präsentierten Peptid als fremd. Die dreidimensionale Struktur des trimolekularen HLA/Peptid/TZR-

Komplexes konnte durch kristallographische Untersuchungen noch nicht dargestellt werden. Die exakten Kontaktstellen zwischen TZR und HLA Molekül sind daher bisher spekulativ, so dass eine peptidunabhängige TZR/HLA Interaktion nicht ausgeschlossen werden kann. Es gibt experimentelle Daten, nach denen alloreaktive T Zellen auch solche HLA Moleküle erkennen können, die kein Peptid präsentieren (*Elliott et al. 1990*). Die Analysen über die dreidimensionale Struktur der HLA Moleküle legen nahe, dass peptidlose Moleküle erheblichen Konformationsänderungen unterliegen, die Ziele alloreaktiver T Lymphozyten darstellen könnten. Die Bedeutung der Peptide bei der allogenen Erkennung wird auch durch Untersuchungen gestützt, die einen erheblichen Einfluss einzelner Aminosäureaustausche der β -Stränge der PBS auf die Erkennung durch zytotoxische T Zellklone aufzeigen (*Chattopadhyay et al. 1994; Nicholson et al. 1997*). In diesen Fällen können Reaktivitätsänderungen der T Zellen nur durch von den Peptiden verursachte Konformationsänderungen hervorgerufen worden sein.

Es scheint somit nach den meisten in vitro Daten sicher zu sein, dass natürlich prozessierte Peptide eine Hauptrolle bei der allogenen T Zellerkennung spielen. Dabei ist der direkte Weg vor allem für die zytotoxische T Zellantwort verantwortlich, die im allogenen HLA Molekül Peptide aus endogenen Donorproteinen einschließlich der HLA Antigene erkennt. Der indirekte Weg spricht die Funktion der regulatorischen CD4⁺ T Zellen an, die allogene Peptide aus donorspezifischen HLA Molekülen in selbst-restringierter Weise erkennen. Vor allem der indirekte Mechanismus kann die Abhängigkeit des Transplantationserfolges von der Übereinstimmung der Spender- und Empfänger HLA-Merkmale erklären. Wenn die von den allogenen HLA Molekülen präsentierten Peptide hauptsächlich aus diesen Molekülen selbst stammen, kann auch der Mechanismus der direkten Erkennung mit den klinischen Daten über den positiven Einfluss des HLA Matchings in Einklang gebracht werden.

1.4 Die Entwicklung der HLA-Typisierung

1.4.1 Die serologische HLA-Typisierung

Im Jahr 1901 entdeckte der Immunchemiker Karl Landsteiner die Blutgruppenantigene des ABO-Systems, so dass erstmals die Möglichkeit bestand, Blut ohne das Risiko einer hämolytischen Reaktion zu transfundieren (*Landsteiner et al. 1901*). Durch diesen Erfolg entstand die Hoffnung, dass durch Auffinden eines ähnlich komplexen Systems auch die Transplantation von Gewebe möglich sei. Die Probleme, die bei der Gewebetransplantation auftraten, erwiesen sich jedoch als wesentlich schwerwiegender; ein System, was die Gewebeverträglichkeit definierte, ließ sich lange nicht finden.

1936 entdeckte Gorer eine Gruppe von Antigenen, die er für die Toleranz von transplantiertem Tumorgewebe bei Mäusen verantwortlich machte. Auf Basis dieser als Antigen 2 bezeichneten Strukturen prägte Snell 1948 den Begriff Histocompatibility 2 (H2) - Antigene. Erste serologische Testmethoden zur Bestimmung der H2-Antigene wurden 1956 durch Gorer und O`Conner entwickelt (*Gorer et al. 1936; Snell et al. 1948*).

Vor dem Hintergrund dieser murinen Antigene wurden äquivalente Antigenensysteme auch bei anderen Spezies entdeckt. Das entsprechende humane System, der „human histocompatibility complex“ (MHC) wurde im Rahmen von Studien, in welchen J.Dausset, J.J. van Rood und R. Payne ein genetisch inherentes System von Alloantigenen beschrieben, entdeckt. Untersuchungen an multitransfundierten Patienten und schwangeren Frauen hatten gezeigt, dass diese häufig zirkulierende Antikörper gegen Alloantigene ausbildeten. Heute weiß man, dass diese die Produkte der MHC-Gene sind.

Im Anschluss an die Entdeckung des ersten Leukozyten-Alloantigens 1954 (*Dausset et al. 1954*), welches mit Mac (heute HLA-A2) bezeichnet wurde, konnten weitere Untersuchungen von Leukozyten Agglutinations-Mustern die Existenz von weiteren Antigenen zeigen, welche FOUR benannt wurden und zwei Allele zu haben schienen - 4a (heute Bw4) und 4b

(heute Bw6) (*van Rood et al. 1963; Payne et al. 1958*). 1964 wurde ein verwandtes System aus drei Allelen entdeckt, das LA-System. Wie sich zeigte, wurde in diesem System auch das Mac-Antigen genetisch verschlüsselt. Familienanalysen zeigten, dass die bekannten Systeme LA und FOUR gekoppelt auftraten (*Ceppellini et al. 1967*). Diese Systeme entsprechen den heutigen HLA-A und HLA-B Systemen. 1970 konnte mit Hilfe weiterer serologischer Untersuchungen erstmals die Existenz eines dritten Systems, zunächst mit AJ und heute als HLA-C bezeichnet, gezeigt werden (*Thorsby et al. 1970; Mayr et al. 1973*).

Die Antigene des HLA-A, B und C-Systems werden heute als HLA Klasse I Antigene bezeichnet und befinden sich auf der Oberfläche sämtlicher kernhaltiger Zellen.

Die heute üblichen serologischen Testmethoden zur Bestimmung der HLA-Antigene gehen auf den Mikrozytotoxizitätstest von Terasaki zurück. Hiermit lassen sich mit Hilfe spezifischer Antikörper die HLA Klasse I Antigene nachweisen (*Terasaki et al. 1964*).

Die Feststellung, dass es bei serologisch HLA-identischen Personen in einer gemischten Lymphozytenkultur (MLC) zu einer Stimulation kommen kann, brachte die Vermutung auf, dass es weitere antigene Strukturen geben muss, welche nur von Lymphozyten ausgeprägt werden.

Anhand von Familienuntersuchungen zeigte sich auch hier eine enge Koppelung an die klassischen HLA Gene, so dass dieses neue, nur auf Leukozyten exprimierte System von Antigenen als HLA-D bezeichnet wurde. Diese zweite Klasse der HLA-Antigene ließ sich zunächst durch homozygote Test-Zelllinien im Rahmen der MLC typisieren. Es zeigte sich, dass eine sehr hohe Anzahl von Allelen differenziert werden konnte. Den nächsten Schritt stellte die Entwicklung von spezifischen Testseren dar, welche die Klasse II Typisierung mit Hilfe des Terasaki Testes analog zur Klasse I Typisierung erlaubte. Später isolierte Antiseren erlaubten dann die Differenzierung von MLC Determinanten auf B-Lymphozyten und Monozyten. Diese wurden mit HLA-D related (HLA-DR) bezeichnet. Weitere serologische Untersuchungen führten zur Entdeckung der MB-Antigene (HLA-DQ). Als eine weitere zytotoxische Testmethode wurde der PLT (primed lymphocyte test) entwickelt. Beim PLT lysieren gegen spezifische Antigene vorsensibilisierte Zellen eines Testserums die mit diesen

Antigenen besetzten Zellen des zu untersuchenden Serums. Mit Hilfe dieses Testes konnte ein dritter HLA Klasse III Locus, HLA-SB (heute HLA-DP) identifiziert werden.

1.4.2 Molekulargenetische HLA Typisierung

Die konventionellen serologischen HLA-Typisierungsmethoden wurden insbesondere in der Routinediagnostik durch eine zu geringe Genauigkeit und Reliabilität beeinträchtigt (*Mytilineous et al. 1993; Yu et al. 1997; Lorentzen et al. 1997*).

Seit Einführen der PCR ergänzten molekulargenetische Methoden die serologischen Typisierungstechniken der HLA Klasse I und II Moleküle. Diese erlauben auch dort noch Differenzierungen der Genotypen, wo sich phänotypisch in vitro keine Unterschiede zeigen, während sie in vivo z.B. im Rahmen einer Knochenmarktransplantation von Bedeutung sein können. Mit der ansteigenden Zahl von verfügbaren Sequenzen für HLA Antigene haben inzwischen die molekulargenetischen Methoden insbesondere für Klasse II-Antigene die serologischen verdrängt.

Wie bereits beschrieben, liegt der Polymorphismus der HLA-Gene insbesondere in Unterschieden im Bereich von ein oder zwei Exons begründet. Aus diesem Grund werden im Rahmen der Analyse in der Regel zunächst diese Exons mit Hilfe der PCR amplifiziert. Anschließend folgt die eigentliche Typisierung mit Hilfe unterschiedlicher zur Verfügung stehender Methoden.

Die genutzten Methoden zur Sequenz-Analyse der amplifizierten DNA sind die Restriction Fragment Length Polimorphism Analyse (PCR-RFLP) (*Mizuki et al. 1992*), die Single Strand Conformation Polymorphism Analyse (PCR-SSCP) (*Hoshino et al. 1992*), die Heteroduplex Formation Analyse (PCR-HDF) (*Sorrentino et al. 1992*), die Sequence-specific Oligonucleotide Probing Analyse (PCR-SSOP) (*Saiki et al. 1989*), die Sequence-Specific Priming-Analyse (PCR-SSP) und die direkte Sequenzierung der genomischen DNA mit Hilfe der Sequence Based Typing Analyse (PCR-SBT) (*Kaneoka et al. 1991*). Für den

Routinegebrauch haben sich in den letzten Jahren die letzten drei genannten Methoden durchgesetzt (PCR-SSOP, PCR-SSP und PCR-SBT).

1.5 Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD)

Neben der Gefahr eines Krankheitsrezidives nach KMT und der Gefahr von unkontrollierbaren infektiösen Komplikationen stellt die GvHD eines der großen Risiken im Rahmen der HD-Chemotherapie mit anschließender KMT dar.

Die GvHD wird in eine akute, vor Tag 100 nach KMT beginnende und eine chronische, nach Tag 100 nach KMT beginnende Form unterteilt. Beide Formen werden durch alloreaktive zytotoxische T-Lymphozyten des Spenders hervorgerufen. Diese führen zu einer direkten Zytolyse der als fremd erkannten Zellen; weiterhin werden Zytokine freigesetzt, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Unterschieden werden jeweils verschiedene Schweregrade und Organmanifestationen .

1.5.1 Die akute GvHD

Die akute GvHD wird in vier Schweregrade (I-IV), jeweils an Haut, Leber und Darm unterteilt, wobei man ab Grad III von einer schweren GvHD spricht. Das Ausmaß der akuten GvHD korreliert sowohl mit der Immundefizienz und der Zunahme infektiöser Komplikationen, als auch mit der Mortalität nach KMT (*Meyers et al. 1986; Gratwohl et al. 1995*).

Das Risiko einer akuten GvHD liegt selbst bei Transplantation von Knochenmark eines HLA-identischen Spenders bei 20-80%. Retrospektive Analysen haben gezeigt, dass die akute GVHD der Grade II-IV bei 22% der Patienten nach HLA-identischer Transplantation mit Geschwisterspendern direkte oder indirekte Todesursache ist. Insbesondere erhöht sich bei Vorliegen einer akuten GVHD das Risiko einer CMV-Infektion. Weiterhin ist nach Auftreten einer akuten GVHD auch die Wahrscheinlichkeit für das spätere Auftreten einer chronischen

GVHD erhöht. Zusätzliche Risikofaktoren sind HLA-Mismatches, Abweichungen in Blutgruppe und Geschlecht, Alloimmunisierungen durch Transfusionen oder Schwangerschaft, der Allgemeinzustand des Patienten und ein positiver Cytomegalie-Status (*Gale et al. 1987; Link et al. 1997*).

Unabdingbar ist daher die medikamentöse Prophylaxe der GVHD. Die hierzu primär eingesetzten Medikamente sind Cyclosporin A und Kortikoide. Weiterhin kann die keimarme Isolation der Patienten und die antimikrobielle Darmdekontamination die GVHD-Inzidenz signifikant senken (*Beelen et al. 1992*). Durch die Depletion von T-Zellen kann zwar die Rate der schweren akuten GVHD deutlich reduziert werden, jedoch kommt es aufgrund der fehlenden immunkompetenten T-Lymphozyten zu einem signifikant erhöhten Risiko der Transplantat-Abstoßung und eines Krankheitsrezidivs (*Kolb et al. 1996*).

Die unterschiedlichen Risikofaktoren für das Entstehen einer GVHD machen die Interpretation der Ursachen im individuellen Fall schwierig.

Grad	Haut (bei histologisch gesicherter GVHD)	Leber	Darm
1	Makulopapulöses Exanthem, mehr als 25% der Körperoberfläche	GOT 150-750 IE/l und Bilirubin. 34-50µmol/l	Diarrhö mehr als 500 ml pro Tag
2	Makulopapulöses Exanthem, 20-50% der Körperoberfläche	bin 51 -100 µmol/l mit und ohne GOT-Anstieg	Diarrhöen 1000- 1500 ml pro Tag
3	Generalisierte Erythrodermie	bin 101 -255 µmol/l mit und ohne GOT-Anstieg	Diarrhöen über 1500 ml pro Tag
4	Generalisierte Erythrodermie mit Blasenbildung und Desquamation	Bilirubin über 255 µmol/l	Starke Bauchschmerzen mit und ohne Ileus

Tabelle 2: Akute GVHD; Schweregrad der Organbeteiligung (*Link et al. 1997*)

Grad	Haut	Leber	Darm	Klin. Allgemeinzustand
I	1-2	0	0	normal
II	1-3 oder	1 oder	1	leicht reduziert
III	2-3	2-3 oder	2-3	deutlich reduziert
IV	2-4 oder	2-4	2-4	sehr stark reduziert

Tabelle 3: Klinische Gesamtbeurteilung der akuten GVHD (Link et al. 1997)

1.5.2 Die chronische GvHD

Das Bild der chronischen GvHD gleicht dem Bild verschiedener Autoimmunerkrankungen. Es kommt hier zu einer Zerstörung exokriner Drüsen mit Sicca-Syndrom, weiterhin zu Hautveränderungen wie Vitiligo, Alopezie oder Nageldystrophie. In Spätformen gleicht die Erkrankung einer schweren Sklerodermie (Link et al. 1997). Ursächlich ist hier die fehlende Elimination von alloreaktiven T-Lymphozyten im Thymus. Diese T-Zellen reagieren mit Antigen determinanten der HLA Klasse II Moleküle, was wiederum über die Bildung von IL4 und INF γ die Kollagensynthese von Fibroblasten anregt (Ferrara et al. 1991). Weiterhin kommt es zu einer Immunsuppression durch eine Einschränkung der B-Zell-Proliferation, der Antikörperproduktion und der CD4-Helferzellfunktion. Bei der chronischen GvHD wird eine begrenzte und eine ausgedehnte Form unterschieden. Die Häufigkeit einer limitierten chronischen GvHD liegt bei 30-60%. HLA-Differenzen, höheres Patientenalter, die Konstellation von weiblichem Spender bei männlichem Empfänger und eine vorausgegangene akute GvHD erhöhen das Risiko signifikant (Ochs et al. 1994).

<p>I Begrenzte (limitierte) GVHD</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Lokalisierter Hautbefall und/oder 2. Leberdysfunktion durch cGVHD
<p>II Ausgedehnte chronische GVHD</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Generalisierter Hautbefall oder 2. Lokalisierter Hautbefall und/oder Leberdysfunktion durch cGVHD und zusätzlich <ol style="list-style-type: none"> a) Leberhistologie mit chronisch aggressiver Hepatitis oder brückenbildenden Nekrosen oder Zirrhose oder b) Augenbeteiligung: Im Schirmer Test weniger als 5 mm Befeuchtung oder c) Beteiligung der kleinen Speicheldrüsen oder der Mundschleimhaut, gesichert durch Lippenbiopsie oder d) Beteiligung eines anderen Zielorgans (Darm, Lunge)

Tabelle 4; Chronische GVHD, Gesamtbeurteilung (Link et al. 1997)

1.6 Die HLA-DP Antigene

1.6.1 Genorganisation und Aufbau der HLA-DP Antigene

Im Bereich des HLA-DP Genortes liegen die vier Gene HLA-DPB1, -DPB2, -DPA1 und HLA-DPA2, wobei es sich bei den Genen DPB2 und DPA2 um sog. Pseudogene handelt, also Gene, die nicht exprimiert werden. HLA-DPB1 kodiert die β -Kette der DP-Antigene, während -DPA1 die α -Kette kodiert. Der Polymorphismus der HLA-DP Antigene ist in erster Linie durch Unterschiede im Exon 2 der DPB1 Allele begründet; die DPA1 Gene sind bei sieben bekannten Allelen nur gering polymorph.

Für die HLA Klasse II DP-Antigene bestand lange nur die Möglichkeit einer groben Typisierung von 7 DPw Antigenen mittels PLT und MAILA (*monoclonal antibody-specific immobilisation of leukocyte antigens*), denn es ist nicht gelungen, spezifische Antikörper für einen Mikrozytotoxizitätstest zu entwickeln. Das Prinzip des MAILA besteht darin, dass Antigene aus lysierten Zellen isoliert, an ein Medium gebunden und dann durch monoklonale

Antikörper nach Art eines ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) nachgewiesen werden (*Müller-Eckhardt et al. 1990*).

Im Zuge der Entwicklung zu molekulargenetischen Methoden hin lassen sich nun auch die HLA-DP Antigene genau typisieren (*Buyse et al. 1993*).

Die im einzelnen verwendeten Methoden sind (s. auch 1.4.2):

- die PCR-SSP Methode, bei der der Genotyp durch eine Kombination sequenzspezifischer Primer anhand der Amplifikatbanden in der Gelelektrophorese bestimmt wird (*Gilchrist et al. 1998*),
- die PCR-SSO Methode, bei der sequenzspezifische Oligonukleotide mit amplifizierter DNA hybridisiert werden und die Hybridisierung mit einer Farbreaktion detektiert wird (*Buyse et al. 1993*),
- die PCR-RFLP Methode, bei der das PCR-Produkt mit spezifischen Endonukleasen geschnitten wird und das HLA-Muster dann anhand des Bandenmusters in der Elektrophorese ermittelt werden kann (*Ota et al. 1991*).

1.6.2 Bedeutung der HLA-DP Antigene

Im Gegensatz zu den HLA Klasse II DR und DQ Antigenen ist die Bedeutung der HLA-DP Antigene bisher relativ wenig untersucht worden. Ihre Bedeutung als Transplantationsantigene ist noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass DP-Moleküle als Restriktionselemente in der Antigenpräsentation wirken. Weiterhin wurden verschiedene Krankheiten auf Assoziationen mit bestimmten DPB1 Antigenen überprüft.

1.6.2.1 Assoziation von HLA-DP Antigenen mit Erkrankungen

Die Assoziation verschiedener HLA-Antigene mit Autoimmunkrankheiten ist seit langem bekannt. Seitdem Typisierungsmöglichkeiten für die DP-Antigene bestehen, haben verschiedene Arbeitsgruppen Krankheiten auf ihre Assoziation mit bestimmten DP-Antigenen

hin untersucht. Buyse et al. fanden eine stark erhöhte Häufigkeit von DPB1*0202 bei Patienten mit IDDM, führten diese jedoch auf die Kopplung an DRB1*0301 zurück, dessen erhöhtes relatives Risiko für Diabetes mellitus bekannt ist. Ob auch das DPB1*0202 eine pathogenetische Rolle spielt, blieb bislang unklar (*Buyse et al. 1993*).

Frühere, serologische Untersuchungen deuteten auf ein erhöhtes Risiko für Multiple Sklerose bei DPw2 und für juvenile rheumatische Arthritis (RA) bei DPw4 hin. Dies konnte jedoch mit molekulargenetischen Methoden nicht bestätigt werden (*Fugger et al. 1990*). Andere Arbeiten zeigten eine positive Assoziation von DPB1*0201 mit der RA und eine negative für DPB1*0301 und DPB1*1101 (*Carthy et al. 1995*). Demgegenüber steht eine Arbeit, die eine signifikante positive Assoziation von DPB1*0301 mit der seronegativen RA zeigen konnte (*Gao et al. 1991*).

Es konnte eine signifikante Assoziation von sowohl allergischem, als auch Aspirin-induziertem Asthma mit dem Fehlen des häufigsten HLA-DPB1*0401 Allel gezeigt werden (*Dekker et al. 1997*; *Caraballo et al. 1991*).

Bei einer Vielzahl weiterer Krankheiten konnte eine Assoziation mit bestimmten DP-Antigenen gefunden werden, z.B. Graves Disease mit DPB1*0501 (*Dong et al. 1992*), Myasthenia Gravis mit DPB1*0201 (*Horiki et al. 1993*), Primär biliärer Leberzirrhose mit DPB1*0301 (*Mella et al. 1995*) und Morbus Hodgkin mit DPB1*0301 (*Taylor et al. 1996*).

Signifikant war für Träger des Merkmals DPB1*0901 aus Taiwan und Japan ein erhöhtes Risiko für ein frühes Rezidiv bei Morbus Hodgkin (*Oza et al. 1994*).

Diese Vielzahl von Ergebnissen zeigt, dass trotz der geringen Expression der HLA DP Antigene eine immunologische Bedeutung besteht; für die klinische Praxis haben sich hieraus bislang keine Konsequenzen ergeben.

1.6.2.2 HLA-DPB1 und KMT

Mehrere Studien haben sich bereits mit dem Einfluss eines DPB1-Mismatches auf den Erfolg von Knochenmarktransplantationen und den Verlauf gemischter Lymphozytenkulturen (MLC) beschäftigt. Normura et al. stellten in ihrer Studie an 50 verwandten Spender/Empfängerpaaren fest, dass 75% ihrer Patienten, die ein isoliertes DPB1-Mismatch gegenüber ihrem Knochenmarkspender aufwiesen, an einer schweren GVHD erkrankten. In der komplett HLA-identischen Kontrollgruppe waren es nur 17% (Nomura et al. 1991). Zu einem anderen Ergebnis kommt die ähnliche Arbeit von Al-Daccak. Hier erkrankten 25% der HLA-identischen Empfänger an einer schweren GvHD, während keiner der DPB1-inkompatiblen Empfänger an einer GvHD erkrankt ist (al-Daccak et al. 1990).

Bei einer Untersuchung an nicht verwandten Spender/Empfängerpaaren kamen Petersdorf et al. 1993 zu dem Ergebnis, dass ein oder zwei genotypische HLA-DPB1 Mismatches zwar bei 78% der Spender/Empfängerpaare vorlagen, dass diese jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung einer GvHD hatten (Petersdorf et al. 1993). Eine Arbeit von Kato et al. mit gleicher Fragestellung kommt jedoch zu einem deutlich anderen Ergebnis. Hier ergab sich bei Untersuchungen an 22 Spender/Empfängerpaaren ein signifikant höheres GvHD-Risiko bei DPB1-Inkompatibilität (Kato et al. 1991). Eine aktuelle Studie von Petersdorf et al. konnte in einer Gruppe von 205 CML Patienten, die HLA -A, -B und -C sowie -DRB 1 und -DQB1 identischen Fremdspender transplantiert wurden, nach retrospektiver HLA-DPB1 Analyse eine signifikante Korrelation von GVHD III-IV° mit 2 DPB1 Mismatch zeigen (44% vs. 27%). Ein einzelnes HLA-DPB1 Mismatch zeigte keine erhöhte GVHD III-IV° Inzidenz (jeweils 27%). Eine signifikante Auswirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit hatten weder das Auftreten von einem noch von zwei HLA- DPB1 Mismatches (Petersdorf et al. 2001).

Im Rahmen der KMT sind bisher zwei Fälle beschrieben, in denen anhand von Lymphozyten-Funktionstests die Ausbildung einer akuten GvHD auf Basis der Reaktivität gegen ein DP Antigen ermittelt wurde (Gaschet et al. 1996; Gaschet et al. 1998).

Diese teilweise unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass der genaue Einfluss der HLA-DPB1 Antigene noch nicht geklärt werden konnte. Fest steht, dass DPB1-Inkompatibilität zu einer wesentlich schwächeren und verspäteten Stimulation in einer MLC führt als DR- oder DQ-Inkompatibilität (*Cesbron et al. 1990; Cesbron et al. 1993; Olerup et al. 1990*). Weiterhin ist bekannt, dass bereits geringe phänotypische Differenzen, insbesondere Glutamin an Position 69 zu einer Stimulation führen können (*Nicholson et al. 1997; Potoicchio et al. 1996*).

1.7 Ziel dieser Studie

1.7.1 Methodische Ziele

Die serologische HLA-DP Typisierung gehörte, wegen des enormen Aufwands und der geringen Aussagekraft, nicht zu den Routineuntersuchungen im Vorfeld einer KMT.

6 serologischen Phänotypen stehen 92 Genotypen gegenüber. Methodisches Ziel dieser Studie war daher die Etablierung einer molekulargenetischen Testmethode zur HLA-DPB1 Typisierung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiterhin eine molekulargenetische Reihenuntersuchung der HLA-DPB 1 Merkmale von durch Familienuntersuchungen als HLA-identisch getesteten Geschwisterpaaren, zwischen denen eine KMT geplant war oder bereits stattgefunden hatte, durchgeführt werden.

1.7.2 Klinische Ziele

Die Daten von Nomura et al. weisen darauf hin, dass die Zahl der HLA-DPB1 Abweichungen bei ansonsten HLA-identischen Geschwistern deutlich höher sei, als sie rein statistisch zu vermuten wäre und dass sich dadurch die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer schweren GVHD signifikant erhöhe (*Nomura et al. 1991*). Es wurde auf Basis dieser Daten vermutet, dass sich in der im Rahmen dieser Studie untersuchten chromosomalen Region ein sogenannter „recombination hotspot“ befindet und dies wiederum die Ursache für eine erhöhte crossing-over Rate und damit für Abweichung ansonsten HLA-identischer Geschwister in diesem Bereich sei.

Die genaue Bedeutung der HLA-DP Antigene im Rahmen einer Knochenmarktransplantation ist dennoch unklar. Die vorliegende Literatur spiegelt Ergebnisse wieder, die einerseits zwischen einer direkten Assoziation von DPB1 Abweichungen und der Ausbildung einer GVHD und andererseits der Belanglosigkeit solcher Abweichungen wechseln (*Nomura et al.*

1991; *al-Daccak et al.1990*). Lymphozyten-Funktionstests konnten in Einzelfällen zeigen, dass eine Immunreaktion im Rahmen einer GVHD HLA-DP-vermittelt sein kann. Klinische Fragestellung dieser Studie war, wie häufig HLA-DPB1 Unterschiede bei genotypisch identischen Geschwisterpaaren auftreten und inwieweit eine HLA-DPB1-Inkompatibilität in unserem Kollektiv mit einer erhöhten Inzidenz einer schweren GVHD einhergeht. Weiterhin sollte die Frage, ob eine HLA-DPB1 Inkompatibilität die Auswahl eines eventuellen Knochenmark-Spenders beeinflussen sollte bzw. ob eine HLA-DPB1 Analyse der ansonsten als genotypisch identisch ermittelten Geschwisterpaare sinnvoll ist, beantwortet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 DNA-Proben

Als Referenzmaterialien für die Etablierung der Methode wurden 36 Epstein-Barr-Virus-transformierte lymphoblastoide B-Zelllinien vom neunten und zehnten Histokompatibility Workshop verwendet. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Zelllinien und ihre HLA-DPB1 Merkmale.

Zelllinien	HLA-DPB1 Typ
1. Jesthom	0401,0201
2. WT100 BIS	0101,0201
3. SCHU	0402,01
4. MGAR	0401,01
5. AMA	0402,0301
6. KAS011	0401,1401
7. Ducaf	0202,-
8. COX	0301,-
9. VAVY	0101,-
10. Steinlin	0301,0401
11. PFG 4015	0101,0401
12. RSH	0101,0402
13. WTS1	02012,-
14. BSM	02012,-
15. YAR	0401,-
16. PE117	0401,-
17. JVM	02012,-
18. BM16	02012,-
19. HHKB	0401,-
20. TEM	0401,-
21. AMAL	0402,-
22. LBUF	1701,-
23. WIN	0401,1301
24. TAB089	0202,-
25. CGGB	1901,-
26. T04	0901,-
27. SAVC	1001,-
28. KAS116	1301,-
29. PLH	1501,-
30. LBUF	1701,-
31. DO208915	2301,-

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

2.2 Patientenkollektiv

Zur HLA-DPB1 Typisierung im Rahmen dieser Studie wurde die DNA von Patienten und ihren Geschwistern, die im Verlauf einer Knochenmarkspendersuche durch Familienuntersuchungen als HLA-A, B, C, DRB1 und DQB1 genotypisch identisch typisiert wurden, und damit für eine KMT in Frage kamen, verwendet. Die Entitäten, die zur Indikation für die Transplantation geführt haben, waren heterogen. Insgesamt standen für diese Studie 203 Proben von 91 Personen und ihren jeweils ein bis drei Geschwistern zur Verfügung.

2.3 DNA-Isolierung

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte aus Na₂EDTA-Vollblut oder lymphoblastoiden Zellkulturen durch Aussalzen nach Standardprotokollen von Miller oder Stern (*Miller et al. 1988; Stern et al. 1992*). Die Isolierung wurde mit dem Kit der Firma Super Quick Gene¹ oder Puregene² durchgeführt. Der DNA-Gehalt und die Proteinkontamination wurden bei allen DNA-Proben photometrisch als Absorption bei 260 nm bzw. 280 nm mit einem Absorptionsspektrometer gemessen und die A₂₆₀/A₂₈₀ Ratio bestimmt. Alle Proben wurden mit Aqua bidestillata auf eine DNA- Konzentration von 100 ng/μl eingestellt.

¹ Immucor, Roedermark, Deutschland

² Biozym, Oldendorf, Deutschland

2.4 PCR-Bedingungen

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt.

Die PCR-Reaktionslösung bestand aus:

- PCR-Puffer (1fach Puffer: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8,3, 0.01% Gelatine, 1,5mM MgCl₂)
- 1 unit Taq-Polymerase¹
- 200 μ M dATP, dCTP und dGTP
- 180 μ M dTTP und 20 μ M biotin-16-dUTP²
- 0,2 μ M Primer (Tabelle 6)

Bezeichnung	Sequenz	N	Tm	Specifität
DPBAMP-A 5'	5'GAG AGT GGC GCC TCC GCT CAT3'	21mer	70	HLA-DPB 1
DPBAMP-B 3'	5'GCC GGC CCA AAG CCC TCA CTC3'	21mer	72	Gen- spezifisch

Tabelle 6: Verwendete Primer

Das folgende Zyklus-Protokoll wurde auf dem Perkin-Elmer® System 9600 Thermocycler durchgeführt.

1. DNA Denaturierung bei 95 °C über 5 min
2. 30 Zyklen
 - a) Denaturation 30s bei 95°C
 - b) Annealing 30s bei 55°C und
 - c) Extension 30s bei 72°C

¹ Amplitaq® Hoffman la Roche, Basel, Schweiz

² Boehringer, Mannheim, Deutschland

2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Amplifikationsergebnisses wurde im Anschluss an die PCR eine Auftrennung in einem 2% Agarosegel durchgeführt.

Zusammensetzung des Agarosegels:

-2g Agarose

-10ml 0.5 facher TBE Puffer (50mM Tris, 45mM Borsäure, 0,5m EDTA)

-1,5 µl Etidiumbromid

-90 ml H₂O

Die Auftrennung erfolgte in einer Midi-Gelelektrophoresekammer über 10 min bei 100 V (80 mA). Die Banden wurden anschließend unter einer UV-Lampe visualisiert und photographisch dokumentiert.

2.6 PCR-SSO Reverse Dot Blot-Verfahren

Das Prinzip der Typisierung mittels PCR-Reverse Dot Blot Verfahrens beruht darauf, dass Oligonukleotide bekannter Sequenz, die auf Membranen gebunden sind, bei einer bestimmten Hybridisierungstemperatur mit einer DNA (biotinmarkiertem PCR-Produkt) inkubiert werden. Durch eine Farbreaktion werden anschließend die Oligonukleotide, bei denen es zu einer Hybridisierung mit dem PCR-Produkt gekommen ist, sichtbar gemacht. Anhand des Hybridisierungsmusters kann dann auf den Genotyp der untersuchten Sequenz geschlossen werden.

2.6.1 Oligonukleotide

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide repräsentierten die polymorphen Positionen der DPB1 Allele im Bereich des Exon 2.

2.6.1.1 Design

Das Design der Sonden wurde basierend auf publizierte Sequenzen modifiziert (*Buyse et al. 1993*). Die wesentliche Voraussetzung, die diese Oligonukleotide erfüllen mussten, um eine Typisierung im Reverse Dot Blot-Verfahren zu ermöglichen, war, dass sie unter den gleichen Hybridisierungsbedingungen mit ausreichender Sensitivität und Spezifität mit dem PCR-Produkt reagieren. Ein positives Hybridisierungsergebnis bedeutete also, dass die amplifizierte DNA in einer Region komplementär zum Oligonukleotid lokalisiert war. Tabelle 7 zeigt die Oligonukleotide, die verwendet wurden, ihre Position im Bereich des zweiten Exons und die von ihnen erkannten DPB1-Allele. Die zu detektierende polymorphe Position wurde mit dem mittleren Teil der Sonden abgedeckt.

Primer	Lokalisation	Sequenz von 5' zu 3'	Spezifität	hybr.T
RB01 DPB1	30-35	TAC AAC CGG CAG GAG TAC	1101,1501	61°C
RB02 DPB2	81-87	CGA GCT GGT CGG GCC CA	1801,1501	61°C
RB03 DPB3	53-58	GGC CTG AGG CGG AGT AT	0202,0501,1901,2101,2201,2401,3601	61°C
RB04 DPB5	73-79	CGG ACA GGA TAT GCA GAC	1301,1901	61°C
RB05 DPB6	32-37	GGG AGG AGC TCG TGC GC	0202,0501,2101,2201,3601	61°C
RB06 DPB8	55-60	GAT GAG GAC TAC TGG AAC	0301,0601,0901,1401,1701,2001,2901	61°C
RB07 DPB9	82-86	GAG CTG GGC GGG CC	0201,0202,0401,0402,2301,2401,3201	61°C
RB08 DPB10	7-12	ACG TGT ACC AGT TAC GG	0301,0601,1101,1301,2001,2101, 2601,2701,2501,2901,3601	61°C
RB09 DPB11	6-12	AAT TAC GTG CAC CAG TTA C	0901,1001,1401,1701	61°C
RB10 DPB12	62-68	AGA AGG ACC TCC TGG AGG	0301,0601,1101,1401,1501,2001,2501, 2901,3101	61°C
RB11 DPB14	33-38	AGG AGT ACG CGC GCT T	0101,1101,1301,1501,2601,2701	61°C
RB12 DPB15	66-72	GGA GGA GAA GCG GGC AG	0101,0301,0401,0402,0501,1401,1801, 2001,2301,2401,2501,2601,2701,3101, 3601	61°C
RB13 DPB16	54-59	CCT GAT GAG GAG TAC TGG	0201,0402,0801,1001,1601,1801,2501	61°C
RB14 DPB17	66-71	TGG AGG AGG AGC GGG CA	0201,0202,0601,0801,0901,1001,1301, 1601,1701,1901,2101,2201,2901,3201	61°C
RB15 DPB18	9-14	TTC CAG GGA CGG CAG GAA	0101(?),02012,0202,0401,0402,0801, 1501(?),1601,1801(?),1901,2201,2301, 2401,3101,3201	61°C
RB16 DPB19	73-79	CGG ACA GGG TAT GCA GAC	0101,0301,0801,0901,1001,1401,2501,2901	61°C
RB17 DPB20	73-79	CGG ACA GGA TGT GCA GAC	0201,0202,0401,0402,0601,1101,1501, 1601,1701,1801,2001,2101,2701,2201,2301, 2401,3101,3201	61°C
RB18 DPB21	83-88	CTG GAC GAG GCC GTG AC	0101,0301,0501,0601,0801,0901,2201, 1001,1101,1301,1401,1601,1701,2501,2901, 1901,2001,2101,2601,2701,3101,3601	61°C
RB19 DPB22	33-38	AGG AGT TCG CGC GCT TC	0401,2401,3101	61°C
RB20 DPB23	5-12	GAA TTA CCT TTT CCA GGG ACG	0201,0202,0401,0402,0501,0801,2201, 1601,1901,2301,2401,3101,3201	61°C
RB21 DPB24	62-68	AGA AGG ACA TCC TGG AGG	0101,0201,0202,0401,0402,0501,2201, 0801,0901,1001,1301,1601,1701,2301,2401, 1801,1901,2101,2601,2701,3201,3601	61°C
RB22 DPB25	53-58	GGC CTG CTG CGG AGT AC	0101,0401,1101,1301,1501,2601, 2701,2301,3101	61°C
RB23 DPB26	33-38	GAG GAG TTC GTG CGC TT	0201,0301,0402,0601,0801,0901,2301, 1001,1401,1601,1701,1801,1901,2501, 2001,2901,3201	61°C

Tabelle 7: Verwendete Oligonucleotide

2.6.1.2 Synthese der poly dT-tails

Zur Durchführung der Hybridisierung wurden die Oligonukleotide an Nylon-Membranen gebunden. Um eine Bindung zu ermöglichen, wurden lange Thymidin-Triphosphat-Ketten ("poly T-tails") enzymatisch an die Oligonukleotid-Sonden synthetisiert.

Im einzelnen wurden dazu 200 pmol SSO in einem Ansatz gelöst mit:

- 100mM NaCacodyl,
- 1mM CoCl₂,
- 0,1mM Dithiothreitol,
- 80mmol dTTP,
- 80 units terminale Desoxynukleotidyltransferase,
- 300pmol SSO.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10mM EDTA gestoppt. Auf diese Weise wurden Ketten von ungefähr 400 dTTPs an die SSOs synthetisiert.

2.6.1.3 Crosslinking der Oligonucleotide mit Nylonmembranstreifen

Nach Auftropfen der SSOs und anschließender UV-Bestrahlung kam es zur kovalenten Bindung der Oligonukleotide an die Membranen. Diese Bindung erfolgte wegen der relativ größeren Länge der poly T-tails (ca. 400 Basen) bei einer wesentlich größeren Anzahl der Nukleotide nicht im sequenzspezifischen Teil (ca. 20 Basen), so dass dieser für die Hybridisierung frei blieb. Die von uns verwendeten Membranen wurden zunächst im Labor hergestellt und konnten später kommerziell erworben werden (Fa. Innogenetics, Leuven, Belgien).

2.6.2 Hybridisierung

Das PCR-Produkt wurde mit Denaturierungs-Lösung (400mM NaOH/10mM EDTA-Gemisch) über 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und damit denaturiert, d.h. in Einzelstränge getrennt. Hiervon wurden 10µl mit 2ml Hybridisierungslösung bei 56°C zu den Membranen in einzelne Hybridisierungsschalen gegeben. Da bei zu hoher Temperatur die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Ausbildung der Bindungen kommt, zunimmt, was eine Abnahme der Sensitivität zur Folge hätte, musste diese Temperatur exakt eingehalten werden. Demgegenüber kann es bei zu niedriger Temperatur auch im Bereich nicht genau komplementärer Sequenzen zu einer Hybridisierung kommen, womit die Spezifität der Typisierung reduziert würde. Die Hybridisierungsdauer betrug 30 min unter stetiger Agitation der Hybridisierungsschalen im gewärmten Wasserbad.

2.6.3 Waschen

Zum Entfernen nicht gebundener DNA wurde zunächst die gesamte Flüssigkeit aus den Hybridisierungsschalen abgesaugt und die Membranen wurden mit Wasch-Puffer (2fach SSPE/0,1%SDS) gespült. Nach weiterer Inkubation bei 56°C für 10 min mit Wasch-Puffer folgte zweimaliges Spülen mit Spül-Lösung (PBS: 58mM Na₂HPO₄, 17mM NaH₂PO₂, 68mM NaCl) bei Raumtemperatur.

2.6.4 Detektion positiver Signale

Nach Absaugen der Lösung wurde die Konjugationslösung hinzugegeben, die an Streptavidin gebundene alkalische Phosphatase (AP) enthielt. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur konnte sich das Streptavidin mit der AP an das biotin-16-dUTP im PCR-Produkt binden. Nach drei weiteren Waschgängen, zweimal mit Spül-Puffer und einmal mit Substrat-Puffer (50mM NaHCO₂, 1mM MgCl₂, pH9,5), folgte die Zugabe der

Substrat-Lösung BCIP\NBT (Bromchlorindolphosphat und Nitroblue-tetrazolium in Dimethylformamide) mit anschließender Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das Substrat konnte nun von der AP umgesetzt werden, wodurch wiederum eine direkte Farbreaktion hervorgerufen wurde.

2.6.5 Interpretation

Zur Interpretation konnten die positiven Signale mit Hilfe einer Schablone abgelesen werden. Die Ermittlung der vorliegenden DPB1 Allele konnte mit Hilfe einer Tabelle, welche die Sequenzen sämtlicher polymorpher Positionen den verschiedenen Allelen zuordnet, durchgeführt werden.

3. ERGEBNISSE

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Typisierungsmethode wurde anhand von Testzelllinien auf ihre Sensitivität und Spezifität überprüft. Im weiteren erfolgte unter Nutzung vorgefertigter, kommerziell erhältlicher Membranen die Untersuchung von Patientenmaterialien.

3.1.1 PCR Amplifikation

Die PCR Amplifikation hat bis auf vier Ausnahmen in sämtlichen Fällen im ersten Ansatz zu eindeutig abgrenzbaren Banden geführt, so dass die weitere Analyse erfolgen konnte. In den Fällen, wo zunächst keine Banden abgrenzbar waren, wurde das erhaltene Substrat einer erneuten PCR zugeführt.

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese des PCR-Produktes von 5 Spender/Empfängerkombinationen. Ein positives Amplifikationsergebnis stellt sich als deutlich abgrenzbare helle Bande dar. Die hier teilweise sichtbaren unscharf begrenzten Aufhellungen oberhalb der eigentlichen Bande werden von Primern erzeugt, die nicht verbraucht wurden. Ein optimales Amplifikationsergebnis zeigt sich z.B. in den Reihen 1 und 2. Die Banden sind sehr deutlich zu sehen; Artefakte durch DNA oder Primer liegen nicht vor.

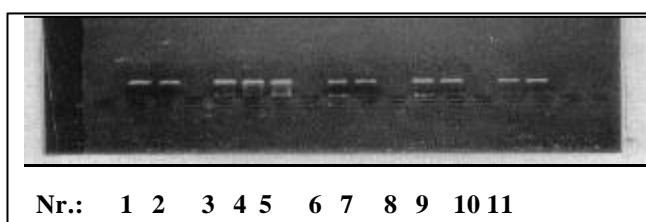


Abbildung 7: Gelelektrophorese

3.1.2 Hybridisierung

Die Hybridisierung führte in sämtlichen Fällen zu eindeutigen Signalen.

In Abbildung 8 ist das Typisierungsergebnis zweier Patienten mit den Membranen der Fa. Inno abgebildet. Nach dem Ablesen der positiven u. negativen Oligonukleotide wurde der Genotyp mit Hilfe einer Tabelle ermittelt.

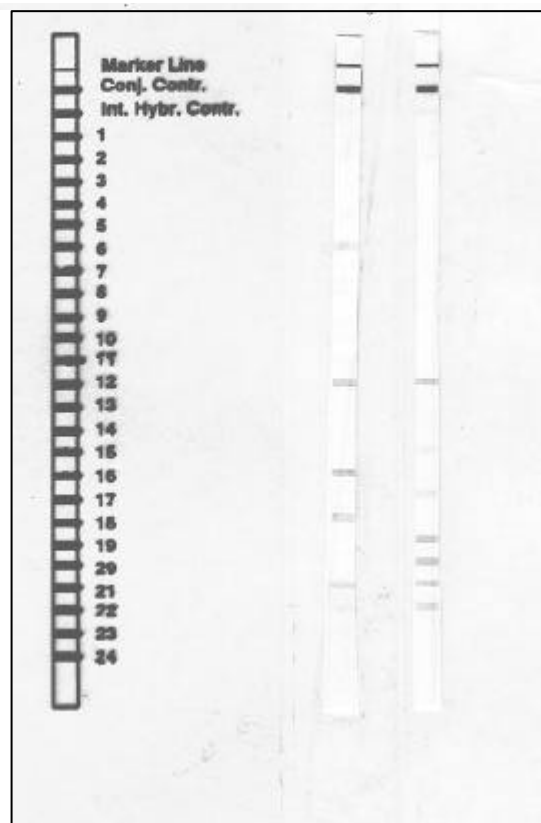


Abbildung 7: Membranstreifen

3.2. Patientenproben

203 DNA Proben von 91 Patienten und ihren 1-3 serologisch HLA-identischen Geschwistern, zwischen denen eine Knochenmarktransplantation stattgefunden hatte oder geplant war, wurde auf ihre Kompatibilität bezüglich der HLA-DPB1 Antigene überprüft. In dem einzigen aufgetretenen Fall einer Abweichungen am DPB1 Genort wurden mögliche Gründe anhand der Familientypisierung erschlossen. Weiterhin wurden die Häufigkeiten der einzelnen DPB1-Allele in der untersuchten Gruppe errechnet und zusammengestellt.

3.2.1 Allelhäufigkeiten

Tabelle 7 zeigt die Häufigkeiten, der in der von uns untersuchten Gruppe aufgetretenen HLA-DPB1 Subtypen und die Häufigkeiten des homozygoten Auftretens einzelner Allele.

HLA-DPB1-TYP	ANZAHL	HÄUFIGKEIT	HOMOZYGOT
0101	18	9,4%	1
0201	28	14,6%	
0202	2	1%	
0301	20	10,4%	3
0401	79	41%	17
0402	20	10,4%	
0501	2	1%	
0601	2	1%	1
0901	1	0,5%	
1001	1	0,5%	
1101	2	1%	
1301	5	2,5%	
1401	5	2,5%	
1501	3	1,6%	
1601	2	1%	
1701	2	1%	
1901	1	0,5%	

Tabelle 7: Häufigkeiten der aufgetretenen Subtypen

3.2.1 HLA-DPB1 Inkompatibilität

Bei 90 der 91 im Rahmen dieser Studie untersuchten Geschwisterpaare konnte eine Identität auch für den DPB1 Genort festgestellt werden. Somit kann bei diesen 90 Paaren von einer kompletten genotypischen Identität im Bereich des MHC-Komplexes ausgegangen werden. Bei lediglich einem der Geschwisterpaare wurde im Rahmen dieser Studie ein HLA-DPB1 Mismatch gefunden.

Durch Typisierung der Kernfamilie konnte die Segregation der Haplotypen nachvollzogen und somit die Ursache des HLA-DPB1-Mismatches für diesen Fall geklärt werden.

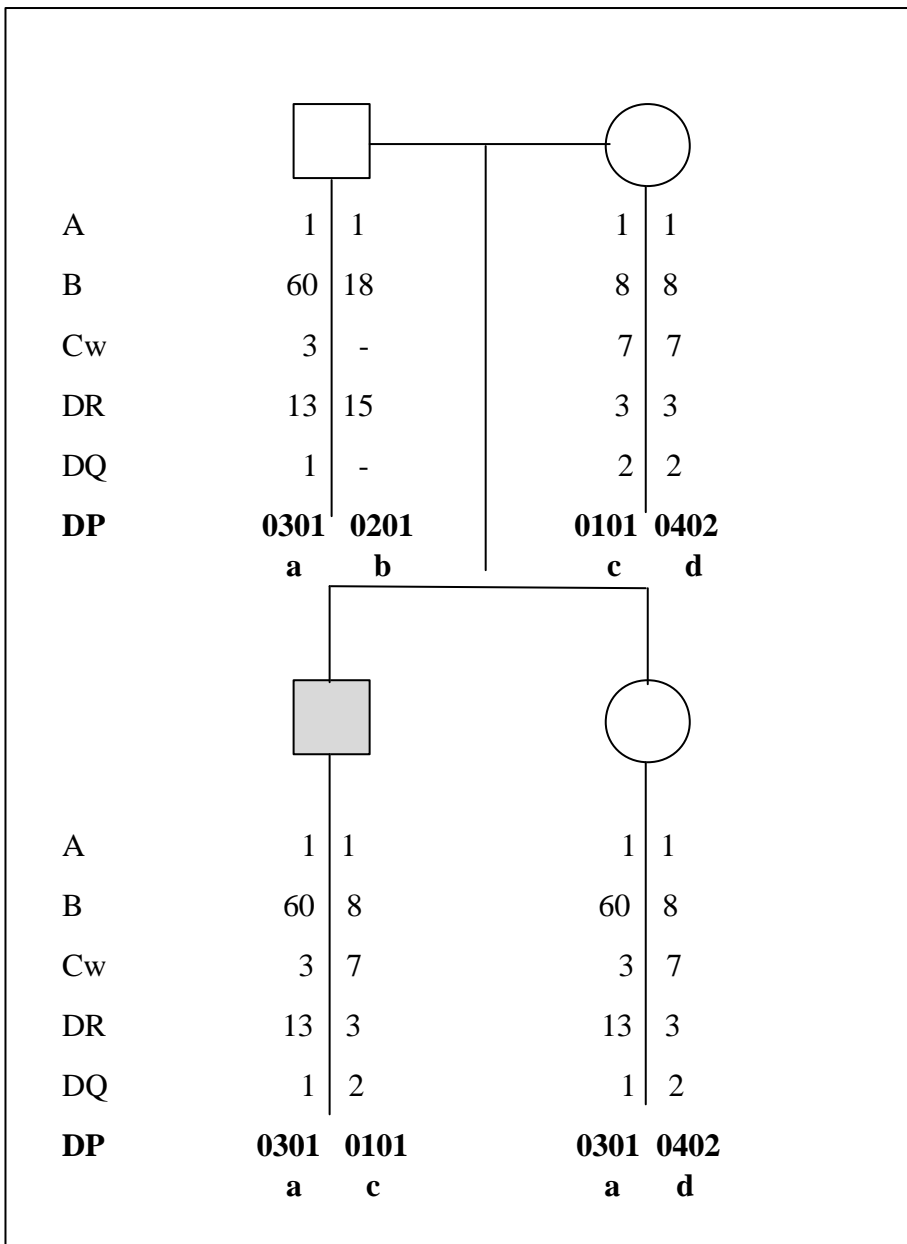


Abbildung 8: Familienstammbaum

Der Patient und seine Schwester zeigen eine genotypische Identität für alle getesteten Merkmale, bis auf ein HLA-DPB1 0101 vs. 0402 Mismatch.

Anhand des Stammbaumes wird deutlich, dass diese Konstellation durch die unterschiedliche Haplotypen-Segregation der mütterlichen Chromosomen hervorgerufen wurde. Die Mutter ist

für alle getesteten Merkmale bis auf das DPB1 Merkmal homozygot. Nur anhand der DPB1 Typisierung zeigt sich, dass keine komplette genotypische Identität vorliegt. Unabhängig von der HLA DPB1 Inkompatibilität ist es im weiteren Verlauf in diesem Fall keine Transplantation durchgeführt worden.

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung der molekulargenetischen HLA-Typisierung

Der hohe Kosten- und Arbeitsaufwand für molekulargenetische HLA-Typisierungen wird auf Basis der Ergebnisse verschiedener Studien gerechtfertigt, welche einen direkten Einfluss der HLA-Übereinstimmung zwischen KM-Spender und -Empfänger sowohl auf die Ausbildung einer akuten GvHD, als auch auf die Knochenmarkfunktion nach KMT aufzeigen konnten (*Ottinger et al. 1997; Link et al. 1997*).

Mit Einführung molekulargenetischer Methoden wurden die Möglichkeiten der Diagnostik aller heute als relevant betrachteten HLA-Antigene entscheidend verbessert. Die klinische Bedeutung liegt heute im Schwerpunkt bei der genauen Subtypisierung der HLA-DRB1 und -DQB1 Gene, welche eine Grundvoraussetzung für eine Knochenmark-Fremdspendersuche darstellt (*Ottinger et al. 1997*). Weiterhin bedeutend ist die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der molekulargenetischen Untersuchung bei der Abgrenzung auf serologischer Ebene schwer zu differenzierenden Klasse I und II Antigene. Die Fehlerquote der serologischen Untersuchungsmethoden gilt mit bis zu 25% als sehr hoch (*Mytilineos et al. 1993; Yu et al. 1997; Lorentzen et al. 1997*).

4.2 Bedeutung der HLA-DP Untersuchung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein molekulargenetisches HLA-DPB1 Untersuchungsverfahren, das PCR-SSO Reverse-Dot-Blot-Verfahren, etabliert und in die Routinediagnostik eingeführt (*Blasczyk et al. 1994*).

Die genaue Bestimmung der HLA-DPB1 Merkmale war vor der Einführung molekulargenetischer Methoden nicht möglich. Lediglich 6 DPB1 Antigene konnten bei hohem Aufwand mit dem einzigen gängigen Verfahren, dem PLT, unterschieden werden. Im

Gegensatz dazu können mit molekulargenetischen Methoden aktuell mehr als 92 Merkmale unterschieden werden. Neben der von uns angewandten Methode gibt es mehrere Alternativen, eine molekulargenetische DPB1 Analyse durchzuführen. Die gängigen Methoden unterscheiden sich neben ihren Funktionsprinzipien vor allem durch den jeweiligen Arbeits- und Kostenaufwand.

Die genaueste, gleichzeitig aber auch aufwendigste Methode ist die Sequenzierung des DPB1 Genortes. Im Vergleich zu den übrigen genannten Methoden eignet sich diese zum Auffinden nicht beschriebener DPB1 Merkmale und zur Analyse von heterozygoten Kombinationen, die aufgrund von Sequenzüberlappungen mit den übrigen Methoden nicht eindeutig differenziert werden können. Bei Anwendung in der Routinediagnostik ist diese Methode jedoch sehr arbeits- und kostenintensiv (*Hyldig-Nielsen et al. 1987*).

Die zuerst genutzte molekulargenetische Methode ist die RFLP (*Begovich et al. 1992*). Die Interpretation der Ergebnisse einer RFLP-Analyse ist jedoch den eindeutigeren Ergebnissen einer PCR-SSO und einer PCR-SSP unterlegen. Die PCR-SSP- (*Gilchrist et al. 1998*) wie auch die PCR-SSO-Methode (*Buyse et al. 1993*) ermöglicht den direkten Nachweis polymorpher Genabschnitte mit Hilfe sequenzspezifischer Oligonukleotide. Bezüglich der Analyse der momentan bekannten Allele und Auflösung der heterozygoten Kombinationen unterscheiden sich die Verfahren jedoch nicht wesentlich.

Die von uns verwendete PCR-SSO Methode ermöglicht es, eine größere Menge von Proben gleichzeitig zu verarbeiten. Die hierfür benötigte Menge an DNA ist deutlich geringer als bei den alternativen Methoden.

4.3 HLA-DPB1 Mismatches

Ergebnisse mehrerer Arbeiten deuteten auf eine "crossing-over"-Rate von bis zu 2,7% pro meiotischer Teilung zwischen dem HLA-DPB1 Genort und den übrigen HLA Klasse II

Genorten hin. Dies würde eine HLA-DPB1 Inkompatibilität von 10,8% bei für die übrigen Merkmale genotypisch identischen Geschwistern bedeuten. (Nomura et al. 1991).

Eine Analyse in 39 CEPH (Centre d'Étude du Polymorphisme Humain)-Familien mit der PCR-SSO Technik ergab eine Rekombinationsrate von 0,8% (Begovich et al. 1992). Bei einer Rekombinationsrate von 0,8% pro meiotischer Teilung kann man auf Basis dieser Daten mit einer Inkompatibilität bei 3,2% der DR/DQ-identischen Geschwisterpaare rechnen. Diese Rekombinationsrate würde der rechnerischen Wahrscheinlichkeit einer Rekombination bei einer Entfernung von 0,9cM zwischen DRB1 und DPB1 in etwa entsprechen.

Ziel dieser Arbeit war die molekularbiologische Analyse des DPB1 Merkmals bei ansonsten als komplett HLA-identisch getesteten Geschwistern, um die in diesem Kollektiv vorliegende Rekombinationsrate zu bestimmen. Weiterhin sollten eventuelle Auswirkungen eines HLA-DPB1 Mismatches auf den Verlauf der Krankengeschichte der betroffenen Patienten überprüft werden.

Die Ergebnisse von Studien, in denen Mismatch-Konstellationen gefunden worden sind, widersprechen sich (Nomura et al. 1991; al-Daccak et al. 1990; Pawelec et al. 1986).

Al-Daccak et al. haben mit Hilfe der RFLP-Methode 27 Spender/Empfängerpaare im Hinblick auf ihre DPB1 Kompatibilität überprüft und in drei Fällen Inkompatibilitäten detektieren können. Untersuchungen des Krankheitsverlaufes nach KMT zeigten, dass die DPB1-Mismatch-Konstellation in keinem Fall zu einer GvHD \geq Grad II führte. In sieben der gematchten Fälle traten diese jedoch auf.

Nomura et al. fanden in einer Gruppe von 46 Spender -Empfängerpaaren, unter Verwendung der RFLP, fünf Inkompatibilitäten. Hier trat in drei der vier auswertbaren Fälle eine GvHD \geq Grad II auf (75%). Im Gegensatz dazu war die Häufigkeit einer GvHD \geq II bei den DPB1-kompatiblen Paaren mit 7 von 41 (17%) deutlich niedriger.

In einer Studie von Pawelek et al. wurde die DP-Typisierung mit Hilfe des PLT durchgeführt. Hier fanden sich in einer Gruppe von 35 Spender/Empfängerpaaren zwei Fälle von Inkompatibilität, die aber in der weiteren Analyse in keinen Zusammenhang mit der Ausbildung einer GvHD gebracht werden konnten.

Petersdorf et al. konnten in einer Studie von 1993 zu isolierten Mismatches im DPB1 Bereich im Rahmen von Knochenmarktransplantationen zwischen 129 nicht verwandten Spender-Empfängerpaaren keine Auswirkungen der Mismatches ermitteln (*Petersdorf et al. 1993*). Diesen Daten widerspricht hingegen eine Studie von Kato et al. Hier kam es zur Ausbildung einer GvHD III-IV Grades bei 11 von 11 (100%) HLA-DP Mismatch Konstellationen, jedoch nur bei 5 von 11 (45%) der HLA-DP kompatiblen Spender/Empfänger-Paare (*Kato et al. 1991*). Eine aktuelle Studie wiederum von Petersdorf et.al. analysierte im Rahmen der Fremdspender-Transplantation von 205 CML Patienten die Auswirkungen von einem bzw. zwei DPB1 Mismatches; es zeigte sich ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten einer GVHD III-IV° bei Patienten mit zwei Mismatches, während das Gesamtüberleben dieser Patienten nur tendenziell schlechter war. Bei Patienten mit nur einem DPB1 Mismatch zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf GVHD und Überleben im Vergleich zu kompatiblen Patienten (*Petersdorf et. al. 2000*).

In unserer Studie jedoch zeigte sich, dass von den untersuchten 91 Patienten 90 auch im Bereich des HLA-DPB1 Genortes mit ihren Geschwistern übereinstimmten. Die einzige Abweichung, die detektiert werden konnte, lies sich anhand der Familientypisierung durch die Homozygotie der Mutter für alle relevanten HLA-Merkmale bis auf das DPB1-Merkmal erklären. In diesem Fall zeigte sich, dass die Mutter mit HLA-A1, B8, Cw7, DR3 und DQ2 in sämtlichen untersuchten Merkmalen die Allele mit der größten Häufigkeit in der kaukasischen Population aufwies. Unabhängig von der HLA DPB1 Inkompatibilität ist es im weiteren Verlauf in diesem Fall keine Transplantation durchgeführt worden.

Klinische Auswirkungen von Mismatches im DPB1 Bereich konnten somit nicht ermittelt werden.

Bei den vielfältigen Einflussgrößen auf die Ausbildung einer GvHD lässt sich die genaue Rolle der HLA-DP Antigene auf Basis der aktuellen Datenlage nicht endgültig klären.

Insbesondere eine Arbeit von Theobald et al. zeigt auf, dass trotz DP-Mismatch "minor histocompatibility antigens" im Vordergrund stehen können. Hier wurden T-Zell Populationen identifiziert, die eine GvHD auslösten, jedoch nicht gegen das inkompatible DP-Antigen gerichtet waren (*Theobald et al. 1993*).

Dem gegenüberzustellen sind, wie von Gaschet et al. publiziert, zwei klinische Fälle von Knochenmarkempfängern, die, bei ansonsten kompletter Kompatibilität, ein DPB1-Mismatch mit ihren Knochenmark-Fremdspendern aufwiesen und bei denen im Rahmen einer schweren GvHD direkt gegen das fremde DPB1 Merkmal gerichtete Lymphozyten nachgewiesen werden konnten (*Gaschet et al. 1996; Gaschet et al. 1998*).

Die zur Zeit aktuellste klinische Studie konnte, wie bereits erwähnt, zeigen, dass beim Vorliegen von zwei DPB1 Mismatches ein signifikant höheres Risiko zur Entwicklung einer GVHD besteht als bei einem oder keinem Mismatch. Dieses erlaubt zur Frage nach dem Stellenwert der DP Antigene lediglich die Aussage, dass eine Konstellation von zwei Mismatches im DPB1 Bereich nach Möglichkeit vermieden werden sollten (*Petersdorf et al. 2000*).

Abschließend lässt sich sagen, dass bei kontroverser Datenlage die Frage nach der klinischen Relevanz von DP-Mismatch-Konstellationen nicht endgültig beantwortet werden kann. Bei einer rechnerischen Wahrscheinlichkeit von <0.001% für das Vorliegen von 2 Mismatches im DP Bereich bei sonst als HLA identisch getesteten Geschwistern erscheint die Untersuchung von HLA DPB1 zumindest im Rahmen der Familientypisierung nicht sinnvoll.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bedeutung der HLA-DP Antigene als Transplantationsantigene im Rahmen der HD-Chemotherapie mit anschließender allogener Stammzelltransplantation gibt es bisher nur wenige Studien. Bei teilweise sehr geringen Fallzahlen sind die Ergebnisse dieser Arbeiten sowohl im Rahmen der Familien-, als auch der Fremdsponder-Transplantation widersprüchlich.

Die Möglichkeiten der serologischen HLA-DP Typisierung sind sehr beschränkt; lediglich 6 Phänotypen lassen sich so bestimmen. Demgegenüber stehen aktuell 92 HLA-DPB1 Allele, die sich mit molekulargenetischen Untersuchungen unterscheiden lassen.

Die rechnerische Wahrscheinlichkeit einer Rekombination (crossing over) zwischen HLA-DRB1 und-DPB1 im Verlauf einer meiotischen Teilung liegt bei einer Entfernung von 0,9 Millionen Basenpaaren (=0,9cM), bei 0,9%. Demgegenüber ergaben frühere Untersuchungen zur Auswirkung einer DPB1 Inkompatibilität im Rahmen der allogenen KMT bei HLA-A und B (KlasseI) und DRB1 und DQB1 (KlasseII) identischen Geschwistern eine Rekombinationsrate von bis zu 2,7%. Eine Rekombinationsrate von 2,7% würde wiederum rechnerisch zu einer Inkompatibilität in 10,8% der Fälle führen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der molekulargenetischen Analyse der HLA-DPB1 Merkmale von Geschwisterpaaren, zwischen denen eine allogene Knochenmarktransplantation durchgeführt wurde bzw. geplant war und die im Rahmen der im Vorfeld durchgeführten Familienuntersuchungen als HLA identisch getestet wurden.

Für diese Arbeit und die weitere Routinediagnostik wurde das PCR-SSO Reverse Dot Blot-Verfahren etabliert und an bekannten Testzelllinien geprüft. Anschließend erfolgte die Typisierung von 203 Proben von 91 Patienten und deren 1-3 Geschwistern.

Ziel dieser Untersuchungen sollte zum einen die Bestimmung der Häufigkeit von HLA-Inkompatibilität in unserem Kollektiv und zum anderen eine Korrelation zwischen eventueller DPB1 Inkompatibilität und dem Verlauf einer Knochenmarktransplantation sein.

Anhand der Ergebnisse wurden die Häufigkeitsverteilung der HLA-DPB1 Allele berechnet und Abweichungen zwischen Geschwistern gesucht. Von den 91 Patienten zeigte sich lediglich in einem Fall eine Inkompatibilität mit dem potentiellen Knochenmarkspender. Die weitere Segregationsanalysen ergaben jedoch, dass diese nicht auf eine Rekombination, sondern auf eine unterschiedliche Verteilung der Haplotypen bei HLA A, B, DRB1 und DQB1 homozygoter jedoch DPB1 heterozygoter Mutter zurückzuführen war. Unabhängig von der HLA DPB1 Inkompatibilität ist es im weiteren Verlauf in diesem Fall keine Transplantation durchgeführt worden.

Anhand des untersuchten Patientenkollektives konnte eine gegenüber der rechnerisch erwarteten erhöhte Rekombinationsrate zwischen HLA-DRB1 und -DPB1 nicht bestätigt werden. Die molekulargenetische HLA-DPB1 Diagnostik bei als HLA genotypisch identisch identifizierten Geschwisterpaaren ist somit nicht sinnvoll.

LITERATUR

Bücher:

1. Bender, K. (1989) Das HLA-System, Vol. 5: Biotest Diagnostics
2. Janeway CA, T. P. (1995) Immunologie, Vol. 1: Spektrum Akademischer Verlag
3. Schmoll HJ, H. K., Possinger K(Hrsg.) (1996) Kompendium Internistischer Onkologie: Springer Verlag

Originalliteratur:

1. al-Daccak, R., Loiseau, P., Soulie, A., Varrin, F., Rabian, C., Raffoux, C., Cohen, D., Degos, L., Gluckman, E., and Colombani, J. (1990) HLA-DP genotyping in HLA-A,B, and DR identical intrafamilial bone marrow transplantation, *Leukemia*. 4: 222-226
2. Arnaiz-Villena, A.(1993) MHC research: fast forward, *Immunol Today*. 14: 3-5
3. Begovich, A. M., GR. Suraj, VC. Helmuth, RC. Bugawan, TL. Erlich, HA. Klitz, W. (1992) Polymorphism, Recombination, and linkage disequilibrium within the HLA Class II Region, *J.Immunol*. 148: 249-258
4. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*: 329: 506-512
5. Boniface JJ, Davis MM.(1995)T-cell recognition of antigen. A process controlled by transient intermolecular interactions. *Ann N Y Acad Sci*: 766: 62-69
6. Boyd RL, Hugo P. (1991) Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol Today*: 12: 71-79
7. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. (1993) Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*: 364: 33-39

8. Buyse, I., Decorte R, Baens M, Cuppens H, Semana G, Edmonds MP, Marynen P, and JJ, C. (1993) Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dotplot hybridization, *Tissue antigens*. 41: 1-14
9. Cambell RD, T. J. (1993) Map of the human MHC, *Immunologie Today*. 14: 349-352
10. Caraballo, L., Marrugo, J., Jimenez, S., Angelini, G., and Ferrara, G. B.(1991) Frequency of DPB1*0401 is significantly decreased in patients with allergic asthma in a mulatto population, *Hum Immunol*. 32: 157-161
11. Carthy, D., MacGregor, A., Awomoi, A., Rigby, A. S., Thomson, W., Donn, R., Silman, A., and Ollier, W. (1995) HLA-DPB1*0201 is associated with particular clinical features of rheumatoid arthritis, *Rev Rheum Engl Ed*. 62: 163-168
12. Ceppellini R, Curtoni ES, Mattiuz PL, Miggianno V, Scudeller G, Serra A. (1967) Genetics of leukocyte antigens: a familiy sudy of segregation and linkage. In: *Histocompatibility Testing 1967*, eds. Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi RM, Munksgaard, Copenhagen : 149
13. Cesbron, A., Moreoau, P., Milpied, N., Muller, J., Harrousseau, J., and Bignon, J. (1990) Influence of HLA-DP mismatches on primary MLR responses in unrelated HLA-A, B, DR, DQ, DW identical pairs in allogenic bone marrow transplantation, *BMT*: 4: 337-340
14. Chattopadhyay S, Theobald M, Biggs J, Sherman LA. (1994) Conformational differences in major histocompatibility complex-peptide complexes in alloreactivity. *J Exp Med*:179: 213-219
15. Chien YH, Iwashima M, Wettstein DA, Kaplan KB, Elliott JF, Bom W, Davis MM. (1987) Tcell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature*: 330: 722-727
16. Dausset J. (1954) Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox sang*: 4: 190-198
17. Davis MM, Bjorkman PJ. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*: 334: 395-402

18. Davis MM, Chien Y. (1995) Issues concerning the nature of antigen recognition by alpha beta and gamma delta T-cell receptors. *Immunol Today*: 16: 316-318
19. Dekker J W, Nizankowska E, Schmitz-Schumann M, Pile K, Bochenek G, Dyczek A, Cookson WO, and Szczeklik A. (1997) Aspirin-induced asthma and HLA-DRB1 and HLA-DPB1 genotypes. *Clin Exp Allergy*: 27: 574-577
20. Dembic Z, Weiss S, Bogen B. (1994) Thymic selection of immunoglobulin idiotype specific T cells. *Thymus*: 22: 141-152
21. Dong RP, Kimura A, Okubo R, Shinagawa H, Tamai H, Nishimura Y, and Sasazuki T. (1992) HLA-A and DPB1 loci confer susceptibility to Graves' disease, *Hum Immunol*. 35: 165-172
22. Elliott TJ, Eisen HN.(1990) Cytotoxic T lymphocytes recognize a reconstituted class I histocompatibility antigen (HLA-A2) as an allogeneic target molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 87: 5213-5217
23. Erlich HA, Rotter JJ, Chang J D, Shaw SJ, Raffel LJ, Klitz W, Bugawan T L, and Zeidler A. (1996) Association of HLA-DPB1*0301 with IDDM in Mexican-Americans, *Diabetes*. 45: 610-614
24. Ferrara, J. and Deeg, H. (1996) Graft versus Host disease, *New Engl. J.Med.* 324: 667
25. Fugger L, Ryder LP, Morling N, Odum N, Friis J, Pedersen FK, Heilmann C, Sandberg-Wollheim M and Svejgaard A. (1990) DNA typing for HLA-DPB1*02 and -DPB1*04 in multiple sclerosis and juvenile rheumatoid arthritis, *Immunogenetics*. 32: 150-156
26. Gale RP, Bortin MM, van Bekkum DW, Biggs JC, Dicke KA, Gluckmann E, Good RA, Hoffmann RG, Kay HE, Kersey JH, Marmont RM, Masaoka T, Rimm AA, Rood JJ, Zwaan FE. (1987) Risk factors for acute graft-versus-host-disease, *Brit.J.Hematol.* 67: 397-406
27. Gammon G, Sercarz E. (1989) How some T cells escape tolerance induction. *Nature*: 342: 183-185

28. Gao X, Fernandez-Vina M, Olsen NJ, Pincus T, and Stastny P. (1991) HLA-DPB1*0301 is a major risk factor for rheumatoid factor-negative adult rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34: 1310-1312
29. Garrett TPJ, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. (1989) Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature.* 342: 692-696
30. Gaschet J, Gallot G, Ibisch C, Lim A, Even J, Vivien R, Hallet MM, Milpied N, and Vie, H. (1998) Acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation with a single HLA-DPB1*1001 mismatch: involvement of different TCRBV subsets. *Bone Marrow Transplant.* 22: 385-392
31. Gaschet J, Lim A, Liem L, Vivien R, Hallet MM, Harousseau JL, Even J, Goulmy E, Bonneville M, Milpied N and Vie H. (1996) Acute graft versus host disease due to T lymphocytes recognizing a single HLA-DPB1*0501 mismatch, *J Clin Invest.* 98: 100-107
32. Gilchrist FC, Bunce M, Lympany PA, Welsh KI and du Bois RM. (1998) Comprehensive HLA-DP typing using polymerase chain reaction with sequence-specific primers and 95 sequence-specific primer mixes. *Tissue Antigens.* 51: 51-61
33. Goldberg A. and Rock K. (1992) Proteolysis, Proteosomes and Antigen Presentation, *Nature.* 1992: 875-879
34. Gorer PA. (1936) The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *British Journal of experimental Pathology:* 17: 42-48
35. Gratwohl A, Herrmanns J, Apperley W, Arcese A, Bacigalupo G, Bandini G, Di Bartolomeo M, Boogaerts A, Bosi E, Carreras A, Devergie A, Ferrant WE, Fibbe F, Frassoni G, Gahrton J, Goldman A, Iriando N, Jacobsen HJ, Kolb H, Link M, Michallet HG, Prentice J, Reiffers J, Rhee FV. (1995) Acute graft-versus-host-disease: Grade and outcome in Patients with chronic myelogenous leukemia *Blood:* 86: 813-818
36. Guery JC, Sette A, Appella E, Adorini L. (1995) Constitutive presentation of dominant epitopes from endogenous naturally processed self-beta 2-microglobulin to class II-restricted T cells leads to self-tolerance. *J Immunol:* 154: 545-554

37. Hedley ML, Urban RG, Strominger JL. (1994) Assembly and peptide binding of major histocompatibility complex class II heterodimers in an in vitro translation system. *Proc Natl Acad Sci USA*: 91: 10479-10483
38. Horiki T, Moriuchi J, Inoko H, Morita K, Tsuji K, Shinohara Y, Ichikawa Y, Arimori S. (1993) HLA-DPB1 allele associates with early-onset myasthenia gravis in Japan. *Neurology*: 43: 771-774
39. Hoshino S, Kimura A, Fukuda Y, Dohi K, Sasazuki T. (1992) Polymerase chain reaction--single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a simple, economical, and rapid method for histocompatibility testing. *Hum Immunol*: 33: 98-107
40. Hyldig-Nielsen J, Morling N, Odum N, Ryder L, Jakobsen B, Svejgaard A. (1987) Restriction fragment polymorphism of the HLA-DP subregion and correlation to HLA-DP phenotypes. *Proc Natl Acad Sci*. 84: 1644-1648
41. Imberti L, Sottini A, Primi D. (1993) T cell repertoire and autoimmune diseases. *Immunol Res*: 12: 149-167
42. Kaneoka H, Lee DR, Hsu KC, Sharp GC, Hoffman RW. (1991) Solid-phase direct DNA sequencing of allele-specific polymerase chain reaction-amplified HLA-DR genes. *Biotechniques*: 10: 30-34
43. Kato Y., Mitsuishi Y. (1991) HLA-DP incompatibilities and severe Graft-Versus-Host Disease in unrelated Bone Marrow Transplants. *Transplantation*. 52: 374-386
44. Klein J, Figueroa F. (1986) Evolution of the major histocompatibility complex. *Crit-Rev-Immunol*: 6: 295-386
45. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldmann M, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungmann P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, De Witte T, Holler E, Ansari H. (1995) Graft versus leukemia effect of donor lymphocyte transfusion in marrow grafted patients. *Blood*. 86: 2041-2050
46. Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. (1990) T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med*: 322: 510-517
47. Landsteiner, K. (1901)Über Agglutinationseigenschaften normaler menschlicher Blute. *Wiener klinische Wochenschrift*: 14: 1132

48. Lechler RI, Heaton T, Barber L, Bal V, Batchelor JR, Lombardi G. (1992) Molecular mimicry by major histocompatibility complex molecules and peptides accounts for some alloresponses. *Immunol Lett*: 34: 63-69
49. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. (1990) The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today*: 11: 83-88
50. Lee C, McConnel HM. (1995) A general model of invariant chain association with class II major histocompatibility complex proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*: 92: 8269-8273
51. Link H, Kolb HJ, Ebell W, Hossfeld DJ, Zander A, Niehthammer D, Wandt H, Grosse-Wilde H, Schaefer UW. (1997) Transplantation hämatopoetischer Stammzellen; Teil I: Definitionen, prinzipielle Anwendungsmöglichkeiten, Komplikationen, *Medizinische Klinik*. 92: 480-491
52. Liu Z, Sun YK, Xi YP, Maffei A, Reed E, Harris P, Suci Foca N. (1993) Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J Exp Med*: 177: 1643-1650
53. Lombardi G, Sidhu S, Daly M, Batchelor JR, Makgoba W, Lechler RI. (1990) Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol*: 2: 9-13
54. Lorentzen DF, Iwanaga KK, Meuer KJ, Moritz TL, Watkins DI. (1997) A 25% error rate in serological typing of HLA-B homozygotes. *Tissue Antigens*: 50: 359-365
55. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. (1992) The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*: 70: 1035-1048
56. Mayr M (1994) HLA-Genkomplex-Nachweismethoden und klinische Bedeutung, *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*. 21: 184-191, 1994.
57. Mayr WR, Bernoco D, De Marchi M, Ceppellini R. (1973) Genetic analysis and biological properties of products of the third SD (AJ) locus of the HL-A region. *Transplant Proc*: 5: 1581-1593
58. Mella, J. G., Roschmann, E., Maier, K. P., and Volk, B. (1995) A Association of primary biliary cirrhosis with the allele HLA-DPB1*0301 in a German population. *Hepatology*: 21: 398-402

59. Meyers, J., Flournoy, N., and Thomas, E. (1986) Risk factors for cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation, *J.infet. Dis.* 153: 478-488
60. Miller SA, Dykes DD, and Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA rom human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215-1218
61. Mizuki N, Ohno S, Sugimura K, Seki T, Kikuti YY, Ando A, Ota M, Tsuji K, Inoko H. (1992) PCR-RFLP is as sensitive and reliable as PCR-SSO in HLA class II genotyping. *Tissue Antigens:* 40: 100-103
62. Moore MW, Carbone-FR, Bevan MJ. (1988) Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell:* 54: 777-785
63. Morahan G, Allison J, Miller JF. (1989) Tolerance of class I histocompatibility antigens expressed extrathymically. *Nature:* 339: 622-624
64. Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. (1986) Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T-lymphocyte clones. *J.Exp. Med.:* 163: 903- 907
65. Müller-Eckhardt GK, Tlusty V, Scholten A, Schmidt J, Müller-Eckhardt A. (1990) Incidence and specificity of HLA-DP antibodies in pregnancy sera. *Hum.immunol:* 29: 166-174.
66. Mytilineos J, Scherer S, Dunckley H, Trejaut J, Chapman J, Fischer G, Fae I, Middleton D, Savage D, Bignon JD, et al. (1993) DNA HLA-DR typing results of 4000 kidney transplants. *Transplantation:* 55: 778-781
67. Neefjes JJ, Momburg F. (1993) Cell Biologie of antigene presentation. *Curr. Oppin:* 5: 27-34
68. Nicholson I, Varney M, Kanaan C, Grigg A, Szer J, Tiedemann K, Tait BD. (1997) Alloresponses to HLA-DP detected in the primary MLR: correlation with a single amino acid difference. *Hum Immunol.* 55: 163-169
69. Nomura N, Ota M, Kato S, Inoko H, Tsuji K. (1991) Severe acute graft-versus-host disease by HLA-DPB1 disparity in recombinant family of bone marrow transplantation between serologically HLA-identical siblings: an application of the polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism method. *Hum Immunol.* 32: 261-268

70. Nossal GJ. (1994) Negative selection of lymphocytes. *Cell*: 76: 229-239
71. Nuchtem JG, Biddison WE, Klausner RD. (1990) Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature*: 343: 74-6
72. Ochs L, Miller W, Filipovich A. (1994) Predictive Factors for chronic graft-versus host disease after histocompatible sibling donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*: 13: 455-460
73. Olerup O, Möller E, Persson U. (1990) HLA-DP Incompatibilities Induce Proliferation in Primary Mixed Lymphocyte Culture in HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ-Identical Individuals, *Transplantation Proceedings*: 22: 141-142
74. Ota M, Seki T, Nomura N, Sugimura K, Mizuki N, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H. (1991) Modified PCR-RFLP method for HLA-DPB1 and -DQA1 genotyping, *Tissue Antigens*: 38: 60-71
75. Ottinger HD, Albert E, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Bunjes D, Burdach S, Ebell W, Ehninger G, Einsele H, Fauser A, Friedrich W, Finke J, Göbel U, Goldmann SF, Gramatzki M, Helbig W, Kanz L, Klingebiel T, Kolb HJ, Kühnl P, Löliger C, Müller CR, Müller CA, Niethammer D, Schaefer UW, Sayer H, Schmitz N, Schulze-Rath R, Waßmuth R, Wernet P, Westphal E, Zander R, Zintl F, Grosse-Wilde H. (1997) German consensus on immunogenetic donor search for transplantation of allogenic bone marrow and peripheral blood stem cells. *BMT*: 20: 101-105
76. Ottinger H, Grosse-Wilde M, Schmitz A, Grosse-Wilde H. (1994) Knochenmarkspendersuche, Strategien-Erfolgsquoten-Kosten: *Dtsch. Ärztebl*: 91: 420-426
77. Oza AM, Tonks S, Lim J, Fleetwood MA, Lister TA, Bodmer JG. (1994) A clinical and epidemiological study of human leukocyte antigen-DPB alleles in Hodgkin's disease, *Cancer Res*: 54: 5101-5105
78. Patten P, Yokota T, Rothbard J, Chien Y, Arai K, Davis MM. (1984) Structure, expression and divergence of T-cell receptor beta-chain variable regions. *Nature*: 312: 40-46
79. Payne R, Rolfs MR. (1958) Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest*: 37: 1756-1763

80. Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Smith A, Mickelson E, Hansen, JA. (2001) The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br. J Haematol*: 112: 988-994
81. Petersdorf EW, Smith AG, Mickelson EM, Longton GM, Anasetti C, Choo SY, Martin P J, Hansen JA. (1993) The role of HLA-DPB1 disparity in the development of acute graft-versus- host disease following unrelated donor marrow transplantation. *Blood*: 81: 1923-1932
82. Pieters J. (1997) MHC class II compartments: specialized organelles endocytic pathway in antigen presenting cells. *Biol Chem*: 378: 751-758
83. Pieters, J. (2000) MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv. Immunol*: 75: 159-208
84. Potolicchio I, Brookes PA, Madrigal A, Lechler RI, and Sorrentino R. (1996) HLA-DPB1 mismatch at position 69 is associated with high helper T lymphocyte precursor frequencies in unrelated bone marrow transplant pairs, *Transplantation*: 62: 1347-1352
85. Rajan TV. (1987) Is there a role for MHC class I antigens in the elimination of somatic mutants?, *Immunol. Today*: 1987: 171-172
86. Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*: 86: 6230-6234
87. Salgame P, Convit J, Bloom BR. (1991) Immunological suppression by human CD8+ T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 88: 2598-2602
88. Schmitz N, Grahtwohl A, Goldman J. (1996) Allogenic and autologous transplantation for hematological diseases, solid tumors and immune disorders. Current practise in Europe in 1996 and proposals for an operational classification. *Bone Marrow Transplant*. 17: 471-477
89. Shennan LA, Chattopadhyay S. (1993) The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol*: 11: 385-402

90. Snodgrass HR, Kisielow P, Kiefer M, Steiranetz M, von Boehmer H. (1985) Ontogeny of the Tcell antigen receptor within the thymus. *Nature*: 313: 592-595
91. Sodoyer R, Damotte M, Delovitch TL, Trucy J, Jordan BR, Strachan T. (1984) Complete nucleotide sequence of a gene encoding a functional human class I histocompatibility antigen (HLA-Cw3). *EMBO J*: 3: 879-885
92. Sorrentino R, Potolicchio I, Ferrara GB, Tosi R. (1992) A new approach to HLA-DPB1 typing combining DNA heteroduplex analysis with allele-specific amplification and enzyme restriction. *Immunogenetics*: 36: 248-254
93. Sprent J, Gao EK, Webb SR. (1990) T cell reactivity to MHC molecules: immunity versus tolerance. *Science*: 248: 1357
94. Steinmetz M, U. Y. e. a. (1987) Hotspots of recombination in mammalian genomes, *Trends in genetics*: 3: 7-10
95. Steinmuller D. (1985) Which T cells mediate allograft rejection? *Transplantation*: 40: 229-33
96. Stern CM, Dowler DD, Latorra D, Miller SA, Netzel LR, Verret C, and MS., S. (1992) Super Quik Gene: Two hours DNA isolation and purification without proteinase or phenol., *The third international symposium on human identification* p.429
97. Strachan T, Sodoyer R, Damotte M, Jordan BR. (1984) Complete nucleotide sequence of a functional class I HLA gene, HLA-A3: implications for the evolution of HLA genes. *EMBO J*: 3: 887-894
98. Taylor GM, Gokhale DA, Crowther D, Woll P, Harris M, Alexander F, Jarrett R, Cartwright RA. (1996) Increased frequency of HLA-DPB1*0301 in Hodgkin's disease suggests that susceptibility is HVR-sequence and subtype-associated: *Leukemia*. 10: 854-859
99. Terasaki PI, McClelland JB. (1964) Microdroplet assay of human serum cytokines. *Nature*. 204: 998-1000
100. The MHC sequencing consortium. (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*: 401: 921-923
101. Theobald M. and Bunjes D. (1993) Pretransplant detection of human minor histocompatibility antigen- specific naive and memory interleukin-2-secreting T cells

- within class I major histocompatibility complex (MHC)-restricted CD8+ and class II MHC-restricted CD4+ T-cell subsets, *Blood*. 82: 298-306
102. Thorsby E, Sandberg L, Lindholm A, Kissmeyer-Nielsen F. (1970) The HL-A system: evidence of a third sub-locus. *Scand J Haematol*: 7: 195-200
 103. Townsend A, B. H. (1989) Antigene recognition by class I-restricted T-lymphocytes, *Annu. Rev. Immun*: 7: 601-624
 104. Von Boehmer H, Teh HS, Kisielow P. (1989) The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today*: 10: 57-61
 105. Warrens AN, Lombardi G, Lechler RI. (1994) Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol*: 2: 103-107
 106. Yu N, Ohashi, M, Alosco S, Granja C, Salazar M, Hegland J, Yunis E. (1997) Accurate typing of HLA-A antigens and analysis of serological deficiencies. *Tissue Antigens*: 50: 380-386
 107. Zinkernagel RM, Doherty PC. (1974) Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*: 248: 701-702

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Mohr
 Vorname: Michael
 Geburtsdatum,-ort: 11. Januar 1968, Dortmund
 Familienstand: verheiratet seit 1994 mit Derya Önal-di-Mohr
 ein Kind, Can Mohr, geb. am 25.06.1995
 Eltern: Dr.med Hans-Joachim Mohr
 Elke Mohr, geb. Thiemann

Schulbildung

1974 Grunds chule Ringen
 1975 Grunds chule Mönchaltorf, Schweiz
 1976 - 1977 Grunds chule Olfen
 1978 Gymnasium Canisianum Lüdinghausen
 1979 - 1988 Heinrich Heine Gymnasium Dortmund, Abschluss Abitur

Zivildienst

1988 - 1990 Zivildienst Städtische Kliniken Dortmund

Hochschulbildung

04/1990 - 11/1996 Studiengang Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
 03/1992 Ärztliche Vorprüfung
 03/1993 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 09/1995 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 11/1996 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Ausbildung

03/1997 – 09/1997 Arzt im Praktikum, Universitätsklinikum Benjamin-Franklin,
 Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie
 10/1997 – 09/1998 Arzt im Praktikum, Universitätsklinikum Münster,
 Medizinische Klinik A, Hämatologie/Onkologie/Pneumologie
 10/1998 Approbation
 seit 10/1998 Assistenzarzt, Universitätsklinikum Münster,
 Medizinische Klinik A, Hämatologie/Onkologie/Pneumologie

Münster, den 23.02.2003