

## Übersichtsreferat—Review Article

### Das HL-A-System in der Paternitätsserologie\*

Wolfgang R. Mayr

Institut für Blutgruppenserologie der Universität Wien\*\*

Eingegangen am 26. August 1974

#### The HL-A-System in Paternity Testing

*Summary.* After a brief description of the standard method used to detect the antigens of the HL-A system (NIH technique of the microlymphocytotoxic test), the genetics of this system are described fully. Most of the HL-A factors are governed by 2 closely linked loci with multiple allelism, located probably on chromosome 6. Within this chromosomal region there exists a third locus also defining serologically detectable antigens.

The HL-A antigens show a simple inheritance, retain their character without change and can be defined by a simple and highly reproducible method. Because of these reasons, the HL-A system can be used in paternity testing. The 3 possible classes to exclude a falsely accused man within this system, their chance of exclusion and the value of these exclusions are discussed in detail. The chance of paternity exclusion using all the possibilities within the HL-A system is 91%. Including the genetic markers of ABO, MNSSs, Rh, K, P, Fy, Jk, Lu, Xg, Se, acP, AK, PGM<sub>1</sub>, ADA, GPT, Hp, Gc, Gm, Inv and Pt this chance is raised to 99.6%. Considering only the constellation where the child possesses an HL-A antigen lacking in the mother and the accused man corresponds to an exclusion chance of 82%. In combination with the same class of exclusion within the other systems cited above, the total chance increases to 96.1%. The various biostatistical methods used to calculate the chance of exclusion and the probability of paternity are mentioned. Finally, problems found in the HL-A serology (e.g. synergism, gene-dose effects, . . .) are discussed.

*Zusammenfassung.* Nach einer einleitenden Beschreibung der Routinenachweismethode der HL-A-Merkmale (NIH-Mikrotechnik des lymphocytotoxischen Tests) wird die Genetik des HL-A-Systems eingehend besprochen. Der Großteil seiner Merkmale wird über 2 eng gekoppelte Loci, an denen multiple Allelie vorliegt und die wahrscheinlich am Chromosom 6 situiert sind, gesteuert. In dieser HL-A-Chromosomenregion liegt ferner noch ein dritter Locus, der ebenfalls serologisch nachweisbare Antigene definiert und der zur Zeit intensiv untersucht wird.

Nachdem die HL-A-Merkmale einen gesicherten Erbgang aufweisen, umweltstabil und mittels einer einfachen und gut reproduzierbaren Methode bestimmbar sind, können sie in der Paternitätsserologie verwendet werden. Die 3 möglichen Ausschlußkonstellationen des HL-A-Systems, deren Brauchbarkeit und Beweiswert werden ausführlich diskutiert. Die allgemeine Vaterschaftsausschlußchance (AVACH) des HL-A-Systems wurde bei Berücksichtigung aller Ausschlußsituationen mit 91% errechnet, woraus unter Einbeziehung der Erbmerkmalsysteme ABO, MNSSs, Rh, K, P, Fy, Jk, Lu, Xg, Se, SEP, AK, PGM<sub>1</sub>, ADA, GPT, Hp, Gc, Gm, Inv und Pt eine kombinierte AVACH von 99,6% resultiert. Die alleinige Verwendung der Ausschlußkonstellationen mit dem höchsten Beweiswert, bei denen das Kind ein Merkmal aufweist, welches der Mutter und dem Präsumtivvater fehlt, ergibt im HL-A-System bereits eine AVACH von 82%. Die AVACH erreicht bei Untersuchung aller oben angeführten Systeme, bei denen ebenfalls nur jene Ausschlußsituation berücksichtigt wurde, in der das Kind ein

\* Verfaßt auf Einladung der Redaktion.

\*\* National Blood Group Reference Laboratory (WHO), National Tissue Typing Reference Laboratory (Council of Europe).

Merkmal besitzt, das bei seiner Mutter und dem Präsumtivvater nicht nachweisbar ist, einen Gesamtwert von 96,1%. Die verschiedenen biostatistischen Methoden zur Berechnung der Vaterschaftsausschlußchance und der Vaterschaftswahrscheinlichkeit im HL-A-System werden erwähnt und abschließend noch die Fehlermöglichkeiten, die beim Nachweis der HL-A-Merkmale auftreten können, in extenso besprochen.

*Key words:* Blutgruppen, HL-A-System — HL-A-System — Vaterschaftsgutachten, HL-A-System.

## I. Einleitung

Die rasche Erforschung des menschlichen HL-A-Systems (*human leucocyte locus A*) (Amos, 1968), das den Großteil der an Leukozyten nachweisbaren Antigene umfaßt, wurde hauptsächlich durch den Umstand gefördert, daß die Merkmale dieses Systems, neben den klassischen Blutgruppen ABO, die einzigen bekannten Histokompatibilitätsantigene des Menschen und daher für das Überleben von transplantierten Geweben von großer Bedeutung sind (Lit. bei Mayr, 1974a). Bedingt durch seinen enormen Polymorphismus, der einen großen Schritt zum Beweis der Richtigkeit der Landsteinerschen Hypothese (1931) von der Individualität des menschlichen Blutes darstellt (Speiser, 1972a), konnte das HL-A-System rasch für andere als klinische Fragestellungen, und zwar für anthropologische und forensische Probleme, Verwendung finden. Für die forensische Medizin wird es in Zukunft möglicherweise noch eine große Bedeutung in der Identifizierung von Blutspuren erlangen (Rittner u. Waiyawuth, 1974), im Augenblick liegt das wichtigste Anwendungsgebiet aber in der Paternitätsserologie.

## II. Nachweismethoden

Die Antigene des HL-A-Systems sind an allen Zellen des Organismus nachweisbar, wobei allerdings ihre Quantität stark variiert. Die geringste Menge liegt an reifen Erythrocyten, im Fett- und Hirngewebe vor. Nachdem die roten Blutkörperchen aus diesem Grund nicht für den Nachweis der HL-A-Merkmale (Gewebstypisierung) verwendbar sind, war man gezwungen, auf andere, leicht isolierbare Zellen mit großen Antigenmengen auszuweichen, wie z. B. Leuko- und Thrombocyten (Lit. bei Mayr, 1974a).

Als Routinetest zum Nachweis der HL-A-Antigene hat sich der mikrolymphocytotoxische Test durchgesetzt; die früher verwendete Granulocytenagglutination wurde praktisch verlassen. Neben dem lymphocytotoxischen Test spielt auch noch die Komplementbindungsreaktion an Thrombocyten eine gewisse Rolle; sie bleibt aber wegen der Seltenheit von brauchbaren Testsera noch auf wenige Anwendungsgebiete beschränkt.

Aus diesem Grund soll hier nur der mikrolymphocytotoxische Test beschrieben werden: Die Lymphocytenisolierung erfolgt aus defibriniertem (oder heparinisiertem) Blut, das über ein Medium mit einem spezifischen Gewicht von ca. 1,080 (als Flotationsmittel 53 Teile Urografin® 30% und 47 Teile dest. Wasser) geschichtet und anschließend für 20—30 min bei 1500 g zentrifugiert wird (W. Schneider, pers. Mittlg.). Die Lymphocyten mit einem spezifischen Gewicht von 1,060 bleiben in der Zwischenschicht zwischen Serum und Medium, während die anderen Blutbestandteile mit einem spezifischen Gewicht um 1,090 (Granulocyten und Erythro-

cyten) auf den Boden des Röhrchens zu liegen kommen. Die Lymphocyten werden aufgenommen und 3mal in gepufferter Hanks Solution (Hanks Solution und Tris-puffer pH 7,45  $\bar{a}\bar{a}$ ) gewaschen (je 3—5 min bei 1500 g). Wird die Isolierung aus Heparinblut durchgeführt, müssen die Thrombocyten, die sich zusammen mit den Lymphocyten an der Trennschicht zwischen Plasma und Medium ansammeln, durch langsame Zentrifugation während des Waschens entfernt werden (je 10 min bei 400 g), da sie ebenfalls HL-A-Antigene besitzen und dadurch während des Ablaufs des lymphocytotoxischen Tests HL-A-Antikörper absorbieren können, wodurch u. U. ein falsch-negatives Resultat zustande kommt.

Vom lymphocytotoxischen Test sind mehrere Variationen bekannt; es sollte aber die empfindliche NIH-Standardtechnik (Brand *et al.*, 1970) angewendet werden, für die es relativ leicht ist, brauchbare Antisera zu finden. HL-A-Antikörper findet man nur als Immunantikörper bei Personen, die mit fremden HL-A-Antigenen in Kontakt kamen, wobei die Ursache der Immunisierung in Schwangerschaften (feto-maternelle Immunisierung), Bluttransfusionen und Organtransplantationen liegt.

Für den mikrolymphocytotoxischen Test werden die Lymphocyten in einer Konzentration von 2000 Zellen/ $\mu$ l in gepufferter Hanks Solution resuspendiert und 1  $\mu$ l dieser Aufschwemmung mit 1  $\mu$ l Antiserum zusammengebracht. Die Reaktionen werden in speziellen Plastikkammern unter Paraffinum liquidum angesetzt, um ein Austrocknen der geringen Volumina zu vermeiden, wobei die Mikrolitermengen mittels Spezialspritzen mit Dosiervorrichtung auf den durchsichtigen Boden der Testkammern eingebracht werden. Nach einer Inkubation von 30 min bei Zimmertemperatur werden dem Reaktionsgemisch als Komplementquelle 5  $\mu$ l Kaninchenserum (lyophilisiert oder bei einer Maximaltemperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert) zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 60 min bei Zimmertemperatur werden 3  $\mu$ l 5% Eosin (in dest. Wasser) und nach weiteren 5 min 10  $\mu$ l 37% säurefreies Formalin zur Fixierung der Reaktionen zugefügt. Besitzen die Lymphocyten das Antigen, gegen welches das Testserum gerichtet ist, wird durch die Antigen-Antikörper-Komplexe an der Zelloberfläche das Komplement aktiviert, wodurch es zu einer Schädigung der Membran kommt und die Lymphocyten das zugesetzte Eosin aufnehmen. Besitzen die Zellen das Antigen nicht, werden sie durch das beigegebene Eosin nicht gefärbt. Die Ablesung erfolgt in einem umgekehrten biologischen Phasenkontrastmikroskop mit einer 150fachen Vergrößerung, wobei die lebenden ungefärbten Zellen klein und leuchtend erscheinen, während die toten größer und dunkel gefärbt imponieren.

Der Nachteil des lymphocytotoxischen Tests ist, daß die Lymphocyten relativ rasch verwendet werden müssen (innerhalb von ca. 36 Std nach der Blutentnahme), da sonst der Prozentsatz der abgestorbenen Zellen (und damit im Test auch unspezifisch angefärbten Zellen) zu hoch wird, um eine sichere Aussage über die Positivität oder Negativität der Reaktionen zu machen. Die Methoden zur Vitalerhaltung der Lymphocyten benötigen einen großen Aufwand: entweder Einfrierung unter Beibehaltung eines Temperaturgradienten von  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  im Bereich von  $+4^{\circ}\text{C}$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$  und Lagerung bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff oder kurzfristige Aufbewahrung (bis zu 1 Woche) in speziellen Kulturmedien, wobei aber absolut steril gearbeitet werden muß; sie sind daher als Routinemethoden für Vaterschaftsfälle ungeeignet (s. Mayr, 1974a).

Für die Bestimmung der HL-A-Merkmale ist es optimal, sowohl die Blutentnahme und die Isolation der Zellen als auch den Test im gleichen Laboratorium durchzuführen. Nach unserer Erfahrung ist allerdings der Transport einer Lymphocytensuspension in autologem Serum oder evtl. sogar von defibriniertem oder heparinisiertem Blut per Expresspost oder Luftfracht möglich, wenn die Lymphocyten innerhalb von 36 Std nach der Entnahme getestet werden können.

Die für den lymphocytotoxischen Test notwendige Zellzahl kann aus einer geringen Blutmenge erhalten werden (aus 2 ml Blut werden durchschnittlich mehr als  $1,5 \times 10^6$  Lymphocyten gewonnen, die für mindestens 700 Reaktionsansätze reichen), so daß in dieser Beziehung keine Probleme bei der Bestimmung der HL-A-Merkmale bei Kleinkindern auftreten, zumal die nach der Zentrifugation über dem Medium erhaltenen Blutbestandteile (Serum bzw. Plasma über dem Flotationsmittel und Erythrocyten unterhalb) für die Bestimmung aller Erythrocyten- und Serummerkmale verwendbar sind.

### III. Genetik des HL-A-Systems

Auf Grund großangelegter Populations- und Familienuntersuchungen wurde das derzeit allgemein anerkannte genetische Konzept erstellt, daß der Großteil der serologisch definierbaren Merkmale des HL-A-Systems über 2 eng gekoppelte autosomale Loci vererbt wird (ausf. Lit. bei Mayr, 1974a), die wahrscheinlich am Chromosom 6 liegen (Jongsma *et al.*, 1973; Lamm *et al.*, 1974). Diese Loci werden jetzt als SD-Loci (SD = serologisch definierbar) bezeichnet, um sie von anderen Loci desselben Chromosomenabschnitts zu unterscheiden, deren Genprodukte nicht serologisch, sondern durch die Lymphocytenaktivierung in der Mischkultur (MLC) nachweisbar sind und die LD-Loci (LD = durch Lymphocytenaktivierung definierbar) genannt werden (Bach *et al.*, 1972).

Die Antigene dieser 2 Loci werden nach der Nomenklatur des 5th International Histocompatibility Workshop (Joint Report 1972) folgendermaßen bezeichnet:

SD-1(bisher LA)-Locus: HL-A1, HL-A2, HL-A3, HL-A9, HL-A10, HL-A11, W28, W29, W30, W31, W32 und W19.6,

SD-2(bisher 4)-Locus: HL-A5, HL-A7, HL-A8, HL-A12, HL-A13, W5, W10, W14, W15, W16, W17, W18, W21, W22 und W27.

Die einzelnen Merkmale jedes der beiden Loci weisen einen kodominanten Erbgang auf und werden durch multiple Allele gesteuert.

Die HL-A-Genfrequenzen in der südwestdeutschen Bevölkerung sind in Tabelle 1 angegeben. Diese Werte zeigen beim Vergleich mit den in Österreich gefundenen (Mayr, 1971) keinen signifikanten Unterschied. Wie ersichtlich, ist die Summe der Genfrequenzen innerhalb jedes Locus noch nicht 1,00, woraus geschlossen wird, daß sowohl im SD-1- als auch im SD-2-Locus noch nicht alle Genprodukte serologisch nachweisbar sind. Diese Annahme wird auch durch die Analysen der Familiendaten gestützt. Die noch unbekannt korrespondierenden Gene werden als  $X_1$  und  $X_2$  (bisher  $X_{LA}$  bzw.  $X_4$ ) bezeichnet und weisen Frequenzen von 0,0103 bzw. 0,0497 auf. Wegen der Seltenheit der durch  $X_1$  und  $X_2$  gesteuerten Merkmale dürfte das Auffinden von Antikörpern, die gegen diese Antigene gerichtet sind, sehr schwer sein. Nach neuesten Untersuchungen ist  $X_2$  heterogen, da erst kürzlich 2 niederfrequente Merkmale mit der Bezeichnung TY

Tabelle 1. HL-A-Genfrequenzen und deren Standardabweichungen ( $\sigma$ ) in Südwestdeutschland

		Genfrequenz	$\sigma$	$n$
<i>SD-1-Locus</i>	HL-A1	0,1554	0,0122	478
	HL-A2	0,2484	0,0151	478
	HL-A3	0,1729	0,0128	478
	HL-A9	0,1358	0,0115	478
	HL-A10	0,0671	0,0082	478
	HL-A11	0,0406	0,0065	478
	W28	0,0439	0,0067	478
	W29	0,0297	0,0055	478
	W30	0,0310	0,0062	393
	W31	0,0103	0,0036	393
	W32	0,0340	0,0059	478
	W19.6	0,0206	0,0051	393
		$\Sigma$	0,9897	
	$X_1$	0,0103		
	$\Sigma$	1,0000		
<i>SD-2-Locus</i>	HL-A5	0,0582	0,0077	478
	HL-A7	0,1566	0,0123	478
	HL-A8	0,1002	0,0100	478
	HL-A12	0,1274	0,0112	478
	HL-A13	0,0297	0,0055	478
	W5	0,0932	0,0096	478
	W10	0,0604	0,0078	478
	W14	0,0297	0,0055	478
	W15	0,0864	0,0093	478
	W16	0,0238	0,0118	85
	W17	0,0526	0,0073	478
	W18	0,0330	0,0058	478
	W21	0,0222	0,0048	478
	W22	0,0330	0,0058	478
	W27	0,0439	0,0067	478
		$\Sigma$	0,9503	
	$X_2$	0,0497		
	$\Sigma$	1,0000		

(Gelsthorpe u. Doughty, 1973) und Hon (Mayr, unveröffentlicht) im SD-2-Locus gefunden wurden. Die Summe der Frequenzen dieser 2 Gene beträgt ca. 3%, so daß in diesem Locus 2% der Gene noch unbekannt sind. Die Möglichkeit, daß es sich bei diesen  $X_2$ -Genen und bei  $X_1$  um stille Allele, analog dem  $d$  des Rhesussystems, handelt, ist nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich.

Die Möglichkeit des Vorliegens von  $X$ -Genen bringt dann Schwierigkeiten mit sich, wenn bei einer Person in einem oder in beiden Loci nur ein Merkmal serologisch nachweisbar ist, da nicht entschieden werden kann, ob dieses eine Gen in reinerbiger Form oder mischerbig mit dem  $X$ -Gen vorliegt. Falls keine Untersuchung der Blutsverwandten des Probanden in Aszendenz oder Deszendenz möglich ist, können Anhaltspunkte über die Zygotie durch mathematische

Berechnungen der Wahrscheinlichkeit einer Homo- bzw. Heterozygotie unter Berücksichtigung der HL-A-Genfrequenzen (Speiser u. Pausch, 1969) oder durch eine quantitative Methode der Komplementbindungsreaktion an Thrombocyten (Svejgaard, 1969) gewonnen werden.

Der Vergleich der beobachteten Phänotypen mit den auf Grund der Genfrequenzen errechneten Erwartungswerten zeigt in beiden Loci eine gute Übereinstimmung, als Zeichen dafür, daß sich die beiden Loci im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden (SD-1-Locus:  $\chi^2 = 25,9$ ; 28 FG;  $0,6 > p > 0,5$ ; SD-2-Locus:  $\chi^2 = 31,7$ ; 48 FG;  $0,97 > p > 0,95$ ).

Die in der südwestdeutschen Population nach Mattiuz *et al.* (1970) berechnete Frequenz der Haplotypen, das sind die Kombinationen von je einem Gen des SD-1- mit einem des SD-2-Locus, welche in der Regel en bloc weitergegeben werden, finden sich in Tabelle 2. Dabei wurden die Haplotypen mit dem Gen *W16* wegen der noch zu geringen Anzahl der mit Anti-*W16* ausgewerteten Individuen nicht berücksichtigt; sie sind in den  $X_2$ -tragenden Haplotypen enthalten.

Der statistische Vergleich der beobachteten Haplotypenfrequenzen mit den Werten, die durch das Produkt der Genfrequenzen der entsprechenden Gene errechenbar sind, ergibt summarisch einen hochsignifikanten Unterschied ( $\chi^2 = 587,12$ ; 99 FG;  $p \ll 0,0005$ ). Die größten Abweichungen liegen bei folgenden Haplotypen vor:

positive Assoziation (die Gene sind häufiger an einem Haplotyp als erwartet): *HL-A1, HL-A8; HL-A3,HL-A7; W29,HL-A12; HL-A11,W5; W30,HL-A13; W19.6,W14; HL-A2, HL-A12*,

negative Assoziation (die Gene liegen seltener an einem Haplotyp als erwartet): *HL-A2, HL-A8; HL-A1,HL-A12; HL-A3,HL-A8; HL-A9,HL-A8; HL-A1,W5*.

Die positiven Assoziationen von *HL-A1,HL-A8* und *HL-A3,HL-A7* sind offenbar für die weiße Rasse typisch und wurden von mehreren Autoren beobachtet (s. Mayr, 1974a). Auf Grund des hochsignifikanten Unterschiedes zwischen den beobachteten und den errechneten Haplotypenfrequenzen ist im HL-A-System auf ein Koppelungsungleichgewicht zu schließen, wie es auch vom Rhesus- und MNSS-System bekannt ist, bei denen beispielsweise die Gene *C* und *D*, *c* und *d*, *M* und *S* sowie *N* und *s* häufiger gekoppelt sind, als dies den unter Verwendung der einzelnen Genfrequenzen errechneten Werten entspricht.

Als Beispiel der gekoppelten Vererbung der Gene des SD-1- und des SD-2-Locus seien die Befunde der Familie Me 045 aufgezeigt (Tabelle 3). Wie aus den Phänotypen der Familienmitglieder ersichtlich ist, müssen die Kinder 1 und 4 die Gene *HL-A1* und *HL-A8* von ihrem Vater ererbt haben, da diese der Mutter fehlen. Deshalb kann der Genotyp des Vaters mit *HL-A1,HL-A8/HL-A3,HL-A7* fixiert werden. Andererseits müssen diese beiden Kinder die 2 übrigen Gene (*HL-A2* und *HL-A13*) von ihrer Mutter erhalten haben, deren Genotyp folglich *HL-A2,HL-A13/HL-A11,HL-A5* sein muß. Diese Schlußfolgerungen lassen sich an Hand der Phänotypen der anderen 3 Kinder bestätigen.

In einem geringen Prozentsatz der Fälle treten Abweichungen von dieser gekoppelten Vererbung auf, die durch ein Crossing-over zwischen den 2 Loci bedingt sind, wie dies an Hand der Familie 188b demonstriert werden soll (Tabelle 4). Basierend auf der Tatsache, daß der Vater am SD-2-Locus nur ein nachweisbares Genprodukt (*W21*) besitzt, aber 3 seiner Kinder (Nr. 2, 3 und 4) *W21*-negativ

Tabelle 2. HL-A-Haplotypenfrequenzen in Südwestdeutschland (Werte  $\times 10^4$ )

SD-1	SD-2	HL-A5	HL-A7	HL-A8	HL-A12	HL-A13	W5	W10	W14	W15	W17	W18	W21	W22	W27	X <sub>2</sub>	$\Sigma$
HL-A1	64	169	780	1	1	2	30	27	1	16	144	27	61	14	30	188	1554
HL-A2	136	277	25	480	20	20	155	209	80	315	183	46	30	122	155	251	2484
HL-A3	92	727	1	147	46	46	246	81	50	136	20	47	1	34	77	24	1729
HL-A9	96	139	14	233	44	44	180	80	1	182	117	60	68	1	93	50	1358
HL-A10	4	40	57	126	24	24	26	44	17	66	8	86	29	66	1	77	671
HL-A11	44	25	1	1	21	21	161	1	1	1	11	53	2	42	34	8	406
W28	76	20	35	59	1	1	26	64	21	53	1	1	10	1	15	56	439
W29	30	21	23	155	13	13	17	4	8	1	16	1	5	1	1	1	297
W30	1	4	40	5	111	111	26	4	21	21	1	1	9	16	1	49	310
W31	1	1	2	26	1	1	5	40	1	2	2	1	2	1	17	1	103
W32	32	63	21	36	12	12	36	24	34	37	1	1	3	21	10	9	340
W19.6	5	53	2	4	1	1	8	12	61	19	5	5	1	6	4	20	206
X <sub>1</sub>	1	27	1	1	1	1	16	14	1	15	17	1	1	5	1	1	103
$\Sigma$	582	1566	1002	1274	297	297	932	604	297	864	526	330	222	330	439	735	10000

Tabelle 3. Gewebstypen der Familie Me 045

	Phänotypen		Genotypen
	SD-1-Locus	SD-2-Locus	
Vater	HL-A1,HL-A3	HL-A7,HL-A8	HL-A1,HL-A8/HL-A3,HL-A7
Mutter	HL-A2,HL-A11	HL-A5,HL-A13	HL-A2,HL-A13/HL-A11,HL-A5
Kinder 1 u. 4	HL-A1,HL-A2	HL-A8,HL-A13	HL-A1,HL-A8/HL-A2,HL-A13
Kind 2	HL-A1,HL-A11	HL-A5,HL-A8	HL-A1,HL-A8/HL-A11,HL-A5
Kind 3	HL-A3,HL-A11	HL-A5,HL-A7	HL-A3,HL-A7/HL-A11,HL-A5
Kind 5	HL-A2,HL-A3	HL-A7,HL-A13	HL-A3,HL-A7/HL-A2,HL-A13

Tabelle 4. Gewebstypen der Familie 188b

	Phänotypen		Genotypen
	SD-1-Locus	SD-2-Locus	
Vater	HL-A1,HL-A3	W21	HL-A1,X <sub>2</sub> /HL-A3,W21
Mutter	HL-A2,HL-A11	W10,W15	HL-A2,W10/HL-A11,W15
Kind 1	HL-A3,HL-A11	W15,W21	HL-A3,W21/HL-A11,W15
Kind 2	HL-A1,HL-A11	W10	HL-A1,X <sub>2</sub> /HL-A11,W10
Kind 3	HL-A1,HL-A2	W10	HL-A1,X <sub>2</sub> /HL-A2,W10
Kind 4	HL-A1,HL-A11	W15	HL-A1,X <sub>2</sub> /HL-A11,W15
Vater der Mutter	HL-A11,W28	W14,W15	HL-A11,W15/W28,W14
Mutter der Mutter	HL-A2,W28	W10,W14	HL-A2,W10/W28,W14
Bruder der Mutter	W28	W14	W28,W14/W28,W14

sind, kann fixiert werden, daß er nicht *W21*-homozygot, sondern *W21*,*X*<sub>2</sub>-heterozygot ist. Nach analogen Überlegungen wie bei Familie Me 045 läßt sich sein Genotyp mit *HL-A1*,*X*<sub>2</sub>/*HL-A3*,*W21* bestimmen. Der an Hand der Phänotypen der Kinder 1, 3 und 4 abgeleitete Genotyp der Mutter, welcher auch durch die Gewebstypisierung ihrer Eltern und ihres Bruders bestätigt wurde, ist *HL-A2*, *W10/HL-A11*,*W15*. Das Kind 2 hat aber von seiner Mutter weder *HL-A2*, *W10* noch *HL-A11*, *W15*, sondern den Haplotyp *HL-A11*, *W10* ererbt, der durch ein Crossing-over zwischen den Genen des SD-1- und des SD-2-Locus zustande gekommen sein muß. Bezüglich dieser Familie ist noch erwähnenswert, daß der Bruder der Mutter sowohl von seinem Vater als auch von seiner Mutter den Haplotyp *W28*, *W14* ererbte und daher *W28*- und *W14*-homozygot ist.

Die Häufigkeit des Vorkommens von Rekombinationen beträgt in unserem Material 0,61% (9 Crossing-over bei 1470 informativen Meiosen). Dieser Wert stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen überein (Svejgaard *et al.*, 1971). Die Distanz zwischen den beiden Loci am Chromosom beträgt daher ca. 0,6 cM (Centimorgan).

Bedingt durch die große Anzahl der serologisch nachweisbaren Merkmale in den beiden Loci des HL-A-Systems weist dieses einen Polymorphismus auf, der bisher von keinem anderen menschlichen Erbmerkmalsystem erreicht wurde. Unter der Annahme von 12 bzw. 15 Allelen und je einem X-Allel im SD-1- und SD-2-Locus sind pro Locus 79 bzw. 121 Phänotypen zu erwarten (Zahl der Phänotypen pro Locus =  $n(n+1)/2 + 1$ , wobei *n* die Zahl der Gene mit nachweisbarem Merkmal

darstellt). Daraus ergibt sich eine Gesamtzahl von 9559 Phänotypen ( $79 \times 121 = 9559$ ). Diese Angabe stellt allerdings nur einen minimalen Wert dar, da, wie schon erwähnt, im SD-2-Locus bereits 2 weitere Merkmale bekannt sind und außerdem eine Reihe von Merkmalen (wie z. B. HL-A9, HL-A10, W21) in engere Spezifitäten aufgespalten werden können, eine Situation, wie sie der Unterteilung der Blutgruppe A in die Untergruppen  $A_1$  und  $A_2$  vergleichbar ist. Ferner steigt der HL-A-Polymorphismus durch die Entdeckung eines weiteren, dritten Locus (SD-3), der in jüngster Zeit beschrieben wurde (Mayr *et al.*, 1973; Svejgaard *et al.*, 1973) und der ebenfalls serologisch definierbare Merkmale steuert, weiter an. Die bisher bekannten Merkmale des SD-3-Locus zeigen ein wesentlich stärkeres Koppelungsungleichgewicht zu den Merkmalen des SD-2-Locus als zu jenen des SD-1-Locus. Aus diesem Grund und aus der Tatsache, daß trotz des Vorkommens von Rekombinationen zwischen SD-1 und SD-3 bisher noch kein Crossing-over zwischen SD-2 und SD-3 beobachtet wurde, ist der SD-3-Locus knapp neben dem SD-2-Locus anzunehmen (Abstand  $< 0,36$  cM). Es kann aber noch nicht entschieden werden, ob er zwischen SD-1 und SD-2 am Chromosom 6 oder ob er außerhalb der Distanz SD-1/SD-2 liegt (Mayr, 1974 b). Zur Zeit sind 6 SD-3-Antigene serologisch nachweisbar, wobei die Summe ihrer Genfrequenzen 0,4 beträgt. Die Frequenz des  $X_3$ , welches die serologisch noch nicht definierbaren Antigene weitergibt, ist daher 0,6.

Die Zahl der Phänotypen im SD-3-Locus läßt sich derzeit mit 22 berechnen, so daß die minimale Zahl der HL-A-Phänotypen unter der Verwendung der oben errechneten 9559 Phänotypen (in den SD-1- und SD-2-Loci) nunmehr 210298 beträgt ( $9559 \times 22 = 210298$ ). Nachdem die Antisera zur Bestimmung der SD-3-Merkmale vorerst nur in wenigen Laboratorien zur Verfügung stehen, soll hier auf eine weitere Besprechung dieses Locus verzichtet werden.

Der chemische Aufbau der HL-A-Antigene konnte bisher soweit aufgeschlüsselt werden, daß es sich dabei um Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 31000 handelt (Reisfeld u. Kahan, 1972), wobei die einzelnen antigenen Determinanten aus Aminosäuren bestehen. Nachdem als Größe für eine solche Polypeptid-Determinante bereits 5—7 Aminosäuren ausreichend sind (Kabat, 1968), kann angenommen werden, daß pro HL-A-Genprodukt mehrere Determinanten vorliegen, d. h., daß jedes HL-A-Gen mehrere Determinanten steuert. Diese Hypothese wurde durch experimentelle Untersuchungen bereits untermauert (Absorptions-Inhibitions-Test (Legrand u. Dausset, 1973) und Blockierung der Determinanten durch  $F(ab')_2$ -Fragmente von HL-A-Antikörpern (Richiardi *et al.*, 1973)) und erklärt teilweise das häufige Vorkommen von sog. „kruzereagierenden“ Antikörpern. Unter diesem Begriff versteht man Antikörper, die mit Genprodukten von mehreren Allelen reagieren, sich aber durch Absorptionen nicht trennen lassen. Innerhalb dieser kruzereagierenden Antikörper sind 2 Gruppen zu differenzieren:

a) Antikörper, die mit Determinanten reagieren, die an Genprodukten von 2 oder mehreren verschiedenen HL-A-Allelen liegen. Als Beispiel sei hier der bekannteste kruzereagierende Antikörper erwähnt, der mit HL-A2 und W28 reagiert. Dieser Antikörper bindet sich aber weder an die Determinante HL-A2 noch an die Determinante W28, sondern an eine, die sowohl an dem durch *HL-A2* als auch an dem durch *W28* gesteuerten Molekül liegt. Als Bezeichnung dafür wurde von Legrand u. Dausset (1973) die Nomenklatur  $F(HL-A2, W 28)$  vorgeschlagen, da der Antikörper mit einem Faktor reagiert, der an dem *HL-A2*- und *W28*-Genprodukt vorliegt. Hierbei handelt es sich im Prinzip nicht um echte Kreuzreaktionen, da der Antikörper

sich ja nicht an 2 verschiedene Determinanten bindet, sondern an eine Determinante, die ein enorm hohes Koppelungsungleichgewicht mit anderen (HL-A2 und W28) aufweist.

b) Antikörper, die mit 2 Determinanten reagieren, welche eine große Ähnlichkeit in ihrer Oberflächenstruktur haben (Kreuzreaktionen im engeren Sinn), wie es z. B. bei kreuzreagierenden Antikörpern gegen HL-A5 und W21 vorkommt.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich der komplexe Aufbau von Antigenen und Antikörpern des HL-A-Systems ableiten. In Anlehnung an die Überlegungen von Hirschfeld (1965) über die Interpretation von serologischen Reaktionen kann man auch hier von einem „complex-complex system“ sprechen, wie er es im Zusammenhang mit dem Rhesussystem ausführlich diskutierte (1973). Aus diesem Grund ist es verständlich, daß die serologischen Reaktionen von komplexen Sera des öfteren nur schwer zu deuten sind und daß oft nur komplizierte Methoden, wie z. B. die Blockierung von Determinanten durch  $F(ab')_2$ , zur Aufklärung der Antikörperspezifitäten zielführend sind.

Die bereits erwähnte Unterteilung einiger „supertypischen“ HL-A-Antigene (supertypisch = durch Antikörper mit breitem Wirkungsspektrum definiert) in engere, „subtypische“ Spezifitäten (subtypisch = durch Antikörper mit engem Spektrum bestimmt) (Mi u. Morton, 1966) könnte aber auch durch das Vorkommen von mehreren Determinanten an einem HL-A-Molekül erklärt werden. Als Beispiel dafür sei HL-A9 angeführt, das in W23 und W24 aufgespalten werden kann (Joint Report 1972): hier liegen am Genprodukt von HL-A9 mindestens 2 Determinanten vor: eine Determinante HL-A9 und eine weitere, die entweder W23 oder W24 entspricht (Legrand u. Dausset, 1973). Formalgenetisch kann daher das Gen *HL-A9* innerhalb der multiplen Allele des SD-1-Locus durch 2 weitere Allele (*W23* und *W24*) ersetzt werden. Eine ähnliche Situation liegt bei HL-A10 und W21 vor, die in W25 und W26 bzw. SL-ET und ET\* zu unterteilen sind, wobei die Faktoren W25 und W26 an einem Molekül mit der Hauptdeterminante HL-A10 und SL-ET und ET\* an einem Molekül mit W21 liegen. Eine weitere, noch komplexere Gruppe liegt in Gestalt des Merkmals W19 vor: dieses Merkmal wird in W29, W19.2, W32 und W19.6 unterteilt, wobei W19.2 selbst noch in W30 und W31 zu zergliedern ist. Die Faktoren W29, W30, W31, W32 und W19.6 sind auch hier wiederum durch multiple Allele des SD-1-Locus gesteuert (Joint Report 1972).

Die Unterteilung einiger HL-A-Merkmale bewirkt eine bessere Differenzierung der einzelnen Individuen, wie dies für Abstammungsfragen von größtem Vorteil ist; ihre praktische Anwendung bleibt aber derzeit noch beschränkt, da vorerst nur wenige Testsera zur Definition der subtypischen Faktoren zur Verfügung stehen.

Trotz der hier geschilderten Probleme bezüglich des komplexen Aufbaus der Antigene wird aber die Anwendbarkeit des HL-A-Systems für die Paternitäts-serologie nicht gemindert. Sind keine Antisera zur Definition der subtypischen Spezifitäten vorhanden, ist es ohne weiteres möglich, Antikörper gegen die supertypischen Faktoren zu verwenden, wobei allerdings die aus den Resultaten gewonnenen Informationen etwas eingeschränkt sind.

Auch wenn ein Gutachter noch nicht in der Lage ist, alle Antigene der 2 Loci zu definieren, ist es für ihn möglich, strittige Abstammungsfragen zu beurteilen; er hat dabei aber zu berücksichtigen, daß in einem solchen Fall die X-Allele auch alle jene Gene umfassen, deren Genprodukte er nicht bestimmen kann.

## IV. Anwendung des HL-A-Systems in der Paternitätsserologie

### 1. Grundlagen der Anwendbarkeit

Um ein Erbmerkmalsystem in der Paternitätsserologie anwenden zu können, müssen eine Reihe von Kriterien erfüllt werden (s. Prokop u. Uhlenbruck, 1966; Race u. Sanger, 1968):

- a) gesicherter Erbgang,
- b) Umweltstabilität der Merkmale,
- c) Zuverlässigkeit und Einfachheit der Bestimmungsmethode.

Das HL-A-System genügt allen diesen Forderungen:

ad a) Wie im Abschnitt III gezeigt, wird der Großteil der bisher bekannten HL-A-Merkmale über 2 eng gekoppelte Loci mit multipler Allelie weitergegeben, wobei die einzelnen Merkmale einen dominanten Erbgang aufweisen.

ad b) Die HL-A-Merkmale sind bereits mittels der Mischzellagglutination bei 6 Wochen alten Embryonen (Seigler u. Metzgar, 1970) und bei 10 Wochen alten Feten (Ceppellini *et al.*, 1971) im lymphocytotoxischen Test nachweisbar. Sie sind bei der Geburt voll ausgeprägt und weisen bei gesunden Individuen keine Veränderungen auf. Im Gegensatz zu den Erbmerkmalen der Erythrocyten und vor allem des Serums, bei denen monatelang nach einer Bluttransfusion oder Gammaglobulinapplikation Spenderantigene im Empfänger nachweisbar sein können, spielen transfundierte Lymphocyten für die Bestimmung der HL-A-Merkmale mit Hilfe des lymphocytotoxischen Tests keine Rolle. Selbst nach der Transfusion von 6 l Frischblut waren nur bei 3 von 25 Fällen kurzzeitig Änderungen der Reaktionen im lymphocytotoxischen Test zu beobachten, die innerhalb einiger Stunden wiederum verschwanden (Ting *et al.*, 1969).

Bei einigen Krankheitsformen wurden Alterationen des HL-A-Typs gefunden, so z. B. bei einem Fall von Morbus Hodgkin, bei dem nach intensiver Bestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$  ungefähr 10 Wochen lang keine HL-A-Antigene nachweisbar waren (Bertrams *et al.*, 1971). Weiter konnten bei einigen Fällen von akuter myeloischer Leukämie (Evans u. Pegrum, 1973), schwerer kombinierter Immundefizienz (Sanderson *et al.*, 1972; Terasaki *et al.*, 1972) und bei einigen Patienten, die mit Tetracyclin (Ben-David *et al.*, 1973) behandelt wurden, Änderungen im HL-A-Typ registriert werden. Solche äußerst seltenen Beobachtungen, die außerdem noch der Bestätigung bedürfen, beeinträchtigen die Anwendbarkeit des HL-A-Systems kaum, wenn der Gutachter dies anamnestisch berücksichtigt. Bei einigen Leukämiefällen sind ebenfalls Änderungen in der Ausprägung der Isoagglutinogene der klassischen Blutgruppen bekannt (s. Prokop u. Uhlenbruck, 1966; Race u. Sanger, 1968), ohne daß dadurch die Verwendbarkeit des ABO-Systems eingeschränkt wird.

Eine Schwierigkeit, die bei der Gewebstypisierung von Neugeborenen auftreten kann, ist, daß in seltenen Fällen die Mutter „blockierende Antikörper“ gegen kindliche, vom Vater stammende Merkmale bildet (Tiilikainen *et al.*, 1974). Diese sind nicht in der Lage, die kindlichen Lymphocyten bei Komplementzusatz zu töten, verhindern aber die Anlagerung von Testsera an die väterlichen Antigene, so daß bei dem Neugeborenen nur die von der Mutter stammenden HL-A-Merkmale nachweisbar sind. Dieses Phänomen ist aber nur kurze Zeit nach der Geburt auffindbar, da der Metabolismus der HL-A-Antigene an der Lymphocytenoberfläche rasch die Antigen-Antikörper-Komplexe mit den blockierenden Antikörpern abbaut. Diese Schwierigkeiten können umgangen werden, indem man die kindlichen Lymphocyten ca. 12 Std bei  $+37^{\circ}\text{C}$  in einem Zellkulturmedium inkubiert, wobei die Antigen-Antikörper-Komplexe von der Zelloberfläche abgestoßen werden und im nachfolgenden Test die Antikörperanlagerung an neugebildete Antigene und die Komplementeinwirkung nicht mehr hemmen können (Bernoco *et al.*, 1971). Diese Erscheinung, die für die Paternitätsserologie kaum von Wichtigkeit ist, da in der Regel keine neugeborenen Kinder untersucht werden, sei nur der Vollständigkeit halber angeführt.

ad c) Die Reproduzierbarkeit der Testresultate mit den einzelnen Sera im mikrolymphocytotoxischen Test ist höher als 99% (Mittal *et al.*, 1968). Nachdem die Gewebstypisierung außerdem nie mit einem einzigen Serum pro Spezifität (s. IV. 5.) durchgeführt wird, liegt die Reproduzierbarkeit der HL-A-Befunde praktisch bei 100%. Die Einfachheit des lymphocytotoxischen Testes konnte bei den 5 Gewebstypisierungskursen, welche am Institut für Blut-

gruppenserologie der Universität Wien bisher abgehalten wurden, demonstriert werden, da alle Teilnehmer innerhalb kurzer Zeit in der Lage waren, selbständig den Test durchzuführen.

Wie großangelegte Vergleichsuntersuchungen zeigten, welche in letzter Zeit unter anderem vom Europarat oder im Rahmen einer Arbeitstagung an der Blutbank in Olomouc, ČSSR (Bártová u. Mayr, 1974), durchgeführt wurden und an denen insgesamt über 15 Laboratorien teilnahmen, ist die Standardisierung der Definition der einzelnen Merkmale sehr weit gediehen (gewisse Schwierigkeiten liegen nur in der Bestimmung der subtypischen Faktoren von HL-A9, HL-A10 und W19.2 vor). Diese Vereinheitlichung wird in naher Zukunft durch die Erstellung eines Satzes von Referenztestsera unter den Auspizien des Europarates noch weiter ausgebaut.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das HL-A-System alle Kriterien, die für die Anwendbarkeit eines Systems in der Paternitätsserologie gefordert werden, erfüllt. Die größten, in der Praxis auftretenden Probleme, und zwar bezüglich der Testsera, werden in Abschnitt IV.5. in extenso besprochen.

## 2. Ausschlußkonstellationen, Ausschlußchance und Beweiswert

Basierend auf der im Abschnitt 3 eingehend beschriebenen Formalgenetik des HL-A-Systems können drei verschiedene Ausschlußkonstellationen unterschieden werden (Mayr, 1971):

a) Das Kind besitzt ein HL-A-Merkmal, das weder seine Mutter noch der Präsumtivvater aufweist. Diese Ausschlußkonstellation beruht auf dem kodominanten Erbgang der einzelnen HL-A-Merkmale. Beispiel: Mutter: HL-A1, HL-A3, HL-A7, HL-A8; Kind: HL-A1, HL-A2, HL-A8, HL-A12; Präsumtivvater: HL-A1, HL-A9, HL-A12, HL-A13. Die allgemeine Vaterschaftsausschlußchance (AVACH), welche mit Hilfe der Haplotypenfrequenzen in der südwestdeutschen Bevölkerung unter Berücksichtigung des Koppelungsungleichgewichtes zwischen den beiden Loci berechnet wurde (Mayr, 1971), beträgt 82%, d. h., daß 82 von 100 Nichtvätern bereits auf Grund einer derartigen Konstellation im HL-A-System von der Vaterschaft auszuschließen sind (AVACH im SD-1-Locus 55%, im SD-2-Locus 67%). Da die Zahl der kritischen Fälle (Zahl der nichtmerkmaltragenden Kinder von Eltern, die das Antigen ebenfalls nicht besitzen) für den Erbgang jedes der Merkmale des SD-1- und des SD-2-Locus bereits zwischen 622 und 3107 liegt, ist die maximale Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Formulierung eines solchen Ausschlusses kleiner als 1%, wodurch einem derart gelagerten Fall der Terminus „Vaterschaft sehr unwahrscheinlich“ zuzuordnen ist (Mayr u. Hiller, 1974). Diese erwähnte Irrtumswahrscheinlichkeit ist aber kein reeller Wert, sondern eine rein rechnerisch ermittelte Größe, die, basierend auf der Zahl der derzeit publizierten Familienuntersuchungen, den Maximalwert von eventuell auftretenden Abweichungen angibt.

Ausschlüsse, die in beiden Loci vorliegen, potenzieren sich allerdings, da die Genprodukte der beiden Loci voneinander unabhängig an der Zelloberfläche liegen und durch völlig verschiedene Testsera definiert werden. Finden sich sowohl im SD-1- als auch im SD-2-Locus Konstellationen, bei denen das Kind ein Antigen besitzt, welches der Kindesmutter und dem Präsumtivvater fehlt, so ist die gesamte Irrtumsquote kleiner als  $0,1\%_{00}$  ( $0,01 \times 0,01 = 0,0001$ ). Daher kann in einem solchen Ausschlußfalle der Terminus „Vaterschaft offenbar unmöglich“ angewandt werden (Speiser, 1973).

b) Das Kind bzw. der Präsumtivvater besitzen in einem Locus 2 nachweisbare Merkmale, die dem anderen Individuum fehlen, wobei keine unter Punkt a) ange-

führte Situation vorliegt. Dieser Ausschluß beruht auf der Allelie der Gene innerhalb der 2 Loci, und seine AVACH beträgt sowohl im SD-1- als auch im SD-2-Locus 14%. Beispiele: Mutter: HL-A1, HL-A3, HL-A7, HL-A8; Kind: HL-A1, HL-A3, HL-A8, W5; Präsumtivvater: HL-A2, HL-A9, HL-A12, W5 oder HL-A2, HL-A12, W5 oder HL-A12, W5. Mutter: HL-A1, HL-A3, HL-A7, HL-A8; Kind: HL-A1, HL-A8, W17; Präsumtivvater: HL-A2, HL-A9, HL-A12, W17.

Der Beweiswert dieser Ausschlüsse ist allerdings wegen mehrerer Ursachen eingeschränkt. Die Zahl der kritischen Fälle ist durch den enormen Polymorphismus des HL-A-Systems gering, wobei als kritisch für diese Ausschlußsituation nur Familien des Typs  $AaBb \times aabb$  gelten, d. h., daß bei einem Elternteil die Allele  $A$  und  $B$  in heterozygoter Form vorkommen, während sie beim anderen fehlen. Innerhalb der Kinder solcher Familien müssen bei Allelie von  $A$  und  $B$  alle Kinder entweder  $A+B-$  oder  $A-B+$  sein. Aus Mutter-Kind-Paaren ist bezüglich der Allelie von 2 Genen  $A$  und  $B$  auch eine, allerdings geringere Information zu gewinnen, da eine  $A+B+$ -Mutter keine  $A-B-$ -Kinder haben kann und vice versa.

Eine andere mögliche Einschränkung des Beweiswertes läßt sich aus dem Aufbau der HL-A-Moleküle ableiten, der im Abschnitt III bereits diskutiert wurde. Nachdem am HL-A-Molekül mehrere Determinanten vorliegen, ist es vorstellbar, daß die Allele jedes der 2 SD-Loci zwar von einem Gen gesteuert werden, nicht aber unbedingt durch homologe Stellen dieser Gene. Es könnte hier eine Situation vorliegen, wie sie vom Gm-System bekannt ist. Bei diesem Erbmerkmalsystem der schweren Ketten der IgG dürften die Determinanten  $Gm^a$  und  $Gm^f$ , obwohl sie in der weißen Rasse praktisch durch Allele definiert werden, nicht an homologen Stellen der Gammaglobulinmoleküle liegen, wie es durch eingehende biochemische Untersuchungen bewiesen werden konnte (s. Natvig u. Kunkel, 1973). Weiter darf bei dieser Ausschlußkonstellation die Möglichkeit einer Deletion nicht außer acht gelassen werden, wenngleich das Auftreten eines derartigen Ereignisses eine äußerste Seltenheit darstellen dürfte und bisher im HL-A-System noch nicht nachgewiesen wurde.

Trotz der guten Übereinstimmung der Phänotypenfrequenzen in den beiden Loci mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und des Fehlens einer Beobachtung, welche eine Abweichung von der postulierten Allelie zeigen würde, sollten derartige Ausschlüsse vorsichtig und höchstens mit dem Terminus „Vaterschaft unwahrscheinlich“ (maximale Irrtumswahrscheinlichkeit 4%) formuliert werden. Bezüglich des Beweiswertes gelten für die hier angeführten Ausschlüsse analoge Überlegungen, wie sie unter Punkt a) erwähnt wurden, d. h., daß solche Ausschlüsse im SD-1- und SD-2-Locus mit einer maximalen Irrtumsquote von 0,16% ( $0,04 \times 0,04 = 0,0016$ ) belastet sind. Wenn in einem Locus ein Ausschluß vorkommt, bei dem das Kind ein HL-A-Merkmal aufweist, welches der Mutter und dem Präsumtivvater fehlt, und im anderen Locus einer nach Punkt b), so wäre die maximale Irrtumsquote  $0,4^0/00$  ( $0,01 \times 0,04 = 0,0004$ ) (Speiser, 1973).

c) Das Kind besitzt einen Haplotyp, der dem Präsumtivvater fehlt, wobei kein unter Punkt a) oder b) angeführter Ausschluß vorliegt. Diese Situation beruht auf der gekoppelten Vererbung der Gene des SD-1-Locus mit jenen des SD-2-Locus. Grundvoraussetzung hierbei ist allerdings, daß die Genotypen der 3 Beteiligten eindeutig bestimmbar sind (die des Präsumtivvaters mit Hilfe der Untersuchung seiner Blutsverwandten). Beispiel: Mutter:  $HL-A1, HL-A8/HL-A3, HL-A7$ ;

Kind: *HL-A2,HL-A12/HL-A3,HL-A7*; Präsumtivvater: *HL-A2,HL-A5/HL-A9,HL-A12*. Bei dieser Ausschlußkonstellation (geringe AVACH) muß aber stets mit dem Vorkommen einer Rekombination gerechnet werden, die in ca. 0,61% der Meiosen auftritt. Die obere Schranke dieses Wertes (statistische Sicherheit 99,8%), welche mittels der Poisson-Verteilung berechnet wurde, beträgt 1,54%, das bedeutet, daß bei dieser Ausschlußkombination Abweichungen auftreten, und zwar mit einer maximalen Frequenz von 1,54%. Aus diesem Grund sind derartige Situationen mit Vorsicht zu verwenden. Sie können aber wohl zur Erhärtung von Ausschlüssen in anderen Systemen dienen.

Die gesamte AVACH im HL-A-System beträgt 91%. Die Untersuchungen der anderen, an Erythrocyten, im Serum und im Speichel nachweisbaren Erbmerkmalsysteme: ABO mit Untergruppen, MNSs, P, Kk, Fy(a,b), Rh(C,c,C<sup>w</sup>,D,E,e), Jk(a,b), Lu(a,b), Xg(a), Se, SEP, PGM<sub>1</sub>, AK, ADA, GPT, Gm(a,x,f), Inv(l), Hp, Ge und Pt bringen eine AVACH von 95,4% (Speiser, 1972b; Mayr, unveröffentlicht). Bei Einbeziehung des HL-A-Systems steigt dieser Wert auf 99,6%, so daß die serologischen und biochemischen Untersuchungen der angeführten Erbmerkmalsysteme die Erkennung von nahezu allen Nichtvätern ermöglichen. Bei der Berechnung dieser gesamten AVACH sind allerdings in jedem System auch jene Ausschlußkonstellationen inbegriffen, die durch die Annahme einer Homozygotie beim Präsumtivvater und/oder Kind bedingt sind und die grundsätzlich eine geringere Beweiskraft haben, besonders dann, wenn diese Ausschlüsse isoliert vorliegen. Aus diesem Grund wurde in analoger Weise zu Speiser (1972b) die AVACH der Ausschlüsse, bei denen das Kind ein Merkmal aufweist, welches der Kindesmutter und dem Präsumtivvater fehlt und denen ein sehr hoher Beweiswert zukommt, für alle Systeme (Genfrequenzen aus Mayr *et al.* (1970) und Speiser (1972b)) berechnet und deren kombinierte AVACH nach der Formel

$$1 - (1-a)(1-b)(1-c) \dots (1-n)$$

zusammengestellt. Der Vergleich dieser 2 Ausschlußmöglichkeiten ist in Tabelle 5 und in Abb. 1 angegeben, woraus zu ersehen ist, daß bei Miteinbeziehung des HL-A-Systems die AVACH aller Situationen, bei denen das Kind ein Merkmal aufweist, das seiner Mutter und dem Präsumtivvater fehlt, 96,1% erreicht (im Vergleich zu den 99,6% der alles umfassenden Ausschlußkonstellationen). Bei Berücksichtigung des HL-A-Systems wird man daher in den meisten Fällen auf diejenigen Ausschlüsse verzichten können, die durch Rückschlüsse auf die Homozygotie erwachsen.

Hier soll aber nochmals darauf hingewiesen werden, daß zwei oder mehrere Ausschlüsse in verschiedenen Loci, die auf der Deduktion der Homozygotie beruhen, die Irrtumswahrscheinlichkeit verringern, da nicht anzunehmen ist, daß bei allen diesen Loci eine Variante, ein stilles Allel oder eine Deletion vorliegt. Dadurch steigt der Beweiswert solcher Ausschlußkombinationen stark an (Speiser, 1973).

Abb. 1. Kombinierte allgemeine Vaterschaftsausschlußchancen (AVACH). Kurve A und schwarze Säulen: Berücksichtigung aller Ausschlußkonstellationen. Kurve B und weiße Säulen: Berücksichtigung der Konstellationen, bei denen das Kind ein Merkmal besitzt, welches der Mutter und dem Präsumtivvater fehlt

Tabelle 5. Allgemeine Vaterschaftsausschließchancen (einzeln und kombiniert) unter Berücksichtigung aller Ausschließkonstellationen sowie der Situationen, bei denen das Kind ein Merkmal besitzt, welches der Mutter und dem Präsumtivvater fehlt (-/+/-Ausschlüsse)

System	Allgemeine Vaterschaftsausschließchance (AVACH)			
	alle Ausschlüsse		nur -/+/-Ausschlüsse	
	AVACH (%)		AVACH (%)	
	einzeln	kombiniert	einzeln	kombiniert
ABO	20		16	
MNSs	32	45,6	13	26,9
Rh	29	61,4	16	38,6
K	4	62,9	4	41,1
P	3	64,0	3	42,9
Fy	18	70,5	6	46,3
Jk	19	76,1	6	49,5
Lu	3	76,8	3	51,0
Xg	5	78,0	1	51,5
Se	2	78,4	2	52,5
SEP	25	83,8	13	58,7
AK	3	84,3	3	59,9
PGM <sub>1</sub>	16	86,8	8	63,1
ADA	5	87,5	5	64,9
GPT	19	89,9	6	67,0
Hp	18	91,7	7	69,3
Gc	16	93,0	8	71,8
Gm	20	94,4	11	74,9
Inv	6	94,7	6	76,4
Pt	14	95,4	8	78,3
HL-A	91	99,6	82	96,1

% AVACH

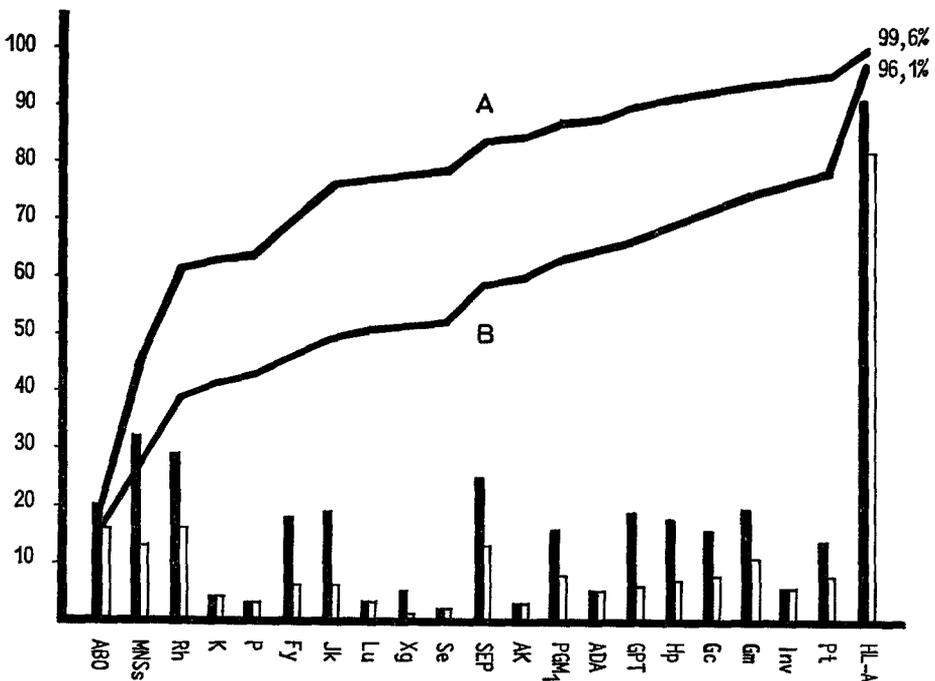


Abb. 1

### 3. Biostatistische Berechnungen

Die Methode zur Berechnung der  $\lg Y/X + 10$ -Werte der Vaterschaftswahrscheinlichkeit nach Essen-Möller wurde bereits publiziert (Mayr, 1972). Die damit erhaltenen Werte können zu den Werten der anderen Erbmerkmalsysteme, welche aus den von Hummel (1971) zusammengestellten Tabellen zu entnehmen sind, addiert werden. Aus der Endsumme der  $\lg Y/X + 10$ -Werte ergeben sich dann Hinweise für oder gegen die Vaterschaft eines Präsuntivvaters. Nachdem die Zahl der möglichen Mutter-Kind-Präsuntivvater-Kombinationen im HL-A-System weit über 100000 beträgt und wegen des Fehlens einzelner Antisera bei verschiedenen Gutachtern, wodurch die Frequenz der X-Allele variiert, wurden die  $\lg Y/X + 10$ -Werte für das HL-A-System noch nicht in Tabellenform veröffentlicht. Es liegen aber bereits Computerprogramme für ihre Berechnung vor (Hummel, 1973), falls man sie nicht für jeden Fall einzeln errechnen möchte, was aber keinen allzu großen Arbeitsaufwand darstellt. Desgleichen liegen auch Tabellen zur Berechnung der Zufallswahrscheinlichkeit im HL-A-System vor (Spielmann u. Seidl, 1974), die aber, wie bereits von Hummel (1969) ausführlich diskutiert, eine geringere Information als die Vaterschaftswahrscheinlichkeit nach Essen-Möller besitzt.

Formeln zur Berechnung der Vaterschaftsausschlußchance bei speziellen Mutter-Kind-Kombinationen sind in Ausarbeitung und werden in Kürze zur Verfügung stehen (Mayr u. Pausch, in Vorbereitung).

### 4. Praktische Anwendung des HL-A-Systems

Das HL-A-System wird bereits von mehreren Gutachtern in verschiedenen Ländern (Bundesrepublik Deutschland, Dänemark, Frankreich, Italien, Österreich, Schweiz, Tschechoslowakei) für die Klärung strittiger Abstammungsfragen mit erwartet guten Ergebnissen verwendet (Bártová, pers. Mittlg.; Curtioni, pers. Mittlg.; Gürtler, 1973; Hiller, pers. Mittlg.; Jeannet *et al.*, 1972; Mayerová *et al.*, 1972; Seidl u. Spielmann, 1973; Soulier *et al.*, 1972; Speiser, 1973). Dabei handelt es sich im allgemeinen um problematische Fälle, bei denen z. B. ein isolierter Ausschluß, welcher auf der entgegengesetzten Homozygotie beruht, bekräftigt werden soll, oder um Mehrmannfälle, bei denen mittels der üblichen Methoden keiner der beteiligten Männer von der Vaterschaft auszuschließen war. Der Wert des HL-A-Systems dokumentiert sich sowohl bei der Feststellung der Nichtvaterschaft als auch bei der Ermittlung der biostatistischen Vaterschaftswahrscheinlichkeit. Wegen seines großen Polymorphismus eignet sich das HL-A-System besonders auch für jene Paternitätssachen, bei denen die Kindesmutter oder der Präsuntivvater verstorben oder nicht greifbar sind, aber deren Blutsverwandten zur Verfügung stehen (Bender u. Mayerová, 1973; Speiser *et al.*, 1974). In solchen Fällen ist es oft möglich, die 2 Haplotypen und damit den Genotyp der oder des Verstorbenen zu rekonstruieren, woraus sich dann im allgemeinen eine Aussage über die Vaterschaft ableiten läßt.

Diese Sicherheit der Aussage des HL-A-Systems in der Paternitätsserologie konnte im Rahmen von eigenen Familienuntersuchungen untermauert werden. Bei 36 Familien mit 127 Kindern, bei welchen neben HL-A auch die Erbmerkmalsysteme AB0, MNSs, P, Kk, Fy(a,b), Rh(C,c,C<sup>w</sup>,D,E,e), Jk(a,b), Lu(a,b), Xg(a), Le(a,b), SEP, PGM<sub>1</sub>, AK, ADA, GPT, Gm(a,x,f), Inv(l), Hp, Gc, Pt, ABH-Se

und Le(a,b)-Se untersucht wurden, fanden sich 2 illegitime Kinder. Beide gesetzlichen Väter waren im HL-A-System auszuschließen, in einem Fall zusätzlich noch im AB0-, MNSs- und Gc-System, im anderen im AB0-, MNSs-, Rh- und Lu-System.

##### 5. Fehlerquellen bei der Bestimmung der HL-A-Merkmale unter besonderer Berücksichtigung der Paternitätsserologie

Das Hauptproblem in der serologischen Bestimmung der HL-A-Antigene liegt derzeit in der Beschaffung von einwandfrei reagierenden Antisera. Wie bereits angeführt, liegen an einem HL-A-Molekül mehrere Determinanten vor, so daß in den verwendeten Testsera sehr häufig ein starker Antikörper gegen die Hauptdeterminante zu finden ist (z. B. Anti-HL-A2), daneben aber noch schwächere Begleitantikörper gegen andere Determinanten desselben Moleküls (im erwähnten Fall Anti-F(HL-A2,W28)). Nachdem im lymphocytotoxischen Test der Gendosis-Effekt (Antisera reagieren mit Lymphocyten homozygoter Genträger stärker als mit jenen heterozygoter) eine große Rolle spielt und auch häufig ein Synergismus von Antikörpern nachweisbar ist (ein Antikörper der Spezifität Anti-HL-A2 + Anti-HL-A5 reagiert mit HL-A2-positiven, HL-A5-positiven Lymphocyten stärker als mit HL-A2-positiven, HL-A5-negativen oder HL-A2-negativen, HL-A5-positiven) (Ahrons u. Thorsby, 1970), muß stets an das Vorhandensein solcher Begleitantikörper gedacht werden.

Als Beispiel eines Fehlers auf Grund des Gendosis-Effektes sei folgender Fall angeführt: Vater: *HL-A2,HL-A5/HL-A3,HL-A7*; Mutter: *HL-A2,HL-A12/HL-A9,W15*; Kind: *HL-A2,HL-A5/HL-A2,HL-A12*. Bei der Gewebstypisierung des Kindes zeigte sich, daß ein in Auswertung stehendes und sonst nur W28 anzeigendes Antiserum mit den kindlichen Zellen reagierte. Weiterhin angestellte eingehende Analysen erbrachten, daß dieses Serum in Wirklichkeit neben dem Hauptantikörper Anti-W28 eine schwache Begleitkomponente gegen F(HL-A2, W28) aufwies, welche nur mit Lymphocyten von HL-A2-homozygoten Individuen reagierte. Wäre bei der Gewebstypisierung bei der eben angeführten Familie nur dieses eine Anti-W28-Serum angewendet worden, hätte man das Kind als W28-positiv bestimmt und damit fälschlich einen Ausschluß des Kindesvaters konstruiert.

Als Beispiel für den Synergismus von Antikörpern sei folgendes Antiserum erwähnt: Im Serum einer Multipara (BS Sh) konnte ein Antikörper der Spezifität Anti-HL-A7 gefunden werden, der an einem begrenzten Lymphocytenpanel von 30 ausgewählten Spendern streng spezifisch reagierte. Die weiteren Analysen dieses Serums mittels einer äußerst empfindlichen Methode, die ca. 100mal so sensibel wie der lymphocytotoxische Test in der NIH-Standardmethode ist, ergab aber, daß folgende Antikörper in diesem Serum enthalten sind: Anti-HL-A7 + Anti-F(HL-A7,W10) + Anti-F(HL-A7,W22) + Anti-F(HL-A7,W27) + Anti-F(HL-A7, W10,W22,W27) (Trinchieri *et al.*, 1973). Diese Daten wurden auch dadurch gestützt, daß der Antikörper im lymphocytotoxischen Test mit Lymphocyten, die gleichzeitig zwei der Merkmale W10, W22 oder W27 besaßen, positiv reagierte. Demnach wären bei der Konstellation Vater: *HL-A2,W22/HL-A3,W15*; Mutter: *HL-A1,HL-A8/HL-A9,W27*; Kind: *HL-A2,W22/HL-A9,W27* die Zellen des Vaters und der Mutter mit dem erwähnten Anti-HL-A7(BS Sh)-Serum negativ, während die des Kindes eine positive Reaktion zeigten. Wenn in einem derart gelagerten Fall einem Untersucher keines der eher selten vorkommenden reinen Anti-W22-Sera zur Verfügung stünde, sondern nur Sera der Spezifität Anti-HL-A7 + W22 sowie das erwähnte Serum BS Sh zur Definition von HL-A7, so würden

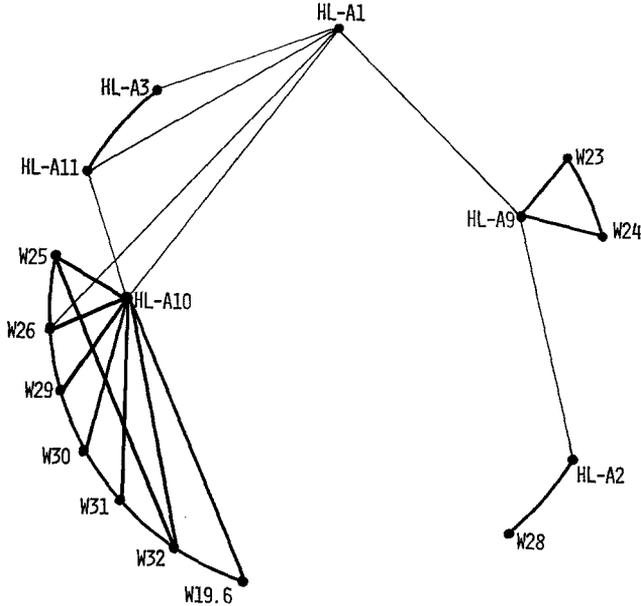


Abb. 2. Kreuzreaktionen im HL-A-System: SD-1-Locus. Dicke Linien = häufig vorkommende Kreuzreaktionen, dünne Linien = selten vorkommende Kreuzreaktionen

die Phänotypen der Eltern als HL-A2, HL-A3, W15, W22 bzw. HL-A1, HL-A9, HL-A8, W27 bestimmt werden, der des Kindes jedoch fälschlicherweise als HL-A2, HL-A9, HL-A7, W27. Durch die Wertung des Kindes als HL-A7-positiv zeigt dieses ein Merkmal, das sowohl seiner Mutter als auch dem Vater fehlt, woraus ein falscher Vaterausschluß resultierte. Aus diesem Grund ist die Kenntnis der Antigengruppen, gegen die häufig „kruzereagierende Antikörper“ gebildet werden, wobei aber hier nicht unterschieden werden soll, ob es sich um Kreuzreaktionen im engeren Sinn oder um Kreuzreaktionen durch das gleichzeitige Vorliegen einer Determinante am Genprodukt mehrerer Allele handelt, von großer Bedeutung. Die wichtigsten dieser kruzereagierenden Gruppen sind in Abb. 2 und 3 verzeichnet (Mayr, 1974 a).

Ferner ist noch hinzuzufügen, daß nicht alle lymphocytotoxischen Antikörper gegen Merkmale des HL-A-Systems gerichtet sind. Wenn auch selten, so reagieren manche mit dem Antigen Le(a), das an Lymphocyten aller Individuen vorhanden ist, deren Erythrocyten Le(a)-positiv sind (Dorf *et al.*, 1972); andere wiederum mit dem Antigen R.B. (Mayr u. Mayr, 1974), das mit wenigen Ausnahmen bei allen Lymphocyten der Individuen vorkommt, welche die Gene  $A_1$  der klassischen Blutgruppen und *Se* der ABH-Sekretion tragen. Das Vorkommen solcher Antikörper in HL-A-Testsera kann ebenfalls zu Problemen und falschen Beurteilungen führen, da die Antigene Le(a) und R.B. auf der Interaktion von je 2 unabhängigen Loci beruhen und daher keinem dominanten Erbgang folgen.

Basierend auf den oben angeführten möglichen Fehlerquellen ist es absolut notwendig, daß alle Sera, welche zur Definition von HL-A-Antigenen verwendet

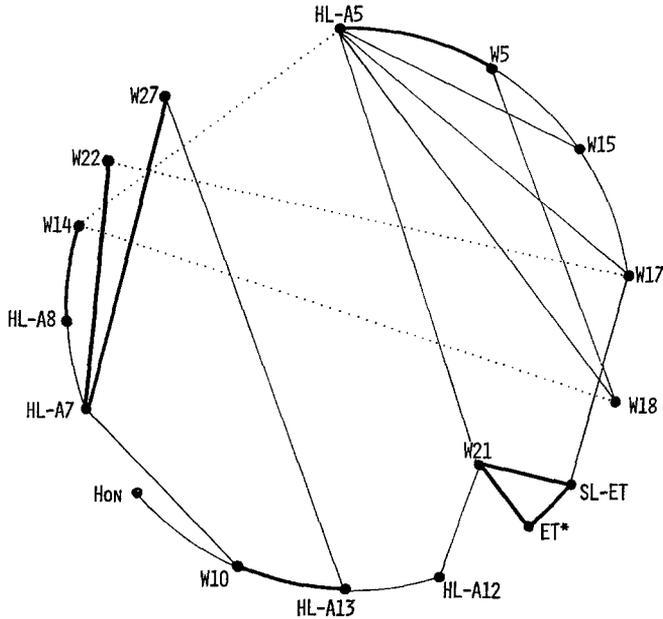


Abb. 3. Kreuzreaktionen im HL-A-System: SD-2-Locus. Dicke Linien = häufig vorkommende Kreuzreaktionen, dünne Linien = selten vorkommende Kreuzreaktionen, punktierte Linien = noch nicht gesicherte Kreuzreaktionen

werden sollen, von jedem einzelnen Untersucher in der ihm gewohnten Technik gegen eine große Anzahl von Lymphocyten von Individuen mit bekanntem Antigenmuster ausgewertet werden müssen, bevor sie routinemäßig Verwendung finden. Zum Aufdecken von Begleitantikörpern ist die Berücksichtigung der kreuzreagierenden Gruppen, der klassischen Blutgruppen, des Lewis-Systems sowie des ABH-Ausscheidersystems der Lymphocytenspender notwendig. Die größte Information über die Qualität von Antisera bringen aber immer Familienuntersuchungen, bei denen Unregelmäßigkeiten in der Reaktivität am leichtesten erkannt werden können. Aus diesen Schwierigkeiten ist die Forderung abzuleiten, daß in Paternitätsfällen mindestens 3 eingehend analysierte Antisera zur Definition eines HL-A-Merkmals verwendet werden und daß das Vorhandensein des korrespondierenden Antigens erst bei positiver Reaktion aller verwendeten Sera derselben Spezifität als gesichert gelten kann. Dieses rigorose Verlangen dürfte derzeit aber nur von wenigen Untersuchern erfüllbar sein.

Eine andere Quelle von Schwierigkeiten bei der Verwendung des lymphocytotoxischen Tests stellt das Kaninchenserum dar, welches das für den Test notwendige Komplement liefert. Dabei kommt es aber nicht nur auf die Komplementquantität, welche mittels des hämolytischen Titers gegen sensibilisierte Hammelerythrocyten gemessen wird, an, sondern auf thermolabile sublytische Heteroantikörper gegen humane Antigene (Ferrone *et al.*, 1974). Nachdem der genaue Mechanismus der Wirkung des Kaninchensersums bisher nicht bekannt ist, konnte noch keine Standardisierung erreicht werden. Für Laboratorien mit umfangreichem Arbeitsanfall an Gewebstypisierungen ist es der einfachste Weg, eine große

Menge von Kaninchensera zu gewinnen und zu mischen (100—200 Tiere), welche in kleine Mengen portioniert bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) gelagert bzw. lyophilisiert wird und dann über eine längere Zeitspanne verwendet werden kann. Beim Wechsel von einer Komplementcharge zu einer anderen ist es stets unerlässlich, die Aktivitäten der beiden Chargen miteinander zu vergleichen, um eine gleichbleibende Empfindlichkeit des Tests zu garantieren.

Der Vollständigkeit halber sei noch eine eher selten anzutreffende Fehlerquelle erwähnt, die in schwach ausgeprägten HL-A-Merkmalen zu finden ist. Von diesem Phänomen ist erst ein einziger Fall in der Literatur zu finden (Mayr u. Mayr, 1972). Dabei handelt es sich um einen Vater und dessen Tochter, die ein schwach ausgeprägtes HL-A2 besitzen, während die Mutter HL-A2-negativ ist. Die Reaktivität der Lymphocyten der Tochter war aber mit einigen Anti-HL-A2-Sera stärker als mit den Zellen des Vaters, so daß auch in diesem Fall, bei Verwendung von nur einem Anti-HL-A2-Testserum, möglicherweise ein falscher Ausschluß des Vaters hätte gefolgert werden können.

Abschließend sei festgestellt, daß das HL-A-System das menschliche Erbmerkmalsystem mit der bisher höchsten Vaterschaftsausschlußchance (91%) ist. Der Erbgang der einzelnen Merkmale ist so gut erforscht, daß einem Ausschluß, bei dem das Kind ein Antigen aufweist, welches seiner Mutter und dem Präsuntivater fehlt, eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit von derzeit nur 1% entspricht, wobei die gesamte Vaterschaftsausschlußchance allein dieser Konstellation 82% ausmacht. Was den technischen Arbeitsaufwand betrifft, ist das HL-A-System mit seiner allgemeinen Vaterschaftsausschlußchance von 91% auch dem Gesamtaufwand aller anderen Systeme mit einer kombinierten allgemeinen Vaterschaftsausschlußchance von 95,4% weit überlegen, da sämtliche Befunde einer Gewebstypisierung, inklusive Blutentnahme und Isolation der Lymphocyten, innerhalb eines Arbeitstages vorliegen, während die Auswertungen aller anderen angeführten Erbmerkmalsysteme ungefähr 1 Woche dauern.

Das Hauptproblem, das die weite Ausbreitung dieses Systems in allernächster Zeit einschränkt, ist die Schwierigkeit, entsprechende Antisera zu erhalten. Trotz der großen Anstrengungen der Industrie in dieser Beziehung ist die Qualität der derzeit am Markt erhältlichen HL-A-Testsera manchmal nicht optimal und auch die Zahl der zur Verfügung stehenden Spezifitäten begrenzt. Nachdem aber immer mehr Firmen in der Lage sein werden, HL-A-Testsera anzubieten, bleibt zu hoffen, daß in Zukunft die Durchführung von HL-A-Gutachten nicht nur auf einige wenige Speziallaboratorien beschränkt bleibt. Es muß aber nochmals darauf hingewiesen werden, daß die Bestimmung der HL-A-Merkmale einige Probleme mit sich bringt, die bei den Nachweistechiken der bisher üblicherweise in der Paternitätsserologie verwendeten Erbmerkmalsysteme nicht auftreten. Die Berücksichtigung dieser in Vorliegendem angeführten spezifischen Schwierigkeiten soll dazu dienen, Fehlbeurteilungen zu vermeiden, welche das HL-A-System für die Anwendung bei Fragen strittiger Abstammung diskriminieren könnten.

### Literatur

- Ahrons, S., Thorsby, E.: Cytotoxic HL-A antibodies. Studies of synergism and gene-dose effect. *Vox Sang.* (Basel) **18**, 323 (1970)

- Amos, B.: Human histocompatibility locus HL-A. *Science* **159**, 659 (1968)
- Bach, F. H., Bach, M. L., Sondel, P. M., Sundharadas, G.: Genetic control of mixed leukocyte culture reactivity. *Transplant. Rev.* **12**, 30 (1972)
- Bártová, A., Mayr, W. R.: Bericht über die HL-A-Arbeitstagung in Olomouc. *Acta Univ. Palack. (im Druck, 1974)*
- Ben-David, A., Orgad, S., Danon, Y., Michali, D.: HL-A antigen change in patients treated with chloramphenicol. *Tissue Antigens* **3**, 378 (1973)
- Bender, K., Mayerová, A.: Verwendung des HL-A-Systems in unvollständigen Vaterschaftsfällen (Mutter, Beklagter oder Zeuge verstorben). Kurzfassung, 5. Tagung der Ges. für forens. Blutgruppenkunde, Amsterdam, 14.—18. 10. 1973
- Bernoco, D., Mattiuz, P. L., Miggiano, V. C., Ceppellini, R.: Turnover of HL-A antigens at the lymphocyte surface. *G. Batt. Virol.* **64**, 272 (1971)
- Bertrams, J., Kuwert, E., Gallmeier, W. M., Reis, H. E., Schmidt, C. G.: Transient lymphocyte HL-A antigen "loss" in a case of irradiated M. Hodgkin. *Tissue Antigens* **1**, 105 (1971)
- Brand, D. L., Ray, J. G., jr., Hare, D. B., Kayhoe, D. E., McClelland, J. D.: Preliminary trials toward standardization of leukocyte typing. *Histocompatibility Testing* **1970**, 357 (1970)
- Ceppellini, R., Bonnard, G. D., Coppo, F., Miggiano, V. C., Pospisil, M., Curtoni, E. S., Pellegrino, M.: Mixed leukocyte cultures and HL-A antigens. I. Reactivity of young fetuses, newborns and mothers at delivery. *Transplant. Proc.* **3**, 58 (1971)
- Dorf, M. E., Eguro, S. Y., Cabrera, G., Yunis, E. J., Swanson, J., Amos, D. B.: Detection of cytotoxic non-HL-A antisera. I. Relationship to anti-Le<sup>a</sup>. *Vox Sang. (Basel)* **22**, 447 (1972)
- Evans, C. A., Pegrum, G. D.: The reactivity of leukaemic cells to HL-A typing sera. *Tissue Antigens* **3**, 454 (1973)
- Ferrone, S., Cooper, N. R., Pellegrino, M. A., Reisfeld, R. A.: The role of complement in the HL-A antibody-mediated lysis of lymphocytes. *Transplant. Proc.* **6**, 13 (1974)
- Gelsthorpe, K., Doughty, R. W.: A new HL-A antigen: TY. *Tissue Antigens* **3**, 316 (1973)
- Gürtler, H.: The HL-A system in cases of disputed paternity, exclusions and positive evidences of paternity. Kurzfassung, 5. Tagung der Ges. für forens. Blutgruppenkunde, Amsterdam, 14.—18. 10. 1973
- Hirschfeld, J.: Serologic codes: interpretation of immunogenetic systems. *Science* **148**, 968 (1965)
- Hirschfeld, J.: Some notes on the Rh-system — a complex-complex model. *Vox Sang. (Basel)* **24**, 21 (1973)
- Hummel, K.: Zum biostatistischen Vaterschaftsbeweis aufgrund von Blutgruppengutachten. *Bundesgesundhbl.* **12**, 379 (1969)
- Hummel, K.: Biostatistische Abstammungsbegutachtung mit Blutgruppenbefunden. Tabellenband I. Stuttgart: G. Fischer 1971
- Hummel, K.: Biostatistischer Vaterschaftsbeweis mit HL-A-Befunden. Kurzfassung, 5. Tagung der Ges. für forens. Blutgruppenkunde, Amsterdam, 14.—18. 10. 1973
- Jeannet, M., Hässig, A., Bernheim, J.: Use of the HL-A system in disputed paternity cases. *Vox Sang. (Basel)* **23**, 197 (1972)
- Joint Report of the Fifth International Histocompatibility Workshop. *Histocompatibility Testing* **1972**, 619 (1973)
- Jongsma, A., Someren, H. v., Westerveld, A., Hagemeyer, A., Pearson, P.: Localization of genes on human chromosomes by studies of human-chinese hamster somatic cell hybrids. Assignment of PGM<sub>3</sub> to chromosome C6 and regional mapping of the PGD, PGM<sub>1</sub> and Pep-C genes on chromosome A1. *Humangenetik* **20**, 195 (1973)
- Kabat, E. A.: Structural concepts in immunology and immunochemistry. New York: Holt, Rinehart & Winston 1968
- Lamm, L. U., Friedrich, U., Bruun Petersen, G., Jörgensen, J., Nielsen, J., Therkelsen, A. J., Kissmeyer-Nielsen, F.: Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome No. 6 in a family with a pericentric inversion. *Hum. Hered. (im Druck, 1974)*
- Landsteiner, K.: Über individuelle Unterschiede des menschlichen Blutes. Nobel-Vortrag, Stockholm 11. 12. 1930. Stockholm: Norstedt 1931

- Legrand, L., Dausset, J.: Serological evidence of the existence of several antigenic determinants (or factors) on the HL-A gene products. *Histocompatibility Testing* **1972**, 441 (1973)
- Mattiuz, P. L., Ihde, D., Piazza, A., Ceppellini, R., Bodmer, W. F.: New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. *Histocompatibility Testing* **1970**, 193 (1970)
- Mayerová, A., Bender, K., Hiller, Chr.: Die Verwendung des HL-A-Systems in erbbiologischen Gutachten: eine Zusammenstellung von Daten, S. 111. Referate der 4. Tagung der Ges. für forens. Blutgruppenkunde, Trier 18.—20. 9. 1972
- Mayr, W. R.: Die Genetik des HL-A-Systems. *Humangenetik* **12**, 195 (1971)
- Mayr, W. R.: Grundlagen zur Berechnung der Vaterschaftswahrscheinlichkeit im HL-A-System. *Z. Immun.-Forsch.* **144**, 18 (1972)
- Mayr, W. R.: Leukocytäre Isoantigene des Menschen mit ausführlicher Beschreibung des HL-A-Systems. In: Fortschritte der Hämatologie, Bd. 3 (Hrsg. E. Perlick, W. Plenert, O. Prokop, H. Stobbe), S. 17. Leipzig: Barth 1974a
- Mayr, W. R.: Neue Untersuchungen im Bereich des HL-A-Systems: ein dritter Locus mit serologisch nachweisbaren Merkmalen. *Folia haemat. (Lpz.)* (im Druck, 1974b)
- Mayr, W. R., Bernoco, D., Marchi, M. de, Ceppellini, R.: Genetic analysis and biological properties of products of the third SD (AJ) locus of the HL-A region. *Transplant. Proc.* **5**, 1581 (1973)
- Mayr, W. R., Hiller, Chr.: Zum Beweiswert von Vaterschaftsausschlüssen im HL-A-System. *Folia haemat. (Lpz.)* (im Druck, 1974)
- Mayr, W. R., Mayr, D.: Schwache Ausprägung des Merkmals HL-A2 in einer deutschen Familie. *Z. Immun.-Forsch.* **144**, 404 (1972)
- Mayr, W. R., Mayr, D.: A lymphocytotoxic antibody associated with AB0 blood groups and ABH secretor status: preliminary report. *J. Immunogenet.* **1**, 43 (1974)
- Mayr, W. R., Mickerts, D., Pausch, V., Pacher, M.: Blutkörperchen- und Serummerkmale in Wien. Phänotypen- und Genfrequenzen. *Mitt. Anthropol. Ges. Wien* **100**, 11 (1970)
- Mi, P. M., Morton, N. E.: Blood factor association. *Vox Sang.* (Basel) **11**, 434 (1966)
- Mittal, K. K., Mickey, M. R., Singal, D. P., Terasaki, P. I.: Serotyping for homotransplantation. XVIII. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation* **6**, 913 (1968)
- Natvig, J. B., Kunkel, H. G.: Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants and idiotypes. *Advanc. Immunol.* **16**, 1 (1973)
- Prokop, O., Uhlenbruck, G.: Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen, 2. Aufl. Leipzig: Thieme 1966
- Race, R. R., Sanger, R.: Blood groups in man, 5. Aufl. Oxford-Edinburgh: Blackwell 1968
- Reisfeld, R. A., Kahan, B. D.: The molecular nature of HL-A antigens. In: Transplantation antigens (Hrsg. B. D. Kahan, R. A. Reisfeld), S. 489. New York-London: Academic Press 1972
- Richiardi, P., Carbonara, A. O., Mattiuz, P. L., Ceppellini, R.: Inhibition of cytotoxic anti-HL-A sera by their F(ab')<sub>2</sub>. *Histocompatibility Testing* **1972**, 455 (1973)
- Rittner, Ch., Waiyawuth, V.: HL-A typing in dried blood stains. I. Specificity and reliability of the inhibition test. *J. Immunogenet.* **1**, 99 (1974)
- Sanderson, A. R., Gelfand, E. W., Rosen, F. S.: A change in HL-A phenotype associated with a specific blocking factor in the serum of an infant with severe combined immunodeficiency disease. *Transplantation* **13**, 144 (1972)
- Seidl, S., Spielmann, W.: Erfahrungen mit dem HL-A-System in Vaterschaftsgutachten. Kurzfassung, 5. Tagung der Ges. für forens. Blutgruppenkunde, Amsterdam, 14.—18. 10. 1973
- Seigler, H. F., Metzgar, R. S.: Embryonic development of human transplantation antigens. *Transplantation* **9**, 478 (1970)
- Soulier, J. P., Moullec, J., Prou-Wartelle, O.: Recherches de paternité par le système HL-A. *Rev. franç. Transfusion* **15**, 11 (1972)
- Speiser, P.: Der serologische Individualismus des Menschen. *Med. Lab.* **25**, 254 (1972a)
- Speiser, P.: Chances of paternity exclusion in tabular form. *Z. Immun.-Forsch.* **143**, 203 (1972b)
- Speiser, P.: Das HL-A-System im Paternitätsprozeß mit Berücksichtigung des Beweiswertes. Referate der 5. Tagung der Ges. für forens. Blutgruppenkunde, Amsterdam, 14.—18. 10. 1973

- Speiser, P., Mayr, W. R., Pacher, M., Pausch, V., Bleier, I., Melzer, G., Weirather, M., Groer, K.: Ein Vaterschaftsausschluß im HL-A-System ohne Untersuchung des verstorbenen Beklagten. *Wien. klin. Wschr.* **86**, 317 (1974)
- Speiser, P., Pausch, V.: The zygosity in the human HL-A transplantation system. A contribution to detect the histocompatibility grade. *Humangenetik* **8**, 173 (1969)
- Spielmann, W., Seidl, S.: Zur Anwendung des HL-A-Systems in der Paternitätsserologie. Untersuchungen an 110 Familien. *Z. Rechtsmedizin* **74**, 121 (1974)
- Svejgaard, A.: Complement-fixing platelet iso-antibodies. III. Quantitation of the HL-A2 antigen on platelets. *Vox Sang. (Basel)* **17**, 112 (1969)
- Svejgaard, A., Bratlie, A., Hedin, P. J., Högman, C., Jersild, C., Kissmeyer-Nielsen, F., Lindblom, B., Lindholm, A., Löw, B., Messeter, L., Möller, E., Sandberg, L., Staub-Nielsen, L., Thorsby, E.: The recombination fraction of the HL-A system. *Tissue Antigens* **1**, 81 (1971)
- Svejgaard, A., Staub-Nielsen, L., Ryder, L. P., Kissmeyer-Nielsen, F., Sandberg, L., Lindholm, A., Thorsby, E.: Subdivisions of HL-A antigens. Evidence of a "new" segregant series. *Histocompatibility Testing* **1972**, 465 (1973)
- Terasaki, P. I., Miyajima, T., Sengar, D. P. S., Stiehm, E. R.: Extraneous lymphocytic HL-A antigens in severe combined immunodeficiency disease. *Transplantation* **13**, 250 (1972)
- Tiilikainen, A., Schröder, J., De la Chapelle, A.: Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. II. Masking of HL-A antigens. *Transplantation* **17**, 355 (1974)
- Ting, A., Morris, P. J., Stocker, J. W.: Leukocyte antigens in renal transplantation. IV. The effect of blood transfusions on leukocyte typing by lymphocytotoxicity. *Transplantation* **7**, 424 (1969)
- Trinchieri, G., Marchi, M. de, Mayr, W., Savi, M., Ceppellini, R.: Lymphocyte antibody lymphocytolytic interaction (LALI) with special emphasis on HL-A. *Transplant. Proc.* **5**, 1631 (1973)

Univ.-Doz. Dr. Wolfgang R. Mayr  
Institut für Blutgruppenserologie  
der Universität  
A-1090 Wien, Spitalgasse 4