

Universitätsklinikum Ulm

Institut für Transfusionsmedizin

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier

**Analyse des Einflusses der HLA-DPB1-Kompatibilität auf
den Therapieerfolg der unverwandten hämatopoetischen
Stammzelltransplantation**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin Dr. med. der

Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

Daphne Ariadne Mytilineos, geboren in Heidelberg

aus Ulm, 2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hubert Schrezemeier

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Hoffmann

Tag der Promotion: 27.06.2019

Daten aus dieser Dissertaion sind in der Publikation von Tsamadou C, Fürst D, Vucinic V, Bunjes D, Neuchel C, Mytilineos D, Gramatzki M, Arnold R, Wagner EM, Einsele H, Müller C, Schrezenmeier H, Mytilineos J. mit dem Titel: „Human leukocyte antigen-E mismatch is associated with better hematopoietic stem cell transplantation outcome in acute leukemia patients“ *Haematologica*. 2017 Nov; 102(11): 1947-1955

Meinen Eltern und meinem Bruder gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1. DAS HLA SYSTEM.....	2
1.2. DIE ALLOGENE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION	11
1.3. KOMPLIKATIONEN NACH ALLOGENER HSCT.....	16
1.4. HLA-DP IN DER STAMMZELLTRANSPLANTATION.....	19
1.5. HLA TYPISIERUNGSVERFAHREN.....	21
1.6. ZIELSETZUNG DER STUDIE	23
2. MATERIAL UND METHODIK.....	25
2.1. MATERIAL	25
2.2. METHODEN	36
2.3. STATISTISCHE METHODEN.....	53
2.4. KLINISCHE DATEN	55
3. ERGEBNISSE	59
3.1. VALIDITÄT DER STUDIE	59
3.2. EINFLUSS DER HLA-DP-KOMPATIBILITÄT AUF DEN ERFOLG DER ALLOGENEN STAMMZELLTRANSPLANTATION	60
3.3. HLA-DP PERMISSIVITÄTSEINTEILUNG NACH T-ZELL EPITOP-MODELLEN UND IHR EINFLUSS AUF DEN THERAPIEERFOLG DER ALLOGENEN STAMMZELLTRANSPLANTATION.....	68
3.4. ALTER	82
3.5. EINFLUSS DES HLA-DP-KOMPATIBILITÄTSSTATUS AUF DIE ALLOGENE STAMMZELLTRANSPLANTATION, ABHÄNGIG VOM CMV-SEROSTATUS.....	102
3.6. EINFLUSS DER HLA-DP-EXPRESSION (NACH E. PETERSDORF) AUF DEN THERAPIEERFOLG DER ALLOGENEN HSCT.....	121
4. DISKUSSION.....	130
4.1. PATIENTENCHARAKTERISTIK.....	130
4.2. VALIDITÄT DER STUDIENKOHORTE.....	131
4.3. EINFLUSS DER HLA-DP KOMPATIBILITÄT AUF DEN THERAPIEERFOLG DER ALLOGENEN STAMMZELLTRANSPLANTATION	132

4.4.	HLA-DP-PERMISSIVITÄTSEINTEILUNG NACH DEN T-ZELL EPITOP-MODELLEN UND IHR EINFLUSS AUF DEN THERAPIEERFOLG DER ALLOGENEN STAMMZELLTRANSPLANTATION	134
4.5.	ALTER	139
4.6.	EINFLUSS DES HLA-DP-KOMPATIBILITÄTSTATUS AUF DEN THERAPIEERFOLG DER ALLOGENE STAMMZELLTRANSPLANTATION, ABHÄNGIG VOM CMV-SEROSTATUS	141
4.7.	EINFLUSS DER HLA-DP-EXPRESSION AUF DEN THERAPIEERFOLG DER ALLOGENEN STAMMZELLTRANSPLANTATION	144
4.8.	SCHLUSSFOLGERUNG	146
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	148
	LITERATURVERZEICHNIS.....	150
	DANKSAGUNG.....	163
	LEBENS LAUF.....	164

Abkürzungsverzeichnis

AA	aplastische Anämie
aGvHD	akute Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (engl.: aGvHD, acute graft versus host disease)
AL	nicht klassifizierte akute Leukämie
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
aqua dest.	Destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CB	Cord Blood (deutsch: Nabelschnurblut)
CD	Zelloberflächenmarker (engl.: cluster of differentiation)
cGvHD	chronische Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (engl.: chronic graft-versus-host disease)
CI	Kumulativinzidenz (engl.: Cumulative incidence)
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalie Virus (engl.: cytomegalovirus)
CMV+	CMV-Serostatus positiv
CMV-	CMV-Serostatus negativ
CO	Clinical Option (deutsch: Therapieoption, HSCT als mögliche Therapie)
D	Developmental (deutsch: entwicklungsfähig, HSCT im Rahmen klinischer Studien)
DAG-KBT	Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V.
dCMV	CMV-Serostatus des Spenders
DFS	Krankheitsfreieüberleben (engl.: disease free survival)
DP	HLA-Klasse II Molekül
DPM	HLA-DP match, HLA-DP Kompatibilität
DPMM	HLA-DP mismatch, HLA-DP Inkompatibilität
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DRST	Deutsches Register für Stammzelltransplantationen
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation

engl	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziierte Proteindegradation (engl.: endoplasmic reticulum associated protein degradation)
GNR	Generally not Recommended (deutsch: allgemein nicht empfohlen, HSCT nicht empfohlen)
GvH	Transplantat-gegen-Wirt (engl.: graft-versus- host)
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (engl.: graftversus- host disease)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie Effekt (engl.: graft- versusleukemia)
Gy	Gray, Einheit der Energiedosis ionisierender Strahlung
HLA	humanes Leukozytenantigen
HL	Hodgkin-Lymphom
HSZT/HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation (engl.: hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)
HvG	Wirt-gegen-Transplantat (engl.: Host-versus- graft)
ID	Identifikationsname (engl.: identifier)
Ig	Immunglobulin
KM	Knochenmark
m	männlich
MAC	myeloablative Konditionierung (engl.: myeloablative conditioning)
MDA	Amplifikation mit multipler Strangverdrängung (engl.: multiple displacement amplification)
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
MIC	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I ähnliche Kette(engl.: major histocompatibility complex class I-related chain)
MIIC	MHC-Klasse II Kompartiment
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MM	multiples Myelom
ng/μl	Nanogramm pro Mikroliter

NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Nonperm	nonpermissiv (Einteilung nach dem TCE-Modell)
NRM	Rezidivfreie Mortalität/rezifivunabhängige Mortalität (engl.: non-relapse-mortality)
OS	Gesamtüberleben (engli.: Overall survival)
p	Signifikanzwert (engl.: probability)
PBSZ	periphere Blutstammzellen (engl.: peripheral blood stem cells)
pCMV	CMV-Serostatus des Patienten
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
Perm	permissive (Einteilung nach dem TCE-Modell)
Pos.	Position
REV	Rückw.rts (engl.: reverse)
RI	Rezidivinzidenz
RIC	Konditionierung reduzierter Intensität (engl.: reduced intensity conditioning)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleid acid)
S	Standard of care (deutsch: HSCT als Therapie der Wahl)
SBT based typing)	sequenzbasierte Typisierung (engl.: sequence based typing)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sek	Sekunde(n)
Taq	Thermophilus aquaticus.
TBI irradiation)	Ganzkörperbestrahlung (engl.: total body irradiation)
Tel	Telomer
TH1	T-Helferzellen Subpopulation 1
TM	Transmembranregion
TRM	Transplantationsassoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality)
Tx	Transplantation
T-Zelle Immunsystems	Aus dem Thymus stammende Zelle des Immunsystems
TZR	T-Zell Rezeptor
US(A)	Vereinigte Staaten (von Amerika) (engl.: united states (of america))
vs.	versus (lat.: gegenüber)
w	weiblich
ZYT	zytoplasmatische Domän

1. Einleitung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) stellt für viele angeborene und erworbene Erkrankungen des hämatopoetischen Systems die meist einzige kurative Therapiemöglichkeit dar. Jährlich werden deshalb weltweit ca. 42.000 Patienten mittels einer Stammzelltransplantation therapiert [63]. Dabei handelt es sich bei 43 % um allogene und bei 57 % um autologe Transplantationen [63]. Zwar stehen gegenwärtig weltweit ca. 30 Millionen (BMDW, April 2017) registrierte Spender zur Verfügung, jedoch ist die Auswahl eines kompatiblen Spenders nicht immer einfach. Ein passender Spender setzt einen hohen Grad an Übereinstimmung mit den Histokompatibilitätsmerkmalen des Patienten voraus. Aufgrund der hohen Diversität dieser Merkmale ist es deshalb oft nicht möglich, einen optimalen Spender zu finden.

Extensive Forschungsaktivität in diesem Bereich, führte in den letzten 10-15 Jahren zu einer Optimierung der Rahmenbedingungen für die HSCT, weshalb die Anzahl der durchgeführten Transplantationen jährlich anstieg. Dennoch ist die Erfolgsrate durch eine hohe Komplikationsrate limitiert. Innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation sterben ca. 30-40% der transplantierten Patienten (BMDW, April 2017). Hauptgründe hierfür sind vor allem die Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (Graft versus-Host Disease, GvHD) und ein Rezidiv der malignen Grunderkrankung. Gewebsdifferenzen zwischen Spender und Empfänger können häufig zu einer GvHD führen, bei der immunkompetente Spender-T-Zellen gesundes Gewebe des Patienten schädigen. Andererseits können diese auch die maligne Zellen des Empfängers angreifen und somit einen Transplantat-gegen-Leukämie Effekt (Graft versus Leukemia effect, GvL) auslösen, was zu einer Erniedrigung des Rezidivrisikos führen kann. Die Hauptvermittler dieser Gewebsdifferenzen sind, wie oben bereits erwähnt, die Genprodukte des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes („major histocompatibility complex, MHC), welcher beim Menschen auch als Humanes-Leukozyten-Antigen-System (human leukocyte antigen, HLA) bekannt ist. Ziel ist es, diese beiden Hauptkomplikationen zu minimieren. Eine wichtige Rolle hierbei könnte das HLA-DP-

Molekül spielen. Deshalb wurde in dieser Studie die Rolle der HLA-DP-Kompatibilität auf den Erfolg der allogenen HSCT untersucht.

1.1. Das HLA System

1.1.1. Entdeckung, Rolle und Genetik des HLA-Systems

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts entstanden durch Studien von Ernest E. Tyzzer und Clarence C Little, Hinweise auf ein Gensystem, das allogene transplantierte Tumore empfänglicher machte. Hierbei transplantierten sie Tumore in genetisch differente Maus-Stämme transplantiert und man fand heraus, dass einige Stämme sich als „resistent“ erwiesen während andere empfänglicher für diese Tumore waren, sodass diese in ihnen weiter wachsen konnten. Als Grund hierfür wurde ein Gensystem vermutet, welches aber zu diesem Zeitpunkt noch als unbekannt galt. [91]

Die Entdeckung des ersten HLA-Antigens erfolgte 1958 durch Jean Dausset. Er beschrieb spezifische Antikörper in Seren mehrfach transfundierter Patienten, die mit fast allen Leukozyten anderer getesteter Patienten, wenn Sie in Verbindung gebracht wurden, agglutinierten. Diese Antikörper stellten also ein Gegenstück zu den neu entdeckten polymorphen Oberflächenmerkmalen der Leukozyten dar. Er benannte diese Antigene „MAC“ (später HLA-A2). Für seine Entdeckung erhielt Jean Dausset 1980 den Nobel-Preis. In den darauffolgenden Jahren wurden von immer mehr Forschungsgruppen weitere HLA-Antigene entdeckt. Aufgrund der hohen Diversität und Komplexität dieses Felds, entstand eine internationale Zusammenarbeit. Es wurden internationale „Workshops“ ins Leben gerufen, in denen die Wissenschaftler sich gegenseitig bezüglich ihre Labortechniken austauschten. Es wurde jedoch erst später bekannt, dass das HLA-System nicht nur an der Erkennung von fremdem Gewebe, sondern auch an der Erkennung von krankhaft verändertem, sowie infiziertem Gewebe beteiligt ist [99]. 1974 konnten Rolf Zinkernagel und Peter Doherty nachweisen, dass die Antigenerkennung durch T-Zellen in direktem Zusammenhang mit den MHC Molekülen steht [18]. Die Funktion der MHC's wurde damit weitestgehend geklärt. 1977 konnten diese Erkenntnisse nun auch für das

menschlichen MHC, dem sogenannten HLA-System, nachgewiesen werden [8]. 1996 wurden Zinkernagel und Doherty für ihre Entdeckung mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Die Gene des HLA-Komplexes sind auf dem kurzen Arm der Chromosoms 6 an Position 21 kodiert (6p21.1-6p21.3). Sie umfassen eine Länge von ca. 3500 kb. Es werden in diesem Bereich drei verschiedene Gengruppen unterschieden, die Klasse I-III benannt werden. Telomer-nah liegt die Region der Klasse I-Gene, welche für HLA-A bis HLA-F kodieren. Zentromer-nah liegt die Region der Klasse II Gene, welche wiederum für HLA-DM,- DP, -DQ, und -DR kodieren. Dazwischen befindet sich die Region mit Genen, die weder der Klasse I noch der Klasse II zugeordnet werden konnten und deshalb als Klasse III benannt wurden. Sie kodieren z.B. den Komplementfaktor C2, Faktor B, C4a und b, die Tumornekrosefaktoren und ein Hitzeschockprotein.

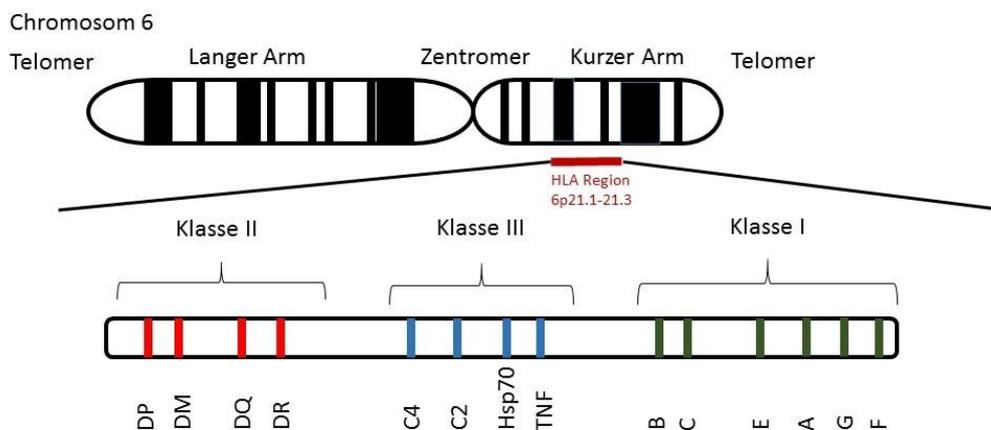


Abbildung 1 Darstellung der genetischen Organisation des HLA-Komplexes auf dem Chromosom 6, angelehnt an [42]. Mit freundlicher Genehmigung von „Copyright Massachusetts Medical Society“ [42]. Gezeigt sind die HLA Gene auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Die Gene der HLA Klasse I sind grün, die der Klasse II rot und die der Klasse III blau markiert.

1.1.2. Struktur und Funktion der HLA-Klasse I und II

Antigene

Bei den HLA-Klasse I- und II-Antigenen handelt es sich hauptsächlich um Glykoproteine, die an der Zelloberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Sie präsentieren dort körpereigene (autologe) sowie körperfremde Peptide an immunkompetenten Zellen. Aufgrund von verschiedenen Eigenschaften werden die HLA-Klasse I- und II-Merkmale in klassische HLA's und nicht-klassische HLA's eingeteilt. Zu den klassischen HLA Klasse I-Merkmalen gehören die Isotypen HLA-A, B und C. Sie befinden sich hauptsächlich auf kernhaltigen Körperzellen. Die Präsentation der Peptide erfolgt hier in erster Linie an zytotoxische T-Zellen. Klassische HLA-Klasse II-Merkmale sind die Isotypen HLA-DR, -DQ und -DP. Sie befinden sich nur auf Antigen-präsentierenden Zellen wie zum Beispiel B-Zellen, phagozytierenden und dendritischen Zellen [74]. Die Präsentation erfolgt hauptsächlich an T-Helferzellen.

Zu den nicht-klassischen HLA-Klasse I-Isotypen gehören HLA-E, -F und -G. Sie dienen hauptsächlich der Regulation der NK-Zell Aktivität. Sie werden im Gegensatz zu den klassischen HLA's in geringeren Mengen exprimiert und präsentieren zudem noch geringere Mengen an Peptiden. Zu den Aufgaben der nicht-klassischen Klasse II-Isotypen gehören z.B. intrazelluläre Antigenprozessierung (z.B. LMP, low molecular weight protein), transportieren von prozessierten Antigenen (z.B. TAP, transporter associated with antigen processing) sowie die Assoziation von klassischen Klasse II-Isotypen (z.B. mittels HLA-DM) an Peptiden.

Generell unterscheiden sich die Klasse I- und Klasse II-Glykoproteine, wie bereits erläutert, durch ihre Expression in unterschiedlichem Gewebe, durch ihre Antigenpräsentation an unterschiedliche Zielzellen und die damit verbundenen unterschiedlichen Funktionen, aber auch durch ihren unterschiedlichen Aufbau voneinander.

Klasse I Moleküle bestehen aus einer schweren, drei-domänigen α -Kette ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), welche transmembranär verläuft. Über nicht-kovalente Bindungen ist sie mit einer leichten β -Kette verbunden [86]. Dieses Molekül, auch β -Mikroglobulin genannt, ist nicht polymorph und wird auf Chromosom 15q22 kodiert [16]. Im Gegensatz dazu sind die Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$, welche die Peptidbindungsregion bilden,

hochpolymorph und stellen damit den funktionell wichtigsten Teil des HLA-Moleküls dar. Die an den T-Zellrezeptor (TZR) zugewandte Seite bildet eine Vertiefung, welche auch als Antigenbindungsfurche bezeichnet wird. Hier können Peptide bis zu einer Länge von 11 Aminosäuren aufgenommen werden [10]. Die Peptide wiederum werden durch ihre Seitenketten an bis zu sechs, am Ende der Vertiefung liegenden Taschen stabilisiert. Aus diesem Mechanismus resultiert eine Bevorzugung von Peptiden mit bindungsfähigen Seitenketten.

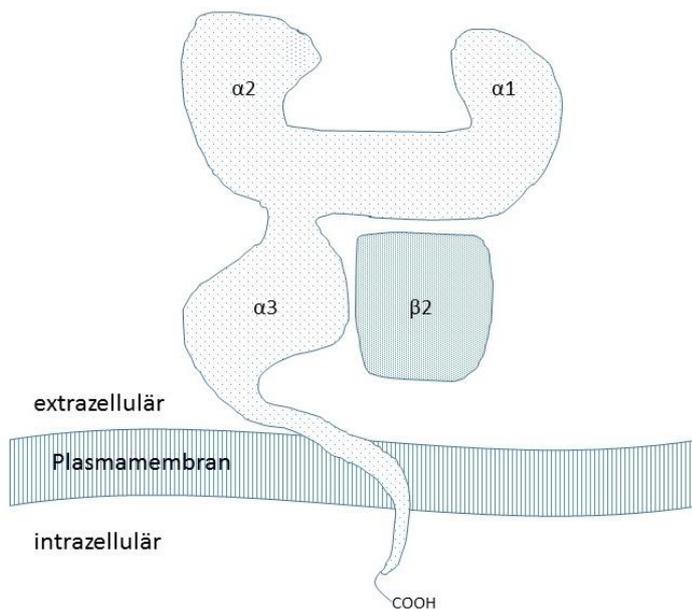


Abbildung 2 Eigene Darstellung der Proteinstruktur des HLA-Klasse-I-Moleküls mit Bindungsstelle, Transmembranärem Teil und zytoplasmatischer Region.

Klasse II Moleküle bestehen aus einer schweren α -Kette mit den Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie einer leichten β -Kette mit den Domänen $\beta 1$ und $\beta 2$. Sie sind nicht kovalent miteinander verbunden. Beide Ketten sind transmembranär verankert [52]. Der hochpolymorphe Bereich kann hier je nach Isoform unterschiedlich sein. Beim HLA-DR ist in erster Linie nur die β -Kette polymorph. Bei HLA-DP und -DQ bilden beide Ketten zusammen den polymorphen Bereich.

Die Peptidbindungsstelle wird durch die α -Kette und β -Kette gebildet und erfolgt bei den HLA Klasse II Molekülen auch über eine Vertiefung. Da die Peptide jedoch aus dieser Furche herausragen dürfen, können diese eine Länge von 12-24 Aminosäureresten haben. Aufgrund des Fehlens der oben genannten „Taschen“,

sorgen im HLA-Klasse II Molekül Wasserstoffbrückenbindungen für die Stabilisierung. Dies ermöglicht zudem ein größeres Spektrum an Peptidbindungen. Somit gilt im Vergleich zu den Klasse I Molekülen keine strenge Peptidbindungs-Restriktion [10,51].

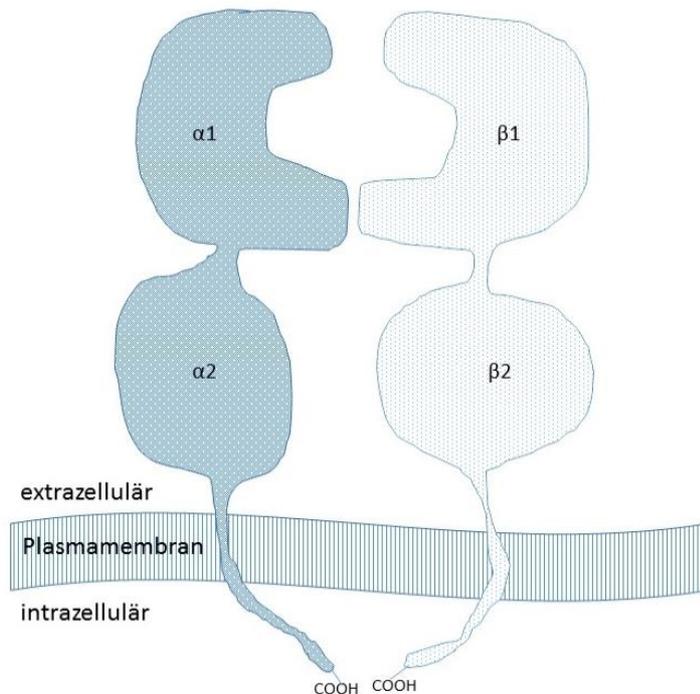


Abbildung 3 Darstellung der Proteinstruktur des HLA-Klasse-II Moleküls mit der Bindungsstelle, transmembranärem Abschnitt und zytoplasmatischer Region.

1.1.3. Die HLA-abhängige Antigenpräsentation

Durch HLA-abhängige Antigenpräsentation wird eine Art Kommunikation zwischen dem HLA-Molekül der peptidpräsentierenden Zelle und dem T-Zell Rezeptor der T-Lymphozyten hergestellt. Der T-Zell-Rezeptor erkennt das Peptid nur, wenn es von einem eigenen HLA-Molekül präsentiert wird (=HLA-Restriktion). Je nach HLA-Klasse können eigene, endogene oder aber auch fremde, exogene Peptide präsentiert werden. Die peptidpräsentierende Zelle vermittelt hiermit Informationen bezüglich ihres Zustands und ihrer Integrität an den Organismus. Des Weiteren, kann der T-Zell-Rezeptor auf diesem Weg eigene HLA-Moleküle von Fremden unterscheiden. Neben der Verbindung zwischen T-Zell-Rezeptor und HLA/Peptid-Komplex erfolgt eine weitere Kontrollverbindung über sogenannte Ko-Rezeptoren der T-

Lymphozyten und des HLA/Peptid-Komplexes. Klasse I HLA's präsentieren meist eigene, endogene Peptide. Sie entspringen aus dem physiologischen Abbau zelleigener Proteine [58]. Als Ko-Rezeptor wird bei den Klasse I HLA's das CD8-Molekül benötigt. Klasse II HLA's wiederum präsentieren sowohl exogene als auch endogene Peptide (=Kreuzpräsentation) und verwenden das CD4-Molekül als Ko-Rezeptor [58]. Tabelle 1 zeigt die Unterschiede der Antigenpräsentation und Antigenprozessierung der HLA Klassen I und II auf.

Tabelle 1 Unterschiede der Antigenpräsentation und Antigenprozessierung der HLA Klasse I und II-Moleküle.

HLA Klasse	Herkunft der Peptide	Ko-Rezeptor	Prozessierungsweg des Peptids s. Abb 5+6+7
I	Endogen	CD8	<p>1. Über den physiologischen zytosomalen Proteinabbauweg werden mittels der Proteosomen [1] und durch Abbau im endoplasmatischen Retikulum (endoplasmatic reticulum associated protein degradation, ERAD) zytosolische Proteine in Peptide fragmentiert.</p> <p>Über Transporterproteine (transporter associated with antigen processing, TAP) gelangen die Proteinfragmente aus dem Zytosol ins endoplasmatische Retikulum (ER) [54]. Die Verknüpfung des MHC mit dem Peptid erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) [70]. Durch die Verbindung des Peptids an das MHC kommt es zu einer Konformationsänderung des MHC-Peptid-Komplexes, sodass sich das Transportprotein (TAP) löst.</p> <p>Nach dem Transport zum Golgi-Apparat gelangt der MHC-Peptid-Komplex über Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche [38] und kann dort CD8+ zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. (Siehe Abbildung 4)</p>
II	Exogen und endogen	CD4	<p>Verbindung der α- und β-Kette zu einem Komplex im endoplasmatischen Retikulum. Zusätzlich wird die invariante Kette (=Ii) [11] dem Komplex hinzugefügt, um eine Bindung mit den im ER befindlichen Peptiden zu verhindern.</p> <p>Über den Golgi-Apparat wird nun der Ii-MHC-Klasse-II-Heterodimer-Komplex in das MHC Klasse-II-Kompartiment (MIIC) transportiert. Dies kann direkt oder auch indirekt über die Zellmembran erfolgen.</p> <p>Durch bestimmte Proteasen im MIIC wird die Ii-Kette auf das CLIP-Fragment (class II associated invariant chain peptide) reduziert. Dieses bleibt in der Peptidbindungsstelle des MHC-Klasse-II Moleküls gebunden, bis es von einem phagozytierten exogenen Peptid mit Hilfe des HLA-DM's verdrängt wird [4, 71].</p> <p>Anschließend wird der MHC-Klasse II-Peptid Komplex an die Zytoplasmamembran der antigenpräsentierenden Zelle transportiert und CD4+ positiven T-Zellen präsentiert. (Siehe Abbildung 5)</p>

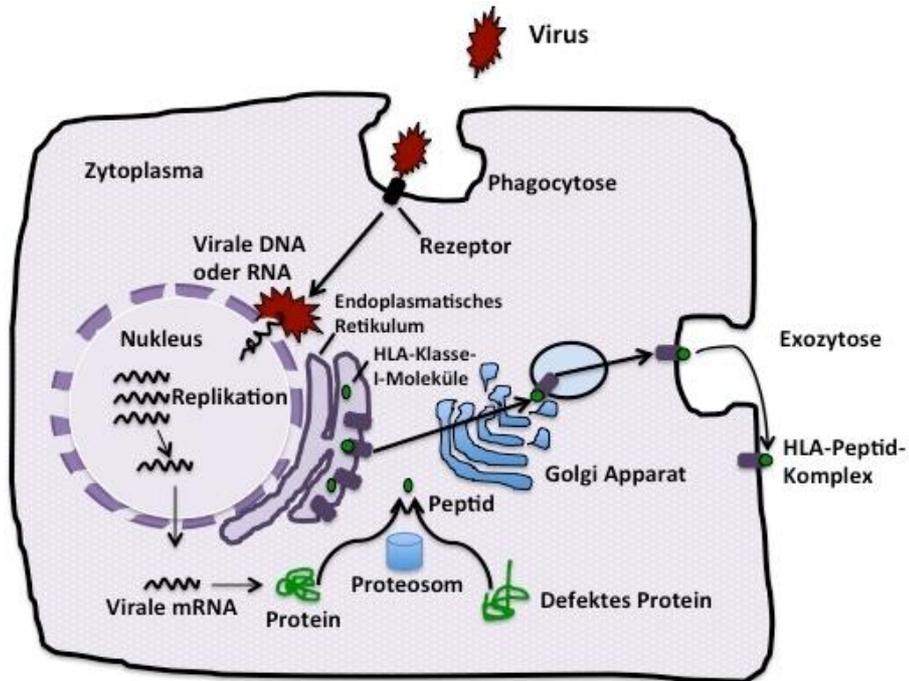


Abbildung 4 Darstellung der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle angelehnt an [42] mit freundlicher Genehmigung von [42], „Copyright Massachusetts Medical Society“.

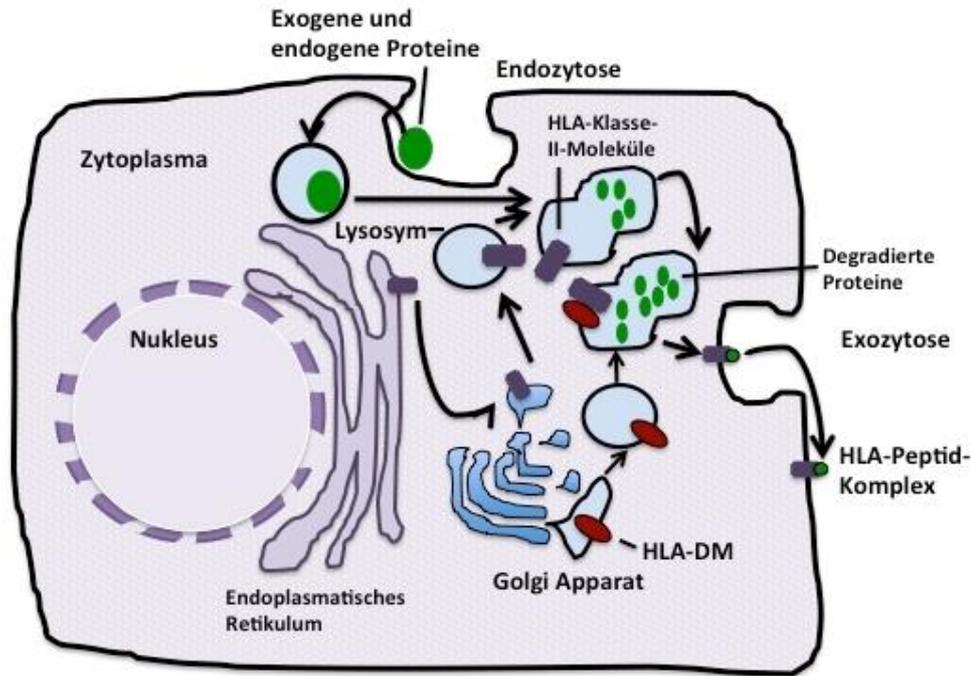


Abbildung 5 Darstellung der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation der MHC Klasse-II-Moleküle angelehnt an [42] mit freundlicher Genehmigung von [42] „Copyright Massachusetts Medical Society“.

1.1.4. HLA-DPB1

Allgemein

Im Abschnitt 1.1.2. wurden bereits Struktur und Funktion der HLA-Klasse-II-Moleküle beschrieben. In diesem Abschnitt soll jedoch genauer auf das Klasse-II-Molekül HLA-DP eingegangen werden. Das HLA-DP-Molekül wurde erstmals 1978 als Angriffsziel alloreaktiver T-Zellen in gemischten Lymphozytenkulturen beschrieben und konnte mit der Einführung molekularbiologischer Methoden genauer analysiert werden [57]. HLA-DP präsentiert exogene sowie auch eigene Peptide. Eine weitere wichtige Eigenschaft, welche auch in dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielt, ist die Präsentation von CMV-Partikeln, durch das HLA-DP-Molekül, bei einer ablaufenden CMV-Infektion [94]. Abbildung 1 zeigt die Lokalisation des für HLA-DP kodierenden Gens auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Innerhalb des für das HLA-DP codierenden Genabschnitts sind 6 hypervariable Regionen (A-F) vorhanden. Dadurch

wird ein großes Spektrum an verschiedenen Ausprägungsformen, sogenannten Allele des HLA-DP, ermöglicht. Aktuell werden 828 Allele beschrieben [39]. (siehe Abb. 6).

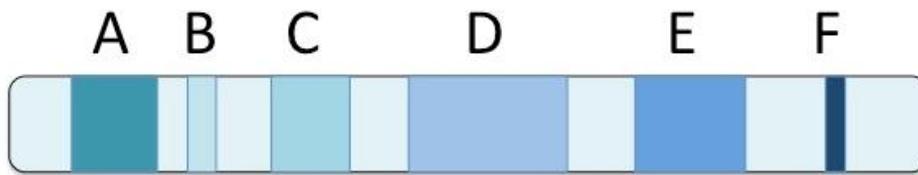


Abbildung 6 Eigene Darstellung der polymorphen Regionen A-F auf dem für das HLA-DP-Molekül kodierenden Gens.

1.2. Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) handelt es sich um einen Austausch des bei dem Patienten fehlfunktionierenden oder kranken blutbildenden Systems mit einem gesunden blutbildenden System eines Spenders. Meist stellt die HSCT dabei die einzig kurative Therapie dar und erlaubt zudem dosisintensive Chemotherapien, die ohne die HSCT, durch eine fehlende Selbstregeneration des blutbildenden Systems, letal verlaufen würde [43]. Betroffen sind Patienten mit malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems sowie vererbbaaren, angeborenen Immundefekten [19], bestimmten Autoimmunerkrankungen [69,83], aber auch verschiedenen gutartigen hämatologischen Störungen [83].

Nachdem bereits 1957 die ersten Versuche einer HSCT unternommen wurden [90], wurde 1959 erstmals ein Patient erfolgreich Stammzelltransplantiert [89]. Durch Verbesserung der Verfahren und der supportiven Therapien steigen die Zahlen der HSCT jährlich an. Während es 2010 noch 30.000 HSCT's waren, stieg die Anzahl im Jahr 2015 bereits auf 40.000 HSCT's an [63].

1.2.1. Indikationen für eine allogene HSCT

Die HSCT stellt für viele Erkrankungen des hämatopoetischen Systems die meist einzige Therapie mit kurativer Absicht dar. [84,40] Die „European Society for Blood and Marrow Transplantation“ (EBMT) beschreibt in ihrer 6. Ausgabe ihres Handbuchs über die HSCT [33], dass die Indikation zur HSCT in 4 verschiedene Grade eingeteilt werden kann:

„Standard of care“ („S“)

Hier stellt die HSCT die Therapie der Wahl dar und ist meist vorteilhafter als andere Behandlungen. Vor allem bei der akuten myeloischen Leukämie (AML), der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und den myelodysplastischen Syndromen wird oft eine „Standard of care“ – Indikation gestellt.

„Clinical Option“ („CO“)

Die HSCT stellt hier eine mögliche Therapie dar, die das Potential für einen vorteilhafteren Effekt in sich birgt. Vor allem bei Lymphomen und aplastischen Anämien (AA) ist die „Clinical option“ – Indikation öfter vorzufinden.

„Developmental“ („D“)

HSCT's bei diesem Indikationsgrad sollten im Rahmen klinischer Studien durchgeführt werden, da es keine ausreichenden Erfahrungswerte hierzu gibt. Vor allem sind hier Patienten mit hochmalignen und rezidivierenden Lymphomen der refraktären Art betroffen.

„Generally Not Recommended“ („GNR“)

Die HSCT kann aus verschiedenen Gründen auch „nicht empfohlen“ werden. Zum einen können andere Therapiemöglichkeiten eine bessere Option darstellen und zum anderen kann die HSCT dem Patienten nicht mehr zumutbar sein.

Abhängig vom Krankheitsstadium und dem Spendertyp (autolog vs. HLA-identischer Geschwisterspender vs. kompatibler unverwandter Fremdspender vs. nicht-kompatibler unverwandter Fremdspender), werden diese Grade einer HSCT Option zugewiesen.

Dennoch ist zu beachten, dass die Indikationsgrade keine strikten Anweisungen darstellen, sondern nur Empfehlungen, die nach individuellem Ermessen abgewogen werden sollten. Vor allem sollte dabei das Krankheitsrisiko mit dem Transplantationsrisiko abgewägt werden. Wie hoch das Transplantationsrisiko ist, kann durch den „EBMT Risk Score“ berechnet werden. Dieser beinhaltet Alter des Patienten, Krankheitsstadium, Zeit von Diagnosebeginn bis zur Transplantation, Spendertyp, Geschlecht des Spenders und Empfängers und viele mehr wie dem Abschnitt 3.1 zu entnehmen ist.

1.2.2. Vorbereitungen zur allogenen HSCT

Kriterien der Spenderauswahl

Im Jahr 2016 waren ca. 30 Millionen Personen als freiwillige Stammzellspender registriert (BMDW, April 2017). Trotz dieser hohen Zahl an Spendern, ist es dennoch nicht einfach „den passenden Spender“ zu finden. Vor allem spielt die immunologische Gewebsverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger die wichtigste Rolle für den Erfolg einer HSCT. Gegenwärtig empfiehlt die Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V. (DAG-KBT) [55], eine HLA-Übereinstimmung in 10 von 10 der klassischen HLA Merkmale. Das heißt, dass Spender und Empfänger für beide Allele der Loci HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1 kompatibel sein müssen. Denn mit der Zahl der HLA-Inkompatibilitäten steigt das Risiko einer GvHD und Transplantatabstoßung [66]. Somit wäre in der Theorie eine HSCT zwischen einem HLA-identischem Geschwisterpaar ideal. Zudem wären in diesem Fall mit hoher Wahrscheinlichkeit auch andere Faktoren zwischen den HLA-identischen Geschwistern gleich. Faktoren, die ebenfalls einen Einfluss auf den Erfolg der HSCT nehmen könnten. Dennoch scheint eine Transplantation zwischen eineiigen Zwillingen (syngene Transplantation) mit einer erhöhten Rückfallrate verbunden zu sein [41]. Aktuell werden ca. nur für 30% aller Patienten HLA-identische Spender aus der eigenen Familie gefunden. Leider wird aufgrund der sinkenden Geburtenrate auch dieser Anteil geringer [82]. Dennoch ist heutzutage Falls sich jedoch ein nichtverwandter HLA-identischer Spender findet, ist heutzutage mit vergleichbar guten Erfolgsraten einer allogenen HSCT zu rechnen [72].

Finden sich nun mehrere passende Spender für einen Patienten, kann anhand weiterer verschiedener Faktoren der bestgeeigneste Spender ausgesucht werden, um damit den Erfolg der allogenen HSCT positiv zu beeinflussen. So sollten zum Beispiel jüngere Spender (18-30 Jahre) favorisiert werden, da Transplantationen mit jüngeren Spendern, im Vergleich zu Transplantationen mit älteren Spendern, mit einer geringeren GvHD-Rate und mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert sind [45]. Als weiteren Einflussfaktor kann das Geschlecht eine Rolle spielen. So ist das GvHD-Risiko bei männlichen Patienten größer, wenn sie Stammzellen eines weiblichen Spenders erhalten [32, 35]. Zudem sollte eine Reinfektion bzw. eine Neuinfektion mit dem Zytomegalievirus (CMV) umgangen werden. Deshalb werden Spender und Empfänger mit gleichem CMV-serostatus bevorzugt. Dies bedeute, dass CMV-seronegative Patienten Stammzellen eines CMV-seronegativen Spenders erhalten sollten und CMV-seropositive Patienten Stammzellen eines CMV-seropositiven Spenders [47]. Im Bezug auf die Blutgruppe spielt diese jedoch, anders als bei der Organtransplantation, bei der Durchführung eines HSCT eine untergeordnete Rolle. Eine Nichtübereinstimmung kann lediglich zu einem verzögertem Engraftement führen [20].

Stammzellquelle

Stammzellen können heutzutage aus 3 Quellen gewonnen werden: Knochenmark (KM), peripheren Blutstammzellen (PBSZ), und Nabelschnurblut (CB).

Während das KM seit der ersten HSCT bis weit in die 90er Jahre die einzige Quelle für hämatopoetische Stammzellen darstellte, werden heutzutage die hämatopoetischen Stammzellen mit einem Anteil von fast 85% aus PBSC entnommen [80]. Vor allem bei älteren Patienten wird diese Quelle angewandt [80].

Gründe für die Präferenz einer PBSC als Quelle für die allogene HSCT liegen zum einen an der einfacheren Entnahme und zum anderen an der erhöhten Anzahl an kernhaltigen Zellen in dem Präparat. Zu diesen gehören zum Beispiel CD34 positive und CD3 positive Zellen sowie Natürliche Killerzellen. CD34 und CD3 stellen hierbei Oberflächenmarker für hämatopoetische Stammzellen dar. Trotz der erhöhten Anzahl an kernhaltigen Zellen aus der PBSC-Quelle im Vergleich zur KM-Quelle, konnte kein Unterschied im Risiko der Entwicklung einer akuten GvHD (aGvHD) gezeigt werden

[60]. Dennoch ist die PBSC-Quelle mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung einer chronischen GvHD (cGvHD), gleichzeitig aber auch mit einem größeren Graft-versus-Leukämie-Effekt (GVL) behaftet. Deshalb scheinen Patienten mit einer fortgeschrittenen Leukämie durch eine PBSC-Quelle durchaus zu profitieren [60]. Allgemein jedoch scheinen ältere Patienten eine PBSC Quelle besser zu vertragen [7]. Patienten mit gutartigen Erkrankungen profitieren jedoch nicht von dem GVL-Effekt und sollten deshalb aus einer KM-Quelle transplantiert werden.

Konditionierung

Um eine HSCT durchführen zu können, muss der Patient „konditioniert“ werden. Bei der myeloablativen Konditionierung (MAC) bedeutet dies, dass die malignen Zellen des Patienten beseitigt werden müssen und das Immunsystem des selben so zerstört werden muss, dass es zu keiner Abstoßungsreaktion kommt. Dabei handelt es sich um zytotoxische Substanzen, die ggf. mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation = TBI) kombiniert werden. Aufgrund der hohen Toxizität der Substanzen, können neben dem oben genannten gewünschten Effekt auch noch unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Deshalb sollte die myeloablative Therapie bevorzugt bei jungen Patienten, (<50 Jahren) angewendet werden, da diese sich üblicherweise in einem besseren Allgemeinzustand befinden und kaum Komorbiditäten aufweisen [37,53,59]. Bei älteren Patienten und Patienten mit gutartiger Grunderkrankung, wird eine Konditionierung mit weniger toxischen Substanzen angestrebt. Dabei handelt es sich um eine Konditionierung mit reduzierter Intensität (reduced intensity conditioning = RIC). Durch die verminderte Dosierung und Bestrahlungsintensität ist mit der RIC auch eine verminderte Transplantations-assoziierte-Mortalität verbunden (Transplant-related mortality = TRM). Durch die verminderte Immunsuppression bei RIC im Vergleich zur MAC, entsteht nach HSCT eine Koexistenz von hämatopoetischen Stammzellen des Spenders und Empfängers (mixed chimerism). Um dennoch eine starke Abstoßungsreaktion und eine starke GvHD zu verhindern, ist die RIC mit einer folgenden Immunsuppression verbunden [59,79]. Ziel ist es dennoch, dass die Spenderabwehrzellen die Resthämatopoese eliminieren und somit auch die restlichen malignen Zellen. Dieser Effekt wurde bereits oben erwähnt und wird als GVL bezeichnet. Deshalb muss ein gutes Gleichgewicht zwischen Immunsuppression

und GVL hergestellt und überwacht werden. Dabei sollte die Immunsuppression mindestens so hoch sein, dass es zu keinem erneutem Rezidiv der Grunderkrankung kommt und gleichzeitig nicht zu aggressiv, damit sie nicht zu einer starken GvHD-Reaktion führt.

1.3. Komplikationen nach allogener HSCT

1.3.1. Toxizität der Konditionierung

Durch die Konditionierung kann es zu verschiedenen Nebenwirkungen kommen. Wie stark diese ausgeprägt sind, ist abhängig von der jeweiligen Substanz und deren Dosis. Tabelle 2 zeigt die verschiedenen Nebenwirkungen und den typischen Zeitpunkte ihres Auftretens. Neben den typischen Nebenwirkungen gibt es auch substanzspezifische Nebenwirkungen wie z. B. die hämorrhagische Zystitis bei Cyclophosphamid.

Tabelle 2 Typische Symptome und deren zeitliches Auftreten nach Gabe von toxischen Substanzen bei der Konditionierungstherapie.

Symptom	Zeitpunkt in Tage nach Therapie
Übelkeit, Erbrechen, leichte Hautausschläge	Unmittelbar
Orale Mukositis	5.-7. Tag
Alopezie, Panzytopenie	Nach 2 Wochen
Wachstumsverzögerung bei Kindern, Azoospermie bei Männern, Ovarialinsuffizienz bei Frauen und endokrine Störungen	Potentielle, späte Nebenwirkungen

1.3.2. Graftversagen

Eine zwar seltene, dennoch nennenswerte Komplikation der allogenen HSCT ist das Transplantatversagen. Dieses kann unterteilt werden in ein primäres Versagen, bei dem sich der Patient nicht von der Neutropenie erholt und in ein sekundäres

Versagen, bei dem es nach bereits erfolgreichem Engraftment anschließend wieder zu einem Abfall der Neutrophilen Granulozyten auf Werte bis zu $0,5 \times 10^9/l$ kommt [61]. Die wichtigsten Ursachen für ein solches Graftversagen können HLA-Inkompatibilitäten, ABO-Inkompatibilitäten, zu hohe Immunsuppression vor allem bei Konditionierungen reduzierter Intensität und therapierefraktäre Erkrankungen sein [96].

1.3.3. Graft versus Host Disease (GvHD)

Die Graft versus Host Disease (deutsch: Spender gegen Empfänger Krankheit), impliziert eine Reaktion immunkompetenter T-Zellen des Spenders gegen die Oberflächenmerkmale der Empfängerzellen, die von den Spender-T-Zellen als fremd angesehen werden.

Die akute GvHD (aGvHD) tritt hauptsächlich in den ersten 100 Tagen nach Transplantation auf, wobei es auch späte Formen der aGvHD gibt, die sich auch nach dieser Zeit erst manifestieren können. Deshalb sollte der Zeitpunkt des Auftretens einer GvHD nicht als einziges Kriterium verwendet werden, um eine aGvHD zu klassifizieren, sondern eher die Symptomatik. Die chronische GvHD (cGvHD) hingegen kann sich entweder aus einer aGvHD entwickeln oder 100 Tage nach der allogenen HSCT entstehen. Neben dem zeitlichen Faktor unterscheiden sich die beiden Formen auch in ihrem klinischen Verlauf.

Bei der akuten GvHD können Reaktionen der Haut, Funktionsminderung der Leber und Beschwerden des oberen und unteren Gastrointestinaltrakts auftreten. Je nach Intensität dieser Beschwerden wird die aGvHD in 4 verschiedene Schweregrade eingeteilt:

Stadium I (mild), Stadium II (moderat), Stadium III (schwerwiegend) und Stadium IV (sehr schwerwiegend). Umso höher das Stadium, desto schlechter die Prognose. Patienten mit einer aGvHD im Stadium III haben eine Überlebenschance von 25%, Patienten im Stadium IV allerdings nur noch 5% [12].

Die Symptome einer cGvHD äußern sich bei jedem Patienten anders, lassen sich aber meist durch Symptome, die einer Autoimmunreaktion ähneln, beschreiben. Sie tritt vor

allem bei älteren Patienten und bei Patienten, die bereits eine aGVHD überstanden haben auf [13].

1.3.4. Krankheitsrückfall

Der häufigste Grund für das Versterben von Patienten nach allogener HSCT ist heutzutage der Rückfall der Grunderkrankung (engl.: Relapse). Ungefähr 40-45% der Patienten mit verwandten allogenen HSCT's und 35% derer mit unverwandten allogenen HSCT's erleiden ein Rezidiv. Dieser Unterschied entsteht deshalb, da bei unverwandten allogenen HSCT's die Wahrscheinlichkeit geringerer Inkompatibilitäten höher ist als bei verwandten allogenen HSCT's und somit der Graft-versus-Leukämieeffekt (GVL) häufiger/ausgeprägter auftritt. Hierbei reagieren die immunkompetenten Zellen des Spenders gegen die malignen Zellen des Empfängers. Da der GVL-Effekt meist von einer GvHD begleitet wird, sollte um trotzdem das Risiko eines Relapse zu entgehen, ein Mittelweg zwischen GvHD/GVL und Relapse gefunden werden. Einflussfaktoren sind hierbei das Stadium der Erkrankung und die Erkrankung selbst sowie GvHD-Prophylaxe und HLA-Kompatibilitätsstatus. Tritt ein Rezidiv der Grunderkrankung auf, kann eine zweite Transplantation oder die Infusion von Spender-T-Lymphozyten eine Therapieoption darstellen [96, 5].

1.3.5. Infektion

Nach Rezidiv der Grunderkrankung und GvHD ist eine Infektion die dritthäufigste Komplikation nach erfolgter HSCT [21]. Einflussfaktoren, wie unter anderem die Art der Konditionierung, die HLA-Kompatibilität und die Art der HSCT, (allogen vs. autolog) spielen hierbei eine wichtige Rolle. Vor allem in der Frühphase nach Transplantation kann es zu Infektionen durch Bakterien und Pilzen kommen, weshalb die Patienten typischerweise eine antimykotische und antibakterielle Prophylaxe erhalten. Auch virale Infektionen können auftreten. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der Cytomegalie Virus (CMV), welcher im Folgenden näher erklärt wird. Der CMV-Virus gehört zur Familie der Herpesviren [73] und kann nach Erstinfektion, welche bei immunkompetenten Patienten meist asymptomatisch verläuft, latent in

hämatopoetischen und somatischen Zellen verbleiben. Sollte nun die Kompetenz des Immunsystems geschwächt sein, wie zum Beispiel im Rahmen einer HSCT der Fall, so kann dieser Virus reaktiviert werden. Demzufolge gibt es zwei Wege, wie es zu einem CMV Ausbruch nach HSCT kommen kann. Zum einen durch Neuinfektion eines zuvor CMV-seronegativen Empfängers, z. B. durch einen CMV-seropositiven Spender und zum anderen durch Reinfektion bei bereits CMV-seropositiven Empfängern durch Verminderung der Kompetenz des Immunsystems.

1.4. HLA-DP in der Stammzelltransplantation

Anders als es bei den anderen HLA's der Klasse-II der Fall ist, ist das HLA-DP-Gen nicht mit den anderen HLA-Klasse-II-Genen gekoppelt. Deshalb ist eine Kompatibilität für HLA-DP häufig nicht gegeben, auch wenn alle anderen HLA-Gruppen zwischen Spender und Empfänger übereinstimmen. Somit werden viele Patienten mit einer HLA-DP-Inkompatibilität transplantiert. Bei verwandten allogenen HSCT Spendern besteht meist eine Inkompatibilitätsrate von ca. 11% [76]. Bei unverwandten allogenen HSCT Spendern besteht sogar eine Inkompatibilitätsrate von knapp 90% [76]. Welche Rolle die HLA-DP Kompatibilität in Organtransplantationen spielt, konnte bereits 1997 von J. Mytilineos analysiert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass bei immunisierten, retransplantierten Nierenempfängern der Überlebensvorteil höher ist, wenn weniger Inkompatibilitäten in den polymorphen Regionen des HLA-DP-Gens zwischen Spender und Empfänger vorliegen [56] (siehe Abb. 7). Bei ersttransplantierten, nicht-immunisierten Patienten hatte eine HLA-DP-Kompatibilität keinen Effekt.

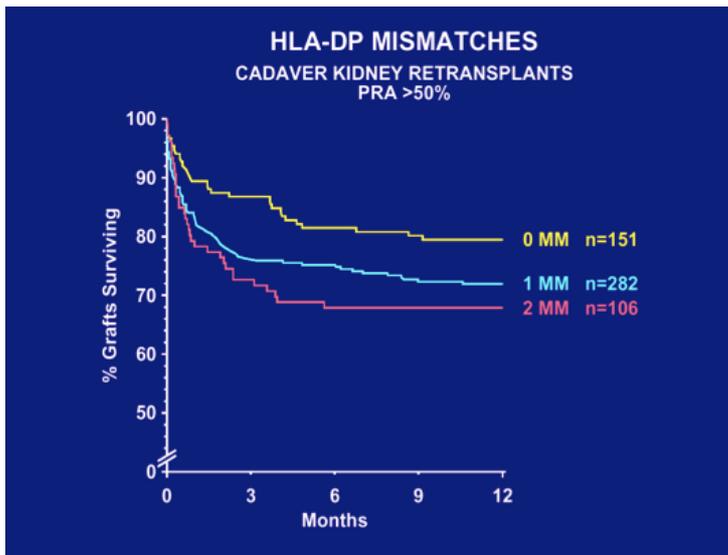


Abbildung 7 Gesamtüberleben in Monaten nach Nieren-Re-Transplantation, abhängig von Inkompatibilitätsstatus der HLA-DP polymorphen Regionen zwischen Spender und Empfänger. Mit freundlicher Genehmigung von Priv.-Doz. Dr. J. Mytilineos. Siehe auch [56].

Welche Rolle das HLA-DP in der allogenen Stammzelltransplantation spielt, ist jedoch bis heute noch umstritten. Vermutlich haben Patienten, die in den klassischen HLA's (HLA-A, -B,-C, -DR und -DQ) kompatibel sind (10/10 match) aber für HLA-DP Inkompatibel sind, ein höheres Risiko eine GvHD zu erleiden [65,50,77]. Bei Patienten die neben den klassischen HLA's auch für das HLA-DP kompatibel sind (12/12 match), ist es jedoch anzunehmen, dass sie eine erhöhte Rezidivrate aufweisen [76,50]. Letztere Beobachtung weist auf einen sogenannten GVL-Effekt bei HLA-DP-Inkompatibilität hin.

HLA-DP und T-Zell-Epitope (TCE)

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass bestimmte HLA-DP Merkmale, antigene Determinanten besitzen, die von den gleichen T-Zell-Klonen erkannt werden, die sogenannten T-Zell-Epitope (TCE). Anhand der jeweils vorliegenden Epitope können dann HLA-DP-Inkompatibilitäten in permissiv und nichtpermissiv eingeteilt werden. Die retrospektive Analyse dieser Einteilung auf den Erfolg der allogenen HSCT wies eine stärkere Aussagekraft auf, als bei der Betrachtung des HLA-DP-Kompatibilitätsstatus alleine. Es wurden dabei zwei Einteilungsalgorithmen veröffentlicht. Zum einen die Permissivitätseinteilung TCE3 von E. Zino et al. [100] und anschließend die Permissivitätseinteilung TCE4 von P. Crivello et al. [14], die

eine feinere Adjustierung der initialen TCE-Einteilung nach E. Zino darstellt [77,100,27,3,14].

HLA-DP und Expressionsrate

2012 beschrieb E. Petersdorf die genetische Variante in der Region rs9277534 des HLA-DP Gens, welche dessen Expressionsstärke beeinflusst. Rs9277534A steht hierbei für eine niedrige Expressionsrate und rs9277534G für eine hohe HLA-DP Expressionsrate. Analysen des allogenen HSCT Erfolgs, abhängig von der Expressionsstärke des HLA DP-Moleküls bei inkompatiblen Transplantationen, zeigten ein erhöhtes Risiko für eine akute GvHD, wenn der Spender ein rs9277534A und der Empfänger ein rs9277534G HLA-DP assoziiertes Allel trugen [65].

1.5. HLA Typisierungsverfahren

Stellt die Stammzelltransplantation die einzige kurative Therapie einer malignen hämatopoetischen Erkrankung dar, so muss der Patient zunächst HLA-typisiert werden. Das bedeutet, dass die typischen HLA-Klasse-I und -II Gene auf ihre Ausprägungsform (Allel) sequenziert werden. Dies geschieht in bestimmten Zentren weltweit, die hierfür spezialisiert sind. Da man von Mutter und Vater jeweils ein Allel erhält, sind es insgesamt 10 Allele die routinemäßig analysiert werden. Zu diesen gehören das HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ. Wird für den Patienten ein Spender gefunden, dessen klassischen HLA-Allele (HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ) mit denen des Patienten kompatibel sind, so spricht man von einem „10/10 match“. Stimmt ein Allel nicht überein, dann wäre es folglich ein 9/10 match. Es gibt verschiedene Methoden, wie das genetische Material sequenziert werden kann. Im folgenden werden diese Methoden erklärt.

1.5.1. Sequenzierverfahren nach Sanger

Nachdem 1942 die Struktur der DNA entschlüsselt wurde, entwickelten 35 Jahre später zwei Wissenschaftler, verschiedene Methoden, um die Basenabfolge von DNA-Abschnitten zu bestimmen. Eine dieser Methoden, wurde von Frederick Sanger etabliert. Hierbei handelte es sich um einen enzymatischen Neuaufbau des DNA-Abschnitts mit anschließender Analyse. (Kettenabbruch-Synthese). Für die Analyse wurden DNA-Polymerasen, ein Nukleotid-Mix sowie Fluoreszenz-markierte Stop-Nukleotide (Didesoxynukleotide) verwendet. Durch den Einbau dieser „Stopp-Nukleotide“ kommt es zum Syntheseabbruch an dieser Stelle und zu einem fluoreszierendem Signal. Jede der 4 Basen hat ein eigenes Lichtsignal, womit durch einen Detektor die exakte Basenabfolge erfasst werden kann. Durch die unterschiedliche Länge der DNA-Abschnitte kann dann, im Rahmen einer elektrophoretischen Gel-Analyse, die genaue Position der Base detektiert werden [97]. Dieses Verfahren wird seit einigen Jahren routinemäßig für die hochauflösende HLA-Diagnostik eingesetzt.

1.5.2. Nextgeneration Sequencing (NGS)

Bei der Next Generation Sequencing Methode handelt es sich um eine der wichtigsten Entwicklungen der letzten Jahre im Bereich der Biotechnologie. Es ist eine neue Technologie der Detektion von Basenabfolgen in DNA Abschnitten und ermöglicht sogar durch Parallelisierung eine Analyse der ganzen DNA (whole genome Sequencing). Dies erfolgt dabei in kürzester Zeit und mit minimalen Kosten und stellt damit eine Revolutionierung der DNA-Sequenzierung dar. Verschiedene Unternehmen etablierten eigene Methodiken und Geräte für die Next Generation Sequenzierung. Im Folgenden werden die Grundprinzipien von 2 verschiedenen NGS-Techniken erläutert, die in dieser Studie verwendet wurden. Die NGS-Technologie wurde in den letzten 3 Jahren zunehmend in die hochauflösende HLA-Diagnostik eingeführt und wird vermutlich längerfristig alle anderen hochauflösende Typisierungsverfahren ablösen.

Roche 454

Das Sequenzierprinzip der Roche 454 - Technologie basiert auf eine klonale Amplifizierung durch eine Emulsions-PCR und paralleler Pyrosequenzierung. (Der genaue Ablauf wird im Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben).

Die Detektion der Basenabfolge erfolgt durch Zugabe bestimmter Nukleotide, welche bei Verbindung zur vorherigen Base, Phosphatreste abspalten, welche anschließend durch eine Kaskade chemischer Reaktionen zu einem fluoreszierendem Signal führen. Die verschiedenen Basen werden nacheinander zugefügt, sodass je nachdem welche Base komplementär zum DNA-Template ist, die genaue Detektion des emittierten fluoreszierenden Lichtsignals und deren Position festgehalten werden kann [39].

Illumina SBS

Bei der „Sequencing by Synthesis“ (SBS) Methode von Illumina handelt es sich um einen Prozess bei dem initial eine fragmentierte Template-DNA kovalent an eine sogenannte „Flow-Cell“ gebunden wird und anschließend durch eine PCR-ähnliche Reaktion zu Template-DNA-Grüppchen (sogenannten „Clustern“) amplifiziert wird (Bridge amplification). Die Basenabfolge wird durch Zugabe einer Base pro Zyklus und Einbau derer an die komplementäre Matrix mit entsprechendem Lichtsignal, detektiert. Anschließend wird die Terminatorgruppe abgebaut und das nächste Nukleotid kann angebaut werden. Ein weiterer Vorteil hierbei ist die Möglichkeit die Sequenzierung von beiden Seiten der Matrix-DNA erfolgen zu lassen [39]. (Der genaue Ablauf wird im Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben).

1.6. Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger auf den Erfolg der allogenen HSCT zu analysieren. Es sollte dafür eine große multizentrische deutsche Patient-Spender-Kohorte nach unverwandter, allogener HSCT mittels Next Generation Sequenzierung auf die jeweiligen HLA-DP Allele untersucht werden. Als Erfolgsparameter für den Therapieerfolg sollen die Messgrößen Gesamtüberleben, Rezidivinzidenz, Inzidenz der akuten und chronischen

GvHD, transplantatassoziierte Mortalität , Nicht-Rezidiv-assoziierte Mortalität und krankheitsfreies Überleben verwendet werden. Da bereits einige internationale Studien über die Rolle vom HLA-DP beim Therapieerfolg der allogenen HSCT's durchgeführt worden sind, ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Gültigkeit der verschiedenen Theorien und Algorithmen zu HLA-DP Kompatibilität in einer großen deutschen Kohorte zu überprüfen und gegebenenfalls zu bestätigen. Da weiterhin der genaue Zusammenhang zwischen GvHD/GVL-Effekt und HLA-DP-Kompatibilität noch nicht genau geklärt ist, sollen weitere transplantations-beeinflussende Kriterien, wie zum Beispiel der CMV-Serostatus von Spender und Empfänger und deren Interaktion mit der HLA-DP Kompatibilität auf deren Einfluss auf GVL und GvHD untersucht werden.

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Patienten-Spender

2.1.1.1. Allgemein

Im Rahmen dieser retrospektiven mutizentrischen Studie, wurden DNA-Proben von 1831 Patienten und deren unverwandten Stammzellspendern verwendet. Schon zu Beginn der Studie lagen die hausinternen DNA-Asservate zur Verfügung, weshalb für diese Studie keine weiteren Probenentnahmen durchgeführt werden mussten.

Die DNA wurde im Zuge der HLA-Typisierung der Patienten zur Vorbereitung der allogenen Stammzelltransplantation sowie der Bestätigungstypisierung der selektierten Spender isoliert. Gleichzeitig zur Blutprobenabgabe, gaben die Patienten und Spender ihre Einverständnis zur Untersuchung der transplantationsrelevanten Gewebemerkmale und auch zur Gewinnung und Lagerung ihres genetischen Materials ab. Dabei wurden Proben und Datenanalysen anonymisiert bearbeitet. Dies erfolgte durch Zuordnung einer anonymen aufsteigenden Transplantations-Fallidentifikationsnummer eines jeden Transplantationspaares durch das DRST- (Deutsche Register für Stammzelltransplantation).

Patient und Spender waren zu Beginn der Studie jeweils HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1 vortypisiert, da der Kompatibilitätsgrad dieser Merkmale zwischen Spender und Patient für die Stammzelltransplantation, dem im Dritten Deutschen Konsensus zur immungenetischen Spenderauswahl festgelegten Kriterien, entsprechen musste.

Im Rahmen dieser Studie wurden dann alle Transplantationspaare für HLA-DPB1 sowie -DRB1 sequenziert. HLA-DRB1 wurde aus Qualitätskontrollgründen getestet.

Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm als positiv bewertet (Antrag Nr. 263/09).

Zur Bearbeitung der Proben wurden diese UV-spektrophotometrisch auf die DNA-Konzentration kontrolliert, welche einen Mindestwert von 15 ng/µl aufweisen

musste. Bei Unterschreitung dieses Wertes wurde das DNA-Material mittels Whole Genome amplification (Genomifi) vervielfältigt.

2.1.1.2. Studienaufbau und Patientencharakteristika

Bei dieser Studie handelt es sich um eine retrospektive Analyse. Folgende klinischen Ereignisse/Endpunkte wurden mit den Ergebnissen der Genotypisierung der Transplantations-Paare (Tx-Paare) in Bezug gebracht:

- Gesamtüberleben (in Tagen bis zum Eintritt des Todes, engl: OS: Overall Survival)
- Rezidivfreies Überleben (in Tagen bis zum Eintritt des Rezidivs bzw des Todes, engl.: DFS = Disease Free Survival)
- Rezidivinzidenz (engl: Relapse Incidence)
- Transplantationsassoziierte Mortalität (engl.: TRM = Transplant Related Mortality)
- Chronische „Graft versus host“ Erkrankung (cGvHD)
- Akute „Graft versus Host“ Erkrankung (aGvHD)

Die Kohorte für diese Studie wurde nach den folgenden Kriterien ausgewählt:

- Die allogene Stammzelltransplantation erfolgte ausschließlich durch unverwandte Fremdspender
- Die Transplantationen fanden von 2000 bis 2009 statt
- Zweittransplantationen wurden ausgeschlossen
- Bei allen Patienten war das hämatopoetische System durch eine neoplastische Erkrankung betroffen (z.B. nicht klassifizierte akute Leukämie (AL), Akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML) chronisch lymphatische Leukämie (CLL), chronische myeloide Leukämie (CML), Non-Hodgkin Lymphom (NHL), myelodysplastisches Syndrom (MDS) und multiples Myelom (MM)).
- Die Stammzellquelle der Spender stammte entweder aus peripheren Blut oder Knochenmark (keine Transplantationen mit Nabelschnurblut als Stammzellquelle).

- Die Patienten erhielten vor der Transplantation eine myeloablative Konditionierung oder eine Konditionierung mit reduzierter Intensität
- DNA und klinische Follow up-Daten von Spender und Empfänger waren vorhanden

Bei der nach obigen Kriterien selektierten Studienkohorte handelte es sich um ein Kollektiv von 1831 Transplantationspaaren, die in 20 verschiedenen Transplantationszentren transplantiert wurden. Eine Übersicht der Patientencharakteristik ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 (Teil 1) Patientencharakteristik mit jeweils absoluter und relativer Fallzahl.

		Absolute Fallzahl	Relative Fallzahl
Anzahl der Patienten		1831	100%
Anzahl der Tx-Zentren	20		
Patientenalter bei Tx			
	0-17	51	2,8%
	18-30	220	12,0%
	31-40	228	12,5%
	41-50	365	20,0%
	51-60	540	29,5%
	61-70	408	22,3%
	71-80	19	1,0%
Geschlecht			
	Patient:		
	Männlich (Pm)	1097	40%
	Weiblich (Pw)	734	60%
	Spender:		
	Männlich (Sm)	1348	26%
	Weiblich (Sw)	483	74%
Geschlechts-Match			
	Pm/Sw	226	12,3%
	Andere Kombi	1605	87,7%

Tabelle 4 (Teil 2) Patientencharakteristik mit jeweils absoluter und relativer Fallzahl.

	Absolute Fallzahl	Relative Fallzahl
Diagnose		
AL	107	5,8%
AML	576	31,5%
ALL	260	14,2%
CML	86	4,7%
CLL	100	5,5%
MDS	345	18,8%
MM	154	8,4%
Lymphome	203	11,0%
Krankheitsstadium		
Früh	730	40%
Intermediär	544	30%
Fortgeschritten	556	30%
Konditionierung		
Myeloablativ	1126	61,5%
Reduzierte Intensität	376	20,5%
Nicht-myeloablativ	329	18%
Jahr der Transplantation		
1999-2002	26	1,4%
2003-2005	499	27,3%
2006-2009	1306	71,3%
Transplantatquelle		
Knochenmark	151	8,2%
PBSC	1680	91,8%
HLA-Kompatibilitätsgrad ohne HLA-DP		
Komplett kompatibel (10/10)	1070	58,4%
Ein HLA Mismatch (9/10)	553	30,2%
Mehr als ein HLA mismatch (>8/10)	208	11,4%

2.1.1.3. Kooperierende Zentren

Tabelle 5 Auflistung der kooperierenden Zentren und die absolut und relative Anzahl der jeweiligen Transplantationspaare. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009.

Zentren	Absolute Zahl	Relative Zahl
Leipzig, Klinik für Innere Medizin	440	24,0%
Universitätsklinikum Ulm	182	10,0%
Kiel, II. Med. Klinik , Sektion für Stammzell- und Immuntherapie,	175	9,5%
Würzburg	125	6,8%
Mainz, III. Med. Klinik u. Poliklinik Klinikum der Joh.-Gutenberg-Universität	121	6,6%
Wiesbaden	117	6,4%
Berlin, Charité Campus Virchow	112	6,1%
Göttingen, Med. Klinik und Poliklinik Georg-August-Univ	107	5,8%
Homburg, Unikliniken, Innere Med. I	105	5,7%
Nürnberg, Klinikum Stadt Nürnberg, 5. Medizinische Klinik,	74	4,0%
Erlangen, Universitätsklinikum	62	3,4%
Hamburg St. Georg, AK St. Georg / Haus G	61	3,3%
Rostock, Universitätsklinikum	40	2,2%
Essen Werden, Evangelisches Krankenhaus	29	1,6%
Bremen, Klinikum Bremen-Mitte gGmbH, Klinik für Innere Medizin I	22	1,2%
Idar Oberstein, Klinik für Knochenmarktransplantation	20	1,1%
Oldenburg, KMT Klinikum	14	0,8%
Frankfurt, Universitätsklinikum	15	0,8%
Stuttgart, Robert-Bosch-Krankenhaus, Abt. Innere Med. 2	9	0,5%
Karlsruhe, Medizinische Klinik III	1	0,05%

2.1.2. Labormaterialien, Geräte, Software

Laborgeräte

I. Pipetten:

- Einkanalpipetten:

Modell Eppendorf Reference (variable), 0,5 -10 μ l, 10 - 100 μ l, 100 - 1000 μ l,
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Achtkanalpipetten:

- a) Modell Eppendorf Research, 0,5 - 10 μ l, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- b) Modell Acura, 10 - 50 μ l, Socorex, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
- c) Digitale Pipette: Modell Multipette plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland.

II. Kleine und mittlere Geräte:

- Gerät zur Kapillarelektrophorese: QiAxcel, Baujahr: nicht ermittelbar, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Laborwagen
 - a) Navigator, Seriennummer S/N 1120100989, Baujahr: 2001, Ohaus GmbH Deutschland, Giessen, Deutschland
 - b) Scout Pro, Seriennummer: S/N 7123070935, Baujahr: 2003, Ohaus HmbH Deutschland, Giessen, deutschland

III. Plattenzentrifuge:

Multifuge 3S+, Seriennummer: 41100527, Baujahr: 2010 , Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH Hanau, Deutschland

IV. Thermocycler:

- GeneAmp PCR Systems 9600, Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Deutschland.
- GeneAmp PCR Systems 9700, Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Deutschland.
- peqSTAR, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland.
- PTC-200, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

V. Thermomixer:

Thermomixer 5436, Seriennummer: 5436B 06206, Baujahr: nicht ermittelbar, Datum der Beschaffung: nicht ermittelbar, Eppendorf, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Köln, Deutschland

VI. Tischzentrifugen:

- Biofuge Pico, Seriennummer: 236490, Baujahr: 1996, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH Hanau, Deutschland
- Eppendorf Zentrifuge 5415, Seriennummer: 5425 25590, Baujahr: 2000, Eppendorf, Nietheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

VII. Vortexer:

- Vortex-Genie, Seriennummer: 12130, Baujahr: 1994, vormals: Bender + Hobein, jetzt: VWR, VWR International GmbH, Ulm, Deutschland
- K-550-GE, Seriennummer: Z11121, Baujahr: 1994, vormals: Bender + Hobein, jetzt: VWR, VWR International GmbH, Ulm, Deutschland

VIII. Real-Time PCR:

7500 fast Real-Time PCR System, Seriennummer: 27501334, Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

IX. MiSeq von Illumina:

- Seriennummer: MO2712, Illumina GmbH, München, Deutschland
- Seriennummer: MO4363, Illumina GmbH, München, Deutschland

X. GS Junior 454 Sequencer von Roche:

Seriennummer: GS.Junior_10100418, Roche GmbH, Mannheim, Deutschland

XI. Magnetständer für Amplicon Aufreinigung:

Cat. Nr.: 12321D, life Technology GmbH, Darmstadt, Deutschland

XII. Großgeräte

- Abzugshaube: Tischabzug, Airflow Controller, Einrichtungsserie SCALA, Typ 1200, Seriennummer: AC3 03.12 AZ1.1, Baujahr 2011, WALDNER Laboreinrichtungen GmbH Co. KG, Wangen im Allgäu, Deutschland
- Kühl- und Gefrierschränke: Seriennummern und Baujahre siehe Tabelle 6.

a) Kühlschränke

1. Super, Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland.
2. Super 520, Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland.

b) Kühl-/Gefrierschränke

1. Biocompact 210, Kältetechnik Rauschenbach GmbH, Bergneustadt, Deutschland.
2. Biomedical Freezer, SANYO Biomedical, Bad Nenndorf, Deutschland.

c) Gefrierschränke -20 °C

1. Froster, Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland.
2. Froster 520, Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland.
3. Gram, Kältetechnik Rauschenbach GmbH, Bergneustadt, Deutschland.

4. Kirsch, Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland.

d) Gefrierschrank -80 _C

ThermoFisher, Thermo Electron, Langenselbold, Deutschland.

XIII. Pipettierroboter:

a) Aufreinigung der HLA-PCR-Produkte bei den Illumia Läufen

Hamilton 3: Janus 4Tip, Seriennummer: DG 07061231, Post-PCR-Bereich, Baujahr 2012, Microlab Star, Hamilton AG, Bonaduz, Schweiz.

Labormaterialien

- I. 96-Well Platte mit Barcode: MicroAmp optical 96-well reaction plate mit Barcode, Art. Nr. 4306737, Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland.
- II. 96-Well Platte ohne Barcode: ThermoFast 96-well non-skirted plates, Art. Nr. AB-0600, Thermo Scientific, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland.
- III. Combitips plus und Combitips advanced, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
 - 0,1 ml plus: nicht mehr erhältlich; advanced: Art. Nr. 0030089618
 - 0,2 ml plus: nicht mehr erhältlich; advanced: Art. Nr. 0030089626
 - 0,5 ml plus: nicht mehr erhältlich; advanced: Art. Nr. 0030089634
- IV. Eppendorf Reaktionsgefäße: Eppendorf Tubes 3810X 1,5 ml, Art. Nr. 0030125150, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- V. Domed Cap Strips, Art. Nr. SP-0216, Thermo Scientific, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland.
- VI. Gummimatten für Verschluss der 96-Well Platten zur Sequenzierung: Plate Septa 96-Well, Art. Nr. 4315933, Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland.
- VII. Klebefolie für 96-Well Platten, Art. Nr. AB-0558, Adhesive PCR Film, Thermo Scientific Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland.
- VIII. Pipettenspitzen: Artikelnummern siehe Tabelle 8.
 - Safe Seal Tips ®premium, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Biozym Scientific GmbH,

Oldendorf, Deutschland.

- epT.I.P.S Reloads, 0,1 - 10 μ l, 2 - 200 μ l, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland.

Software

I. ABC-Programm:

Version 1.3.3, Auswertung von QIAxcel-Daten (initiale PCR-Reaktion) und Erstellung von Arbeitsprotokollen für den Hamilton Microlab Star, IKT, Ulm, Deutschland.

II. EVP:

Ergebnis-Vergleich-Programm, Version 1.0.1.0; validiertes „in Haus Tool“ programmiert durch Stefan Rau, vergleicht Rohsequenzen mit HLA Datenbank,

III. Methodenmanager:

Version 3, Programm zur Bedienung des Hamilton Microlab Star, Hamilton AG, Bonaduz, Schweiz

IV. QIAxcel ScreenGel Software:

Version 1.0.2, Programm zur Auswertung der Kappilargelelektrophorese, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland.

V. R:

Version 3.1.0, Programmiersprache zur statistischen Berechnung und grafischen Darstellung.

VI. R Software-Zusatzpakete:

- „cmprsk“: Kumulativen Inzidenzanalysen [36]
- „crrSC“: Kompetitive Risikoanalyse [87]
- „gap“: Analyse von Haplotyp-Frequenzen
- „survival“: Kaplan-Meier Analysen und Cox-Regressionsmodelle [88]

VII. Sequence Pilot - HLA SBT Allele identification Software:

Version 3.5.2 Build 508, Analysesoftware für HLA-Sequenzdaten, JSI Medical Systems GmbH, Ettenheim, Deutschland.

2.1.3. Chemikalien, Reagenzien, Enzyme

- I. Agencourt AMPure XP: Art. Nr. A63882, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland.
- II. Ethanol absolut: Emsure Ethanol-absolut, Art. Nr. 100983, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
- III. LiChrosolv Wasser (HPLC aqua dest.): Art. Nr. 115333, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- IV. Quant-iT(tm) PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Katalognummer P11496, Firma Thermo Fisher Scientific
- V. Primer: Primer für HLA-DR und DP PCR und Sequenzierung (MID-Primer) wurden bei Metabion International Ag, Martinsried, Deutschland bestellt. Die Sequenzier Primer bei den Roche Läufen waren in den Sequenzierkits dabei (siehe 2.1.4 Testkits)
- VI. Isopropanol, Art. Nr. A3928, 05 00PE, PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- VII. Taq DNA Polymerase: 5 units/_l Art. Nr. 201209, Qiagen N.V., Hilden, Deutschland.
- VIII. Sodium hydroxide solution: Art. Nr. 24886357, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland Chemie GmbH, München, Deutschland
- IX. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit: Art. Nr: P7589, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
- X. Tween 20 (Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate): Molecular Biology Grade, Art. Nr. A4974, 0100, PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland.
- XI. Tris-EDTA Puffer: Art. Nr. T9285, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland.
- XII. PCR Puffer (MasterMix) in Haus Produkt, CE zertifiziert, DRK-BSD Baden Württemberg – Hessen gGmbH, Frankfurt am Main, Deutschland, lokalisiert im IKT-Ulm, Deutschland
 - a. Inhalt: siehe Tabelle 7

Tabelle 6 Zusammensetzung des PCR Puffers/Master Mix

	Chemikalien	Name	Anteil	Cas Nummer
MasterMix	Ammonium Sulfat		12%	7783-20-2
	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	0,95%	77-68-1
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid	7,1%	7786-30-3
	Glycerol 99,5%	Glycerin	7,4%	56-81-5
	Desoxyribonuklein Säure (DNS)	Oligonukleotid Primer	0,98%	
	Tween 20		0,027%	900-64-5
	HPLC Wasser		71,5%	773218-5

2.1.4. Testkits

Roche

Für die „Emulsions“-Amplifikation (=emPCR):

- I. GS FLX Titanium MV emPCR Lib-A Kit
 - GS FLX Titanium Bead Recovery Reagents
 - GS FLX Titanium emPCR Reagents, Lib-A
 - GS FLX Titanium Emulsion Oil
- II. Em PCR bead counter
- III. GS Junior Titanium emPCR Oil and Breaking Kit

Für die Sequenzierung:

- IV. GS Junior Sequencing Kit
 - Sequencing Kit Reagent and Enzymes
 - Sequencing Kit Buffers
 - Sequencing Kit Packing Beads and Supplement CB
- V. GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit
- VI. GS Junior Maintenance wash Kit

Illumina

MySeq Reagent Kit – 500V2, Illumina GmbH, München, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Genomphi -Amplifikation

In einem vorherigen Prozess wurde die Konzentration der DNA-Proben gemessen und falls diese unter einer bestimmten Grenze gefallen waren, wurden sie mit Hilfe des "Genomphi-Kits" vervielfältigt. Die vervielfältigten Genomphi-Proben waren schon vor Beginn dieser Studie angefertigt. Da die per Genomphi vervielfachten Proben nun eine stark erhöhte DNA-Konzentration im Vergleich zu den herkömmlich isolierten Proben aufwiesen, wurden diese vor deren Einsatz in den Typisierungsassays in einem Verhältnis von 1:10 mit H₂O verdünnt.

2.2.2. Genotypisierung der HLA-DRB und HLA-DPB1 Gene

In dieser Studie wurde für die Genotypisierung die Next Generation Sequencing Methode verwendet. Es wurden zwei verschiedene Geräte und Methodiken dafür in Gebrauch genommen. Die erste Hälfte der Proben erfolgte mit dem GS Junior 454 Sequencer von Roche und die andere Hälfte wurde mit dem MiSeq von Illumina sequenziert. Der Wechsel der Sequenzierer erfolgte zum einen aufgrund der Produktionseinstellung der Rochekits durch Roche und zum anderen wegen der besseren Leistung der Illumina MiSeq-Technologie. Wie schon im Abschnitt 1.5.3. beschrieben, handelt es sich bei diesen beiden Sequenziervorgängen um die neue Art des Sequenzierens, dem „Next Generation Sequencing“.

Die Abläufe der beiden Methodiken unterscheiden sich in vielen Punkten, weshalb sie separat aufgeführt werden.

2.2.2.1. Roche 454

Im Folgenden wird zuerst allgemein der Prozess der Genotypisierung mittels Roche 454-Technologie beschrieben und im darauffolgenden Abschnitt, wird auf die einzelnen Schritte genauer eingegangen.

Allgemeine Methodik:

Der Roche 454 funktioniert auf dem Prinzip der Pyrosequenzierung. Im Gegensatz zu Sangermethode werden die jeweiligen Basenfolgen nicht durch fluoreszenzmarkierte Abbruchnukleotide bestimmt, sondern durch Abspaltung von Pyrrophosphaten bei Verbindung des nächsten Desoxynukleotids. Durch ein Gemisch von weiteren Enzymen kommt es durch die abgespalteten Pyrrophosphate zu einem fluoreszierenden Lichtsignal, welches dann durch einen Detektor aufgenommen wird. Hiermit kann die genaue Lokalisation im DNA Strang sowie die genaue Base ermittelt und gespeichert werden. Da es sich hier, um in verschiedenen Kammern gleichzeitig ablaufende Prozesse handelt, wird jedem DNA-Strang, der sequenziert werden soll, ein individueller molekularer Barcode (MID) zugewiesen, sodass diese voneinander unterschieden werden können.

Dies geschieht zu Beginn beim Ansetzen der PCR mit speziell markierten Primern. In diesem Schritt werden die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte wie bei der üblichen PCR mit für den zu sequenzierenden Bereich typischen Primern, taq Polymerasen und einem Mastermix amplifiziert, wobei an den Primern die MID-Moleküle gekoppelt werden. Die restlichen, nicht zu verwertbaren Abschnitte der DNA werden in einem Reinigungsprozess verworfen. Die vervielfältigten DNA-Stränge werden anschließend in mehrere kleine Pools zusammengefasst und auf ihre Konzentration geprüft. Anschließend werden sie so eingestellt, dass sich in jedem Pool die gleiche DNA-Menge in gleicher Konzentration befindet. In einem weiteren Schritt wird eine Emulsions-PCR (emPCR) durchgeführt. Hierbei werden durch einen Denaturierungsprozess die Doppelstränge in Einzelstränge überführt. Diese werden dann in einem Wasser-in-Öl-Gemisch erneut vervielfacht. Das Besondere hierbei ist, dass die verschiedenen Proben, die in vorherigen Schritten schon gepoolt wurden, nun in eine einzige Lösung überführt werden. Aufgrund der MID markierten Stränge, kann bei der späteren Analyse jeder einzelne DNA-Strang trotzdem genau einer

Testperson zugeordnet werden. Eine weitere Besonderheit ergibt sich dadurch, dass durch die Emulsionsmischung mehrere kleine Microreaktionsräume entstehen, in denen die Vervielfältigungsreaktionen parallel ablaufen können.

Bevor die DNA-Abschnitte nun vollständig sequenziert werden können, erfolgt eine weitere Aufreinigung der Proben von den emPCR-Reagenzien. Anschließend wird die aufgereinigte Lösung in einer Pico Titer Platte überführt. Dort können die Sequenzierungsreaktionen wieder Parallel in mehreren Pico-Kammern nach dem Schema der Pyrrosequenzierung ablaufen.

Genauere Durchführung:

Erstellen einer DNA-Anordnungsliste und Zuweisung der MIDs

DNA-Anordnungsliste

Die Proben wurden in Batches von 96 bearbeitet. Innerhalb eines "Batches" waren die Patienten und Spender-IDs nach aufsteigender Zahl angeordnet und wurden nach dieser Reihenfolge bearbeitet. Pro Lauf konnten somit 48 Transplantationspaare (48 Spender=S und 48 Patienten=P) genotypisiert werden. Die Anordnung der Proben verlief spaltenweise. Ein Beispiel für eine DNA-Anordnung auf den PCR-Platten ist in Abbildung 8 zu sehen. Bei den Ziffern handelt es sich jeweils um die zugehörige aufsteigende Transplantationsnummer. "P" steht hierbei für Patient und "S" für Spender. Ein solches Plattenlayout wurde bei jedem Sequenzierlauf initial hergestellt. Es entstanden hierbei jeweils 2 Platten mit identischen Proben. In der einen Platte wurde das HLA-DRB1-Gen amplifiziert und in der anderen Platte das HLA-DPB1-Gen.

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	735P	784P	847P	956P	992P	1034P	1246P	1287P	1368P	1441P	1479P	1559P
3	735S	784S	847S	956S	992S	1034S	1246S	1287S	1368S	1441S	1479S	1559S
4	737P	826P	859P	961P	998P	1137P	1248P	1318P	1388P	1442P	1528P	1574P
5	737S	826S	859S	961S	998S	1137S	1248S	1318S	1388S	1442S	1528S	1574S
6	754P	835P	869P	975P	1004P	1186P	1257P	1329P	1426P	1443P	1531P	1575P
7	754S	835S	869S	975S	1004S	1186S	1257S	1329S	1426S	1443S	1531S	1575S
8	775P	838P	941P	976P	1021P	1235P	1268P	1366P	1428P	1464P	1536P	1581P
9	775S	838S	941S	976S	1021S	1235S	1268S	1366S	1428S	1464S	1536S	1581S

Abbildung 8 Beispiel für eine DNA-Anordnungsliste. Die Ziffern stehen jeweils für die Transplantations-Identifikationsnummer. P=Patient, S=Spender.

MID-Anordnung

Die Zuordnung der MID-Primer für die jeweilige Transplantationsnummer wurde initial vorbestimmt und auf eine 96-well Platte übertragen. Die MID-Primer bestehen aus einer Adaptersequenz, einer Schlüsselsequenz, der MID-Sequenz und aus der Genomspezifischen Sequenz (siehe Abbildung 9) die sich an die zu verfielfachende DNA-Sequenz andockt und somit die PCR-Reaktion triggert.

Jedem Well der 96-well Platte ist ein bestimmter Vorwärts- und Rückwärtsprimer zugewiesen. Die Primer-Kombinationen sind jeweils so bestimmt, dass sie innerhalb einer 96-Well Platte einmalig vorkommen, sodass nach dem Poolen der Proben jede Vorwärts-Rückwärts MID-Primer-Kombination einer einzelnen Testperson zugewiesen werden kann und somit Verwechslungen ausgeschlossen werden. Die Tabelle 6 veranschaulicht eine fertige Primer-Platte mit den zugehörigen MID-Codes, die jeweils einmal für die HLA-DPB1 und HLA-DRB1 amplifizierung verwendet wurden.

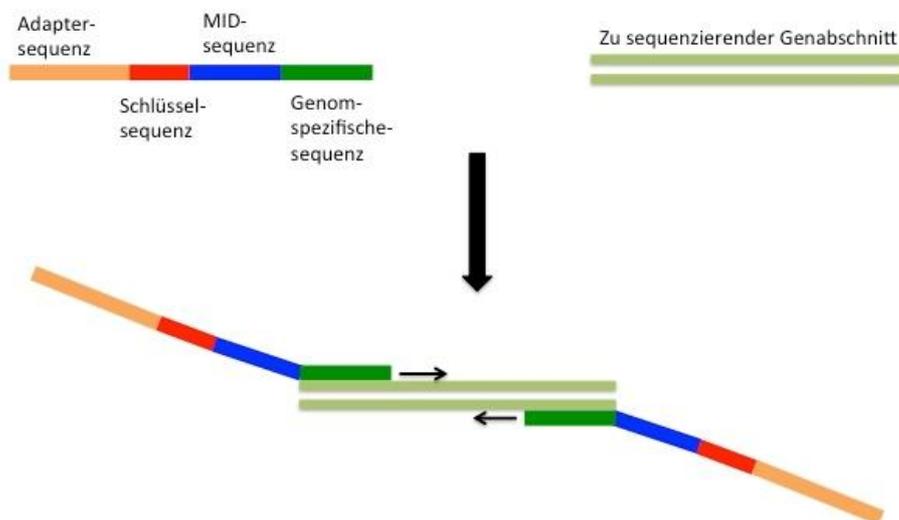


Abbildung 9 Vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines MID Primers mit seinen einzelnen Komponenten. (Adaptersequenz, Schlüsselsequenz, MID-Sequenz und Genomspezifische Sequenz)

Tabelle 7 Anordnung der MID Codes auf den Primerplatten. Die vordere Ziffer gibt jeweils den Code für den MID-Vorwärtsprimer und die hintere Ziffer die des MID-Rückwärtsprimers an.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40/50	40/51	40/52	40/53	40/54	40/55	40/56	40/57	40/58	40/59	40/60	40/61
B	41/50	41/51	41/52	41/53	41/54	41/55	41/56	41/57	41/58	41/59	41/60	41/61
C	42/50	42/51	42/52	42/53	42/54	42/55	42/56	42/57	42/58	42/59	42/60	42/61
D	43/50	43/51	43/52	43/53	43/54	43/55	43/56	43/57	43/58	43/59	43/60	43/61
E	44/50	44/51	44/52	44/53	44/54	44/55	44/56	44/57	44/58	44/59	44/60	44/61
F	45/50	45/51	45/52	45/53	45/54	45/55	45/56	45/57	45/58	45/59	45/60	45/61
G	46/50	46/51	46/52	46/53	46/54	46/55	46/56	46/57	46/58	46/59	46/60	46/61
H	47/50	47/51	47/52	47/53	47/54	47/55	47/56	47/57	47/58	47/59	47/60	47/61

Amplifikation mittels PCR

Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 7 beschrieben und wurde in angegebener Reihenfolge manuell pipettiert. Im Anschluss daran wurde die DNA-Vervielfältigung im Thermocycler durchgeführt. Es wurde hierbei das Programm „NGS-Roche-PCR“ verwendet. Das Temperaturprofil des Programms ist in Tabelle 8 angegeben. Um den Erfolg der Amplifikation zu kontrollieren und die nachfolgenden komplexen Schritte nicht unnötigerweise durchführen zu müssen, wurde der Erfolg jeder PCR-Reaktion durch den Nachweis der Amplifikate mittels einer Kapillarelektrophorese in einem Quiaxel-Apparat überprüft.

Tabelle 8 Reagenzien und Volumina für den PCR-Ansatz der Roche-Methodik.

Reagenzien	Volumen pro Well
ABC Mastermix	24 µl/Well
Taq Polymerase	0.3 µl/Well
MID Primer	2 µl/Well
DNA	1 µl/Well

Tabelle 9 Thermocyclerprogramm des NGS-Roche-PCR-Profiles

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	600 (10min)	1
Denaturierung	95	15	35
Annealing	62	30	
Enlongation	72	300 (5min)	1
Kühlung/Lagerung	4	∞	

Poolen

Mit der 8-Kanalpipette wurden aus jeder Spalte (Positionen A1-H1bis A12-H12) der 96-well Platte 5 µl/Well in die erste Spalte einer neuen Platte (Position A1-H1) überführt. Die Amplifikate einer gesamten Platte wurden somit auf einer einzelnen Spalte (=8 Wells) mit je 60 µl gesammelt (=gepoolt). Es wurden auf diese Weise für jeweils die DRB1-Amplifikation (=Platte 1) und die DPB1-Amplifikation (=Platte 2) zwei separate Pools generiert. Nachdem die Einzelpools mit einer 8-Kanalpipette gut vermischt wurden, wurden je 22,5 µl/Well in jeweils ein Eppendorf Röhrchen pipettiert, sodass am Schluß 2 Eppendorf-Röhrchen mit je 80µl Inhalt generiert werden konnte (je ein Eppendorf für HLA-DPB1 und -DRB1).

Aufreinigen der Pools

Die Aufreinigung der Pools erfolgt, um die überflüssigen DNA-Abschnitte, Primer und Salze der PCR-Mischung zu entfernen, um somit nur noch die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte übrig zu lassen.

Die Aufreinigung erfolgte mittels magnetischer Beads. Diese binden sich durch chemische Prozesse an die Amplifikate. Bei Anbringen eines Magnets an die Eppendorfröhrchenwand, können so die restlichen Substanzen von den PCR-Produkten getrennt werden. Die übrige Flüssigkeit kann dann abgesaugt und verworfen werden. Durch mehrere Waschdurchgänge, wird gewährleistet, dass die Amplifikate eine ausreichende Reinheit erhalten. Zum Schluss werden die angebundenen DNA-Stränge von den magnetischen Beads, durch Zugabe einer Lösesubstanz, gelöst. Tabelle 9 listet die genauen Abläufe, verwendete Substanzen und ihre jeweiligen Volumina auf.

Tabelle 10 Tabellarische Darstellung der einzelnen Schritte der Aufreinigung des PCR-Produkts.

Schritt	Substanz pro Eppendorf	Dauer
1. Zugabe von Wasser	Liqrosolv 180 µl (180 µl Probe + 180 µl Wasser)	
2. Zugabe der Magnete	Ampure-Beads 360 µl (360 µl Probe-Wasser + 360 µl Beads)	
3. Inkubation		10 min
4. Inkubation auf dem Magnetständer		5 min
5. Absaugen der übriggebliebenen Flüssigkeit		
6. Aufreinigung	70%iges Ethanol 720 µl (720 µl Probe-Wasser-Bead + 720 µl Ethanol)	
7. Vortexen		
8. Inkubation auf Magneten		2 min
9. Absaugen des Überstands		
10. Wiederholen der Schritte 6.-9.		
11. bei 37°C auf dem Thermoblock trocknen lassen		10-15 min
12. Zugabe von TE zur Elution der DNA von den Beads	70 µl TE	
13. Vortexen		
Inkubation auf Magneten		2 min
Überführung der Proben in neue Eppendorf Röhrchen.		

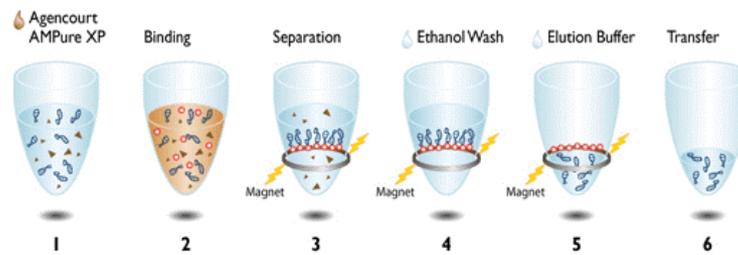


Abbildung 10 Prinzip der Aufreinigung mit magnetischen Beads mit freundlicher Genehmigung von "Beckman Coulter Life Science webseite, Produkt: AMPure XP". Agencourt AMPure XP= magnetische Beads, Binding=Bindung der PCR Produkte an die magnetischen Beads, Separation: Anbringen des Magneten von außen an das Eppendorf Röhrchen. An PCR-Produkt gebundene magnetische Beads werden vom außenangelegten Magneten nach außen gezogen. Ethanol wash = Mit einer ethanolhaltigen Lösung wird die DNA auf die Beads gefällt und somit gereinigt. Die restliche Flüssigkeit in derer sich überflüssige PCR Reagenzien befindet kann verworfen werden. Elution Buffer = Durch einen geeigneten Puffer können die magnetischen Beads von dem PCR-Produkt getrennt werden und somit bleibt im Überstand das reine PCR Produkt. Dieses kann bei anliegendem Magneten in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt werden.

Quantifizierung

Um eine gleichmäßige Repräsentation der HLA-DPB1- und HLA-DRB1-Amplifikate bei den nachfolgenden Schritten zu gewährleisten, müssen die jeweiligen Konzentrationen der gereinigten Ampifikat-Pools angeglichen werden.

Hierfür wird zunächst in sieben Eppendorf-Röhrchen eine Verdünnungsreihe einer DNA-Präparation mit bekannter Konzentration angefertigt. Im 8. Eppendorf-Röhrchen wird keine DNA zugefügt womit diese als Negativprobe gilt.

Aus den aufgereinigten HLA-DRB1 und -DPB1 Röhrchen werden je 1 µl mit 99 µl 1xTE vermenget.

Daraus werden jeweils 50 µl in die Quantifizierungsplatte überführt.

Anschließend werden je 50 µl der Standards 1-8 in die Quantifizierungsplatte überführt und jedem befülltem Well 50 µl Farbstoff (PicoGreen, 1:200 in 1xTE vorverdünnt) hinzugefügt. Aus den gemessenen Werten der Verdünnungsreihe (Standards) wird mittels eines Real-Time-PCR-Geräts eine Kurve gezeichnet, anhand welcher die Konzentrationen (Moleküle/µl) der Amplifikate bestimmt werden kann. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu bekommen, muss der R^2 -Wert der Standardkurve mindestens bei 0.98 liegen. Liegt er darunter, ist die Messung zu ungenau und die Quantifizierung muss wiederholt werden. Anschließend wird die Konzentration der gepoolten und gereinigten HLA-DR- und -DP-Amplifikate auf 10^9 Moleküle/µl eingestellt.

Emulsions-PCR

Bei der Emulsions-PCR wird eine Öl-in-Wasser-Emulsion hergestellt, in der in den einzelnen Mizellen die Amplifikationsreaktion an nichtmagnetischen Beads, den sogenannten Capture Beads, stattfinden kann. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte erläutert:

1. Es wird durch Zugabe von „Emulsions-Oils“ und Mock Mix aus dem emPCR-Kit eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus der Probe hergestellt
2. Die Amplifikat-Pools werden mit den „Capture Beads“ und den für die emPCR benötigten Reagenzien gemischt.
3. Mit einem speziellen PCR-Programm werden die an Capture Beads gebundenen DNA-Abschnitte nun in den Mizellen, bzw. auch Mikroreaktoren genannt, vervielfacht. Pro Milliliter können hierbei ca. 10^6 Mikroreaktoren vorkommen. Jedes Capture Bead kann ungefähr 10 Millionen klonale Kopien durch diesen parallel verlaufenden Vorgang enthalten.
4. Nach der Amplifizierung wird die Emulsion wieder aufgelöst, dies geschieht durch das Spülen mit Alkohol und Zentrifugation der an Capture Beads gebundenen DNA-Abschnitte.

Bead-Enrichment

Durch das Bead-Enrichment werden die DNA beladenen Capture Beads von den nicht beladenen Beads getrennt.

1. Durch chemische Denaturierung mit Natronlauge werden die Doppelstränge (dsDNA) wieder zu Einzelsträngen (ssDNA). Ein Strang bleibt an dem nicht magnetischen Capture Bead gekoppelt, während sich der zweite in die wässrige Phase auflöst.
2. Ein Biotin-gekoppelter Enrichmentprimer wird hinzugefügt und bindet komplementär an die an Capture Beads gebundenen ssDNA's.
3. Das Biotin bindet wiederum an magnetische Enrichment Beads, die mit Streptavidin beladen sind.
4. Mit einem Magneten, der von extern angelegt wird, können die an DNA gebundenen magnetischen Capture Beads, von den anderen, nicht an DNA und

somit nicht an die magnetischen Enrichment-Beads gebundenen Capture Beads, getrennt werden. Der Überstand, der nicht gebundene DNA-Stränge und leere Capture Beads beinhaltet, kann verworfen werden.

5. Im letzten Schritt wird die DNA von den magnetischen Enrichment-Beads durch „Melt Solution“ entfernt. Durch den GS Junior Bead Counter kann überprüft werden, ob genug beladene Beads vorhanden sind.

Beladen der Picotiter-Platte und Sequenzierung

Die Picotiter-Platte enthält mehrere kleine Kammern. Diese sind so klein, dass pro Kammer genau ein mit DNA beladener Bead hinein passt. (Durchmesser der Kammer 29 μm , Durchmesser der Beads 20 μm) Es können so, parallel und getrennt voneinander Sequenzierungsreaktionen ablaufen. In nachfolgenden Schritten werden die, für die Pyrosequenzierung verwendeten Reagenzien in einer vorgegebenen Reihenfolge auf die Picotiter-Platte hinzugegeben. (Siehe Abbildung 11) Der Roche 454 funktioniert auf dem Prinzip der Pyrosequenzierung. Im Gegensatz zu Sangermethode werden die jeweiligen Basenfolgen nicht durch fluoreszenzmarkierte Abbruchnukleotide bestimmt, sondern durch Abspaltung von Pyrrophosphaten bei Verbindung des nächsten Desoxynukleotids. Durch ein Gemisch von weiteren Enzymen kommt es durch die Pyrrophosphate zu einem fluoreszierenden Lichtsignal. Dieses wird durch einen Detektor aufgenommen und gibt Aufschluss über die genau Lokalisation einer Base und welche ABse erkannt wurde. Der Sequenziervorgang benötigt ca. 10 Stunden.

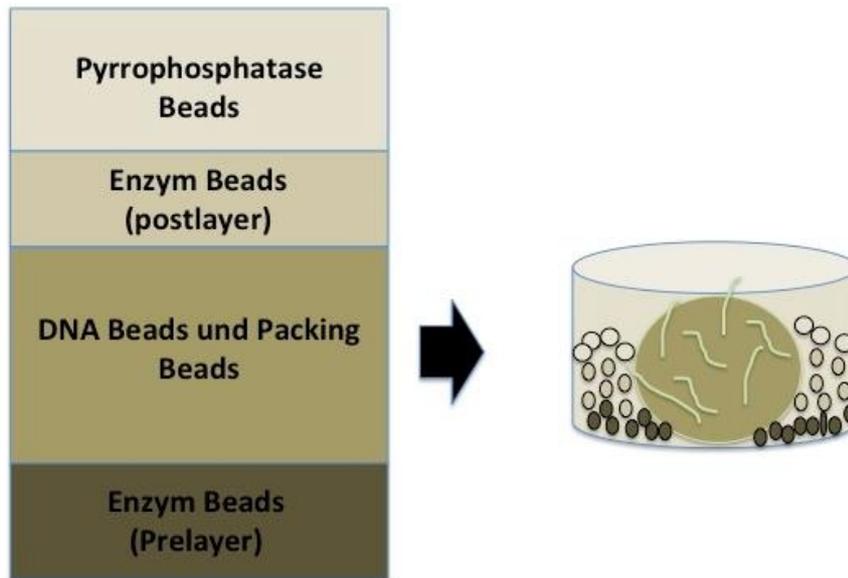


Abbildung 11 Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Bead-Schichten und der DNA-Beads in ihren einzelnen Kammern. Enzyme Beads Prelayer=1. Bead Schicht, DNA Beads und Packing Beads=2. Bead Schicht, Enzyme Beads postlayer= 3. Bead Schicht, Pyrrophosphatase Bead=4. Bead Schicht.

Auswertung

Die Sequenzierungsauswertung erfolgte über 2 verschiedene Programme. Bei dem Auswertungsmodul „SeqHLA“ werden die vorliegenden Nukleotidsequenzen mit der lokal gespeicherten IMGT/HLA-Datenbank verglichen. Nach Auffindung der passenden Sequenz werden Typisierungsergebnisse vorgeschlagen. Ein Beispiel für dieses Programm ist in Abbildung 12 zu sehen. Jedem Farbsignal wird dabei die zugehörige Base zugeordnet. Durch das Verwenden von generischen Primern, bei denen alle Allele eines Genorts amplifiziert werden, kann es bei Unterscheidung einer Base an der gleichen Position zu heterozygoten Signalen kommen. Mit einem eigenen Buchstabencode wird dies hier demonstriert. So wird zum Beispiel ein Signal für Adenosin und Guanin an der gleichen Position mit einem „R“ kodiert. Die Software berechnet abhängig von den heterozygoten Stellen mehrere Allelkombinationen. Dabei werden nicht nur die tatsächlichen Basenabfolgen berücksichtigt, sondern auch die Möglichkeit von falsch zugeordneten Basen. Deshalb müssen die vorgeschlagenen Allelkombination auch manuell auf Plausibilität überprüft werden und gegebenenfalls Nukleotidsequenzen editiert werden.

Eine zweite, unabhängige Auswertung erfolgt über das EVP-Programm. Hier kommt es zum Vergleich der Nukleotidsequenzen mit der HLA-Datenbank „perfect match“. Gleichzeitig werden die über „perfect match“ berechneten Allele mit dem Ergebnis der SeqPilot-Software verglichen. Dadurch wird eine doppelte Kontrolle der Ergebnisse gewährleistet. Es werden hierbei nur Ergebnisse angezeigt, die mindestens einen perfektes Match der Sequenzen zu einer Allelkombination aufweisen. In diesem Program wurden nur die Exon-2-Sequenzen analysiert. Der Vorteil gegenüber dem SeqPilot-Programm liegt hier an der doppelten Kontrolle sowie dem Wegfall der manuellen Editierung. Außerdem ist der Auswertungsvorgang hier um einiges schneller.

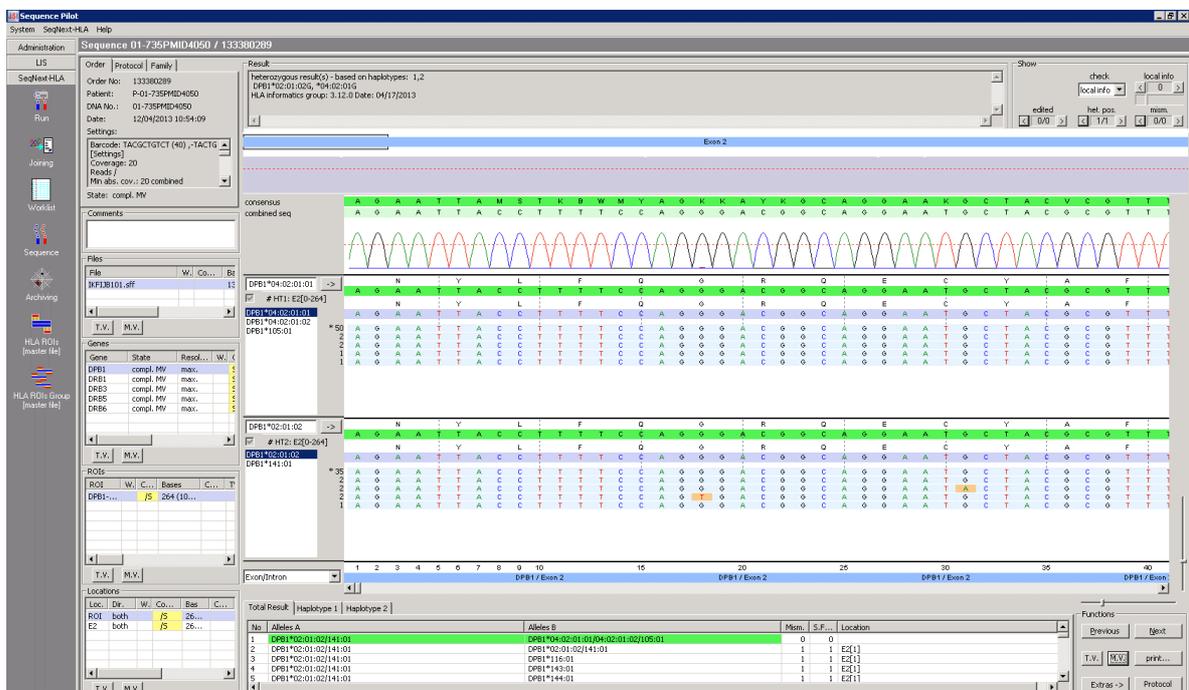


Abbildung 12 Ausschnitt des Sequenzier-Auswertungsprogramm „SeqHLA“

2.2.2.2. Illumina

Der 2. Teil der Proben wurde mittels einer Illumina/MySeq-basierten Plattform sequenziert. Bei der Validierung dieses Verfahrens fiel auf, dass der Illumina/Myseq-Ansatz im Vergleich zum Roche 454 nicht nur qualitativ vorteilhafter war, sondern auch schneller, kostengünstiger und einen höheren Durchsatz ermöglichte. Zum

besseren Verständnis werden die im folgenden Schritte der Sequenzierung auch in Abbildung 13 dargestellt.

Der Ablauf besteht aus 4 Schritten:

1. **„Library“ Präparation**, bei der die zu sequenzierenden Bereiche der vorliegenden DNA-Proben vorbereitet, vervielfacht und aufgereinigt werden. Hierbei entsteht die sogenannte „Template-DNA“
2. **„Cluster Generation“**, in der die „Library“ auf einen Glasobjekträger („flow cell“) geladen wird. Auf diesem befinden sich Oligomere mit bestimmten Andockpunkten für die Adaptersequenz der MID-Primer. So können in einem parallelen Vorgang die einzelnen Stränge zu mehreren klonalen „Klustern“ amplifiziert werden („Bridge Amplification“).
3. **Die Sequenzierung**. Die Sequenzierung erfolgt nach der „Illumina-Sequenzierung-by-synthesis“-Methode. Diese umfasst einen zyklischen Prozess, bei dem fluoreszenzmarkierte Nukleotide mit den vier verschiedenen Basen zur Template-DNA hinzugefügt werden. Diese fluoreszierenden Nukleotide tragen Terminatorsequenzen. Nachdem sich das fluoreszierende Nukleotid an den komplementären Strang angesetzt hat, kommt er zu einem Lichtsignal, welches die Basenposition weiter gibt. Die Terminatorsequenz wird anschließend entfernt, sodass sich die nächste fluoreszierende Terminatorkleotid anbinden kann und ebenfalls seine Lokalisation und Base angibt. Auf diese Art und Weise wird die komplette Template-DNA synthetisiert und die genaue Basenabfolge detektiert. Eine weitere Besonderheit ist, dass dieser Prozess vom 3'- sowie auch vom 5'-Ende ablaufen kann. Dies gewährleistet eine schnellere und genauere Sequenzierung (Paired-End-Sequenzierung).
4. **Die Auswertung** erfolgt auf die gleiche Art und Weise wie bei dem Roche 454-Verfahren.

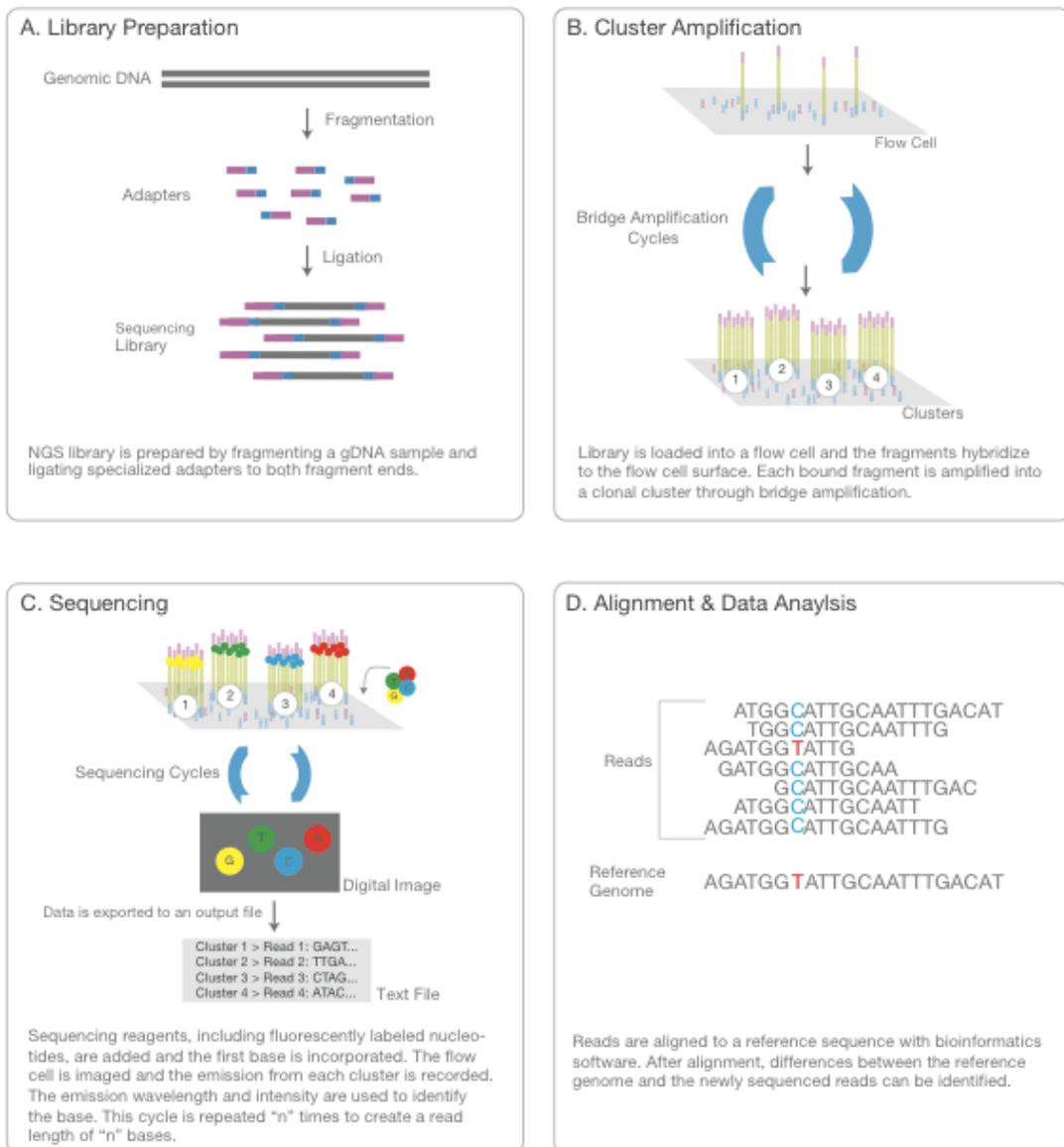


Abbildung 13 Vereinfachte Darstellung der einzelnen Schritte des Illumina MySeq Ablaufes. Für eine deutsche Beschreibung der verschiedenen Schritte siehe Abschnitt 2.2.2.2. Mit freundlicher Genehmigung von „Images and Multimedia“ der Illumina Webseite.

Genauere Durchführung:

DNA-Anordnung

Wie oben unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben, wurde auch hier zuerst eine DNA-Anordnung festgelegt. Da mit dem Illumina MySeq doppelt so viele Proben gleichzeitig sequenziert werden können, wurden hier 4 Platten angesetzt, sodass 192 verschiedene Proben jeweils auf das HLA-DP und -DR-Gen sequenziert wurden.

Vorbereiten der Library

Hierfür wurden 2 konsekutive PCR-Reaktionen benötigt. Bei der 1. PCR wurden die gewünschten Genabschnitte durch Exon-spezifische, Adapter-gebundene Primer amplifiziert (PCR1). Anders als beim Roche 454-Verfahren, wurde im Illumina/MySeq-Verfahren, die MID-Primer erst in einer 2. PCR an die Adapter der Primer gebunden.

PCR 1:

Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 10 gezeigt. Es wurde in angegebener Reihenfolge manuell pipettiert. Im Anschluss daran wurde die Amplifizierung im Thermocycler durchgeführt. Es wurde hierbei das Programm „NGS-Roche-PCR“ verwendet. Die Details des Programms sind in Tabelle 8 des Abschnitts 2.2.2.1 aufgezeigt. Auch hier erfolgt eine Erfolgskontrolle der PCR über Kapillarelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.2.1).

Tabelle 11 Reagenzien und Volumina für den PCR-Ansatz der ersten PCR.

Reagenzien	Volumen pro Well
ABC Mastermix	18 µl/Well
Taq-Polymerase	0.3 µl/Well
MID-Primer	2 µl/Well
DNA	2 µl/Well

Aufreinigung der 1.PCR mit dem Forschungs Ampure Programm am Post Hamilton.

Im Vergleich zur 1.PCR des Roche 454-Ablaufs, wurden hier noch keine MID-Primer an die jeweiligen Sequenzen angehängt. Dementsprechend können die Wells mit den verschiedenen Amplifikaten in diesem Schritt noch nicht gepoolt werden. Deshalb müssen die Amplifikate in ihren 96-well Platten aufgereinigt werden. Da die Pipettierroboter auf die Bearbeitung solcher Platten programmiert wurden, konnte die Aufreinigung in diesem Fall vollautomatisiert durchgeführt werden.

PCR 2:

Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 10 angegeben und entspricht dem der 1. PCR. Der Unterschied liegt darin, dass in dieser PCR die MID-Primer, anstatt den Genort-spezifischen Primern, hinzugefügt wurden. Diese wurden aus vorpipettierten Primer-Platten entnommen.

Die 2. PCR erfolgte dann ebenfalls im Thermocycler. Hierbei wurde das Programm „ampli 1“ verwendet. Das dazugehörige Temperaturprofil ist in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 12 Thermocycler-Programm des HLA-Klasse I PCR-Profiles für die 2.PCR.

Schritt	Temperatur in C°	Dauer in Sekunden	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	96	120	1
Prä-PCR			
Denaturierung 1	79	1	
Denaturierung 2	94	8	
Primer-Anealing 1	62,5	1	10
Primer-Anealing 2	66,5	1	
Primer-Anealing 3	65,0	50	
PCR	97	1	
Denaturierung	95	8	
Primer-Anealing 1	59	1	
Primer-Anealing 1	62,5	1	
Primer-Anealing 1	61	45	30
Enlongation 1	75	1	
Enlongation 2	72	20	
Kühlung	8	∞	

Zweite Aufreinigung nach Roche-Protokoll

Nach der Amplifizierung werden die Proben wie im Roche-Durchlauf (siehe Abschnitt 2.2.2.1) gepoolt und aufgereingt. Die genauen Schritte werden in Tabelle 9 beschrieben.

Quantifizierung

Auch die Quantifizierung verlief gleichermaßen wie bei dem Roche-Durchlauf (siehe Abschnitt 2.2.2.1.). Hierbei wird eine Konzentration von 0,4 ng/µl zur Einstellung der Ampliconpools verwendet.

Cluster Generation

Zuerst wurde die „Cardridge“ aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht.

Währenddessen wurden die aufgereinigten, quantifizierten und auf die richtige Konzentration eingestellten und gepoolten Proben für die Sequenzierung vorbereitet. Die benötigten Reagenzien hierfür befanden sich im mitgelieferten Cardridge. Wie in Tabelle 12 beschrieben, wurde eine Probenlösung und eine Kontrollprobenlösung aus den Reagenzien der Cardridge hergestellt. Hierbei wurde die Proben denaturiert, verdünnt und mit einer definierten Menge einer Phagen-DNA „PhiX“ zur besseren Qualität des Laufs versetzt. In Tabelle 12 werden die einzelnen Schritte beschrieben. Anschließend wurde die Cardridge mit dem zu sequenzierendem Gemisch beladen und in den MiSeq-Sequenzierer geladen. Die Sequenzierung benötigte ca. 48 h.

Tabelle 13 Vorbereitung der Sequenzierreagenzien.

Probe	Kontroll DNA PhiX
5 µl Probe mit 5 µl 0.2N NaOH mischen	3 µl Tris-HCL Puffer mit 2 µl PhiX vermengen
5 min Inkubation bei Raumtemperatur	Diese 5 µl PhiX-Mix mit 5 µl 0.2N NaOH mischen
Zugabe von 990 µl HT1-Puffer. Kurz sanft vortexen. Probe DNA 1 benennen.	5 min Inkubieren
In einem neuen Eppendorf Röhrchen 480 µl denaturierte DNA mit 720 µl. Invertieren. Probe DNA2 benennen.	Zugabe von 990 µl HT1-Puffer. Kurz und sanft vortexen. Probe X1 benennen.
	In einem neuen Eppendorf-Röhrchen 375 µl denaturierte PhiX mit 225 µl HT1 vermengen. Invertieren. Probe X2 benennen.
500 µl Probe mit 500 µl PhiX vermengen. Ein paar Mal invertieren zum Mischen.	

2.3. Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistikprogramm R und dessen Zusatzpakete, welche im Punkt 2.1.2 aufgelistet sind.

Univariate Überlebensanalysen wurden mithilfe der Kaplan-Meier-Methode analysiert und beinhalteten die Endpunkte Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben [53, 88].

Univariate kompetitive Risikoanalysen erfolgten mittels der kumulativen Inzidenzanalyse [36] und berechneten Inzidenzen für das Rezidiv der Grunderkrankung, chronischen GvHD-, akuten GvHD-Inzidenzen sowie für die behandlungsassoziierte Mortalität und nicht-Rezidiv bedingte Mortalität.

Die verwendeten Modelle beinhalteten folgende Kovariablen: Patientenalter, Krankheitsstadium nach EBMT, Behandlung des Transplantats (T-Zell depletiert oder T-Zell repletiert), Jahr der Transplantation, Art der Konditionierung (myeloablativ oder reduzierte Intensität), Stammzellquelle (periphere Blutstammzellen oder Knochenmark), Patienten-Spender Geschlechtmatch (Spender weiblich/Patient männlich oder andere), Zeitintervall zwischen Diagnose und Transplantation, CMV-Status des Patienten und Spenders, Gesamtanzahl der HLA-Mismatche für HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1. Anzahl der HLA-DPB1 Mismatche, Einstufung der HLA-DPB1 Kompatibilität in permissive und nicht permissive Gruppen für jeweils die beiden TCE3- und TCE4-Modelle.

2.3.1. Die Definition klinischer Endpunkte

Die Definition der klinischen Endpunkte wurden aus den „Statistical Guidelines der EBMT“ [46] übernommen:

Gesamtüberleben (OS)

Das Gesamtüberleben beschreibt das Überleben eines Patientenkollektivs an einem bestimmten Zeitpunkt nach Diagnosestellung unabhängig vom Krankheitsstadium. In dieser Studie wurden die Überlebenszeitintervalle auf ein, drei und fünf Jahre festgelegt. Patienten, die verstarben oder bei der letzten Kontrolluntersuchung nicht

erschienen, wurden zensiert. Meist wird hierfür die Kaplan-Meier-Methode zur Analyse verwendet.

Rezidivinzidenz (RI=engl.: Relapse incidence)

Die Rezidivinzidenz beschreibt den Zeitpunkt, nach Beendigung einer kurativen Therapie, bei dem die Grunderkrankung wieder zurückkehrt. Patienten, die schon vorher aus anderen Gründen verstarben und nicht mehr verfolgt werden konnten, wurden zensiert.

Rezidivfreies Überleben (PFS= engl.: Progression free survival)

Das rezidivfreie Überleben beschreibt den Zeitraum eines Patientenkollektivs beginnend von Beendigung einer kurativen Therapie bis zum Auftreten eines Rezidivs. Patienten, die aufgrund einer anderen Erkrankung starben oder nicht weiter verfolgt werden konnten wurden zensiert.

Transplantationsassoziierte Mortalität (TRM= engl.: Transplant related mortality)

Die Transplantationsassoziierte Mortalität beschreibt den Zeitraum nach Beendigung einer kurativen Therapie bis zum Tod des Patienten aufgrund von Behandlungskomplikationen. Patienten, die einen Rezidiv erlitten bzw. nicht mehr verfolgt werden konnten, wurden zensiert.

Akute Graft versus Host Disease-Inzidenz (aGvHD= engl.: acute Graft versus Host Disease)

Beschreibt das Auftreten einer akuten GvHD, definiert nach den Richtlinien der EBMT [17].

Chronische Graft versus Host Reaktion (cGvHD= engl.: chronic Graft versus Host Disease)

Beschreibt das Auftreten einer chronischen GvHD, definiert nach den Richtlinien der EBMT [17].

2.4. Klinische Daten

2.4.1. Datenherkunft

Nach Genehmigungserteilung der Datenzugriffskommission vom Deutschen Register für hämatopoetische Stammzelltransplantation (DRST), konnten die klinischen Daten aus der EBMT ProMISe-Datenbank [23] bzw. aus den dort hinterlegten MED-A-Bögen [17] entnommen werden.

2.4.2. Kooperierende Zentren

Siehe Tabelle 4 des Abschnitts 2.1.1.3..

2.4.3. Einteilung der Diagnosen

Tabelle 14 Übersicht der Einteilung der Diagnosen in myeloischer und lymphatischer Unterteilung

Diagnoseneinteilung	Subgruppe mit jeweiligen Anzahl
myeloisch	MDS= Myelodysplastisches Syndrom (n=345,18,4%)
	AML= akute myeloische Leukämie (n=576, 31,5%)
	CML=chronisch myeloische Leukämie (n=86, 4,7%)
lymphatisch	Lymphome (n=203, 11,1%)
	ALL=akute lymphatische Leukämie (n=260, 14,2%)
	CLL= chonisch lymphatische Leukämie (n=100, 5,5%)
	MM=Multiples Myelom(n=154, 8,4%)

2.4.4. Definition klinischer Prädiktoren

Krankheitsstadium:

Die unter Punkt 2.4.3 aufgezeigten Erkrankungen können, je nachdem wie weit sie fortgeschritten sind, in 3 Stadien eingeteilt werden: „früh“, „intermediär“ und „fortgeschritten“. Die Einteilung der Stadien für die verschiedenen Erkrankungen folgten den EBMT-Kriterien [47] und sind nachfolgend aufgeführt:

- 1) „frühes Krankheitsstadium“ (Stadium 0)

- a. MDS, unbehandelt oder in erster kompletten Remission
 - b. AL, in erster kompletten remission
 - c. CML, in erster chronischen Phase
 - d. NHL und MM, unbehandelt oder in erster kompletter Remission
- 2) „intermediäres Krankheitsstadium“ (Stadium 1)
- a. MDS, in zweiter kompletter Remission oder
 - b. AL, in zweiter kompletter Remission in partieller Remission
 - c. CML, in allen Phasen außer der chronischen Phase und der Blastenkrise
 - d. NHL und MM, in zweiter kompletter Remission, in partieller Remission oder stabiler Phase
- 3) „fortgeschrittenes Krankheitsstadium“ (Stadium 2)
- a. MDS, in allen übrigen Stadien
 - b. AL, in allen anderen Stadien
 - c. CML, in der Blasten Krise
 - d. NHL und MM, in allen anderen Stadien

„EBMT-Risiko-Score“

Der „EBMT Risiko Score“ ist ein Punktwert, der unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung, die Risikoeinschätzung bezüglich der Überlebenschance eines jeden Patienten angibt. Die Punkte werden, wie in Tabelle 15 dargestellt, durch Patientenalter, Krankheitsstadium, Zeitraum von Diagnose bis zur Transplantation, Spendertyp, Geschlecht der Patienten und Spender vergeben. Nach Addition der jeweiligen Punktzahlen kann für jeden Patienten ein Wert zwischen 0 und 7 berechnet werden. Je höher der Wert, desto geringer ist die Überlebenschance. Ein Punktwert von 0 konnte in dieser Kohorte jedoch nicht erreicht werden, da keiner der Patienten eine autologe Transplantation erhielt. Es wurden lediglich Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit einbezogen. Im Abschnitt 3.1 des Ergebnisteiles wird der EBMT-Risikowert des Patientenkollektivs dieser Arbeit, sowie die damit verbundene Validierung der Studie beschrieben.

Tabelle 15 Risikopunkteverteilung zur Bestimmung des EBMT-Risiko-Scores [35]

Risikofaktor	Punkte
Alter der Patienten	
<20	0
20-40	1
>40	2
Krankheitsstadium	
Früh	0
Intermediät	1
fortgeschritten	2
Vergangene Zeit bis zur Transplantation in Monaten	
<12	0
>12	1
Spendertyp	
Identische/er Bruder oder Schwester	0
Fremdspender	1
Spender-Empfänger Kombination	
Alle anderen Kombinationen	0
Spender weiblich, Empfänger männlich	1

Konditionierung

Neben dem vom „EBMT Risk Score“ definierten Einflussfaktoren ist die Konditionierungsbehandlung auch ein wichtiger Einflussfaktor.

Die Konditionierungsbehandlung wurde in dieser Studie in 2 Klassen eingeteilt: myeloablative Konditionierung, und Konditionierung mit reduzierter Intensität. Im Folgenden werden die beiden häufigsten Konditionierung nach A. Bacigalupo definiert[2]:

1. Myeloablative Konditionierung (MAC)

Die myeloablative Konditionierung (MAC=engl.: Myoablative conditioning) beschreibt eine Kombination von verschiedenen alkylisierenden Substanzen, wie zum Beispiel Cyclophosphamid (CY) und Busulfan (BU) und oder einer Ganzkörperbestrahlung (TBI=totalbody irradiation), die innerhalb 1-3 Wochen nach Initiierung der Konditionierung eine Panzytopenie beim Patienten verursacht. Diese Panzytopenie ist langanhaltend, irreversibel und fatal, falls sie nicht von einer autologen Wiederherstellung bzw. einer allogenen

Stammzelltransplantation gefolgt wird. Eine autologe bzw selbständige Erholung der Zellenreihen ist so gut wie unmöglich und kommt nur in seltenen Fällen vor. Mögliche Kombinationen nach Standardkriterien der EBMT sind BU von mindestens 14 mg/kg in Kombination von CY mit mindestens 120 mg/m² oder einer TBI von mindestens 10 Gy mit CY. Eine hohe Intensität der myeloablativen Konditionierung ist verbunden mit einer hohen Toxizität und Mortalität (TRM) sowie einer erhöhten Rate von GVHD, jedoch auch einem verminderten Risiko eines Rezdivs der Erkrankung [34]. Das Risiko der TRM hat sich jedoch in den letzten Jahren aufgrund der immer besser werdenden HLA-Kompatibilitätstechnologien verringert. Vor allem Patienten in einem frühen Krankheitsstadium profitieren von diesem Trend.

2. Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC)

Das RIC ist ein Regimen, welches nicht unter eine Myeloablativ Konditionierung fällt und deshalb separat aufgeführt wird. Es verursacht eine Zytopenie und ist ebenfalls abhängig von einer Stammzelltransplantation. Es hat jedoch eine um 30% reduzierte Intensität des MAC Regimens.

3. Ergebnisse

3.1. Validität der Studie

Die Validität der Studienkohorte, konnte anhand des EBMT-Risiko-Scores überprüft werden. Hierfür wurde für jedes Transplantationspaar des Patientenkollektivs der zugehörige EBMT Riskscore, nach den in Tabelle 15 gelisteten Einflussfaktoren, berechnet. Es konnte hierbei in dieser Kohorte für jede Transplantation ein Punktwert von 1-7 erreicht werden. Der Mindest-Punktwert lag deshalb bei 1, da es sich in dieser Kohorte ausnahmslos um allogene Transplantationen von unverwandten Spendern handelte. Eine allogene nicht verwandte Transplantation gilt an sich gegenüber der verwandten Transplantation als risikoreicher und erhält somit einen EBMT Risikopunkt. Zur besseren Darstellung der Kurven wurden aufgrund geringer Fallzahlen die Patienten mit 1 und 2 Punkten und die Patienten mit 6 und 7 Punkten zusammengefasst. Ein Punktwert von 1-2 steht für eine gute und 6-7 für eine schlechte Prognose.

Da alle Einflussfaktoren zur Berechnung des EBMT-Risiko-Scores einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben haben, muss für eine valide Kohorte der berechnete EBMT Risiko-Score jedes Patienten ebenfalls mit dem Gesamtüberleben korrelieren. Ist dies der Fall, kann die Kohorte als valide eingestuft werden.

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, korreliert das Gesamtüberleben der Patienten dieser Kohorte sehr gut mit dem EBMT-Risiko-Score.

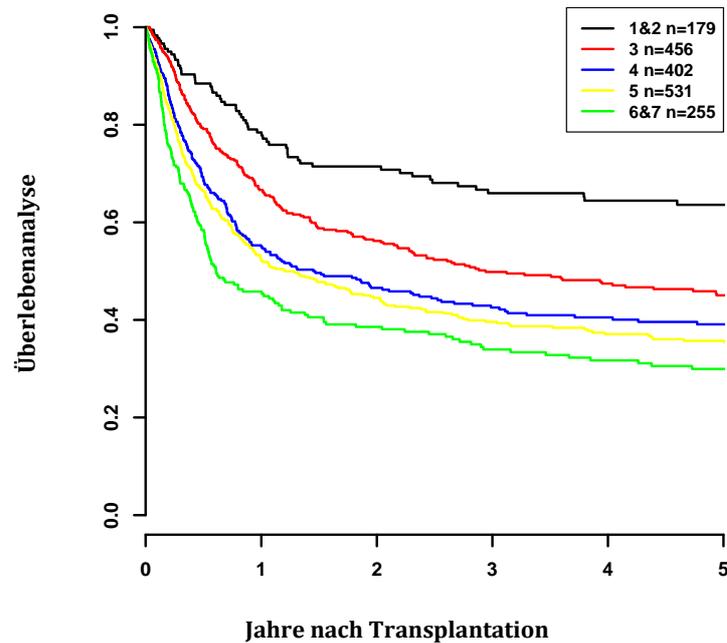


Abbildung 14 Überlebensanalyse der für diese Studie verwendeten Kohorte abhängig vom EMBT-Risiko-Score.

3.2. Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität auf den Erfolg der allogenen Stammzelltransplantation

3.2.1. Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität auf die allogene Stammzelltransplantation ohne Berücksichtigung weiterer Einflussparameter

Die Gesamtkohorte enthält 1831 Transplantationspaare. Davon waren 1585 (87,1%) HLA-DP inkompatibel (gemismatcht) und 236 (12,9%) HLA-DP kompatibel (gematcht). Siehe Tabelle 15.

Tabelle 16 Tabellarische Darstellung der Absoluten und Relativen Fallzahlen der HLA-DP kompatiblen und inkompatiblen HSCT's . Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009.

HLA-DP	Absolute Fallzahl	Relative Fallzahl in %
inkompatibel	1585	87,1
kompatibel	236	12,9

Abhängig vom HLA-DP-Kompatibilitätsstatus wurden die Patienten, auf die Endpunkte Gesamtüberleben (=OS), Rezidivinzidenz (=RI), Inzidenz der akuten Transplantat gegen Wirt Erkrankung (=aGvHD) und chronischen Transplantat gegen Wirt Erkrankung (=cGvHD), transplantationsassoziierte Mortalität (Transplant related mortality=TRM), rezidivfreie Mortalität (Non relapse mortality=NRM) und krankheitsfreies Überleben (Disease free survival=DFS) mittels univariaten Überlebensanalysen sowie univariaten competing risk Analysen untersucht. Die Ergebnisse werden jeweils in Schaubildern und Tabellen dargestellt.

Betrachtet man nun die Abbildungen 15 A)-G) und Tabelle 17 fällt auf, dass in der Gesamtkohorte, für keinen der genannten Endpunkte, ein signifikanter Unterschied zwischen HLA-DP kompatiblen (DPM) und inkompatiblen (DPMM) Transplantationen gezeigt werden kann. Lediglich bei Betrachtung der Rezidivinzidenzen zeigte sich ein Trend für eine geringere Rezidivinzidenz bei DPMM im Vergleich zu DPM.

Tabelle 17 Inzidenzen und relativen Zahlen der verschiedenen Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. DPM=HLA-DP match, DPMM = HLA-DP mismatch, OS=Overall survival, RI=Rezidivinzidenz, cGvHD=chronische Graft versus Host Disease, aGvHD=akute Graft versus Host Disease, TRM=Transplant related mortality, NRM=non relapse mortality, DFS=disease free survival.

	1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
	DPM	DPMM	DPM	DPMM	DPM	DPMM	
OS	58,7%	58,1%	43,4%	44,9%	36,9%	41,2%	0,83
RI	30,8%	28,7%	39,6%	36,0%	47,0%	39,7%	0,14
cGvHD	38,2%	34,6%	45,8%	41,5%	45,8%	42,9%	0,4
TRM	19,8%	24,3%	24,8%	28,8%	27,2%	29,8%	0,31
NRM	23,8%	28,9%	32,5%	35,5%	37,3%	37,3%	0,56
DFS	47,8%	48,9%	33,6%	37,4%	24,4%	32,1%	0,29
	30 Tagen		60 Tagen		100 Tagen		
aGvHD	5,1%	5,7%	7,6%	8,7%	10,8%	10,8%	0,9

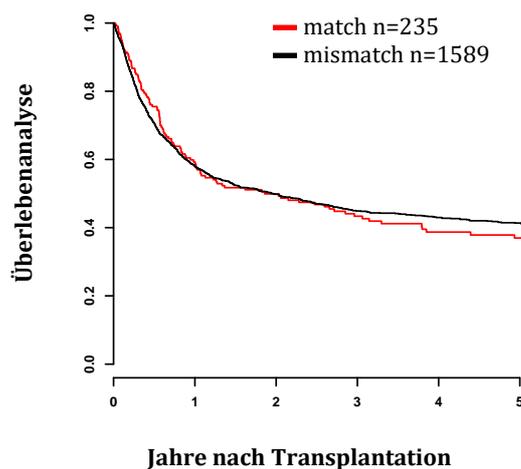


Abbildung 15 A) Gesamtüberleben

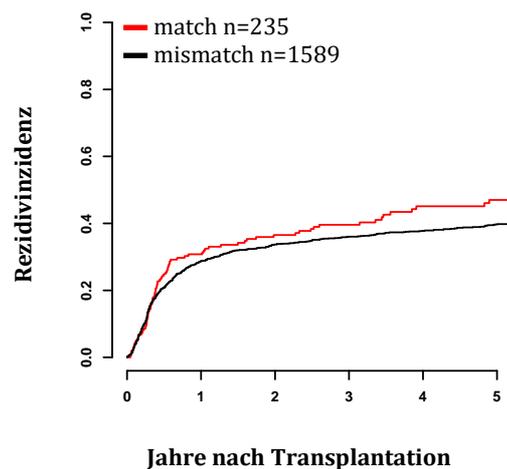


Abbildung 15 B) Rezidivinzidenz

Abbildung 15 A)-B) Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation ohne Berücksichtigung weiterer Einflussparameter. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die nicht HLA-DP kompatibel waren (mismatch). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP kompatibel waren (match). n= Anzahl.

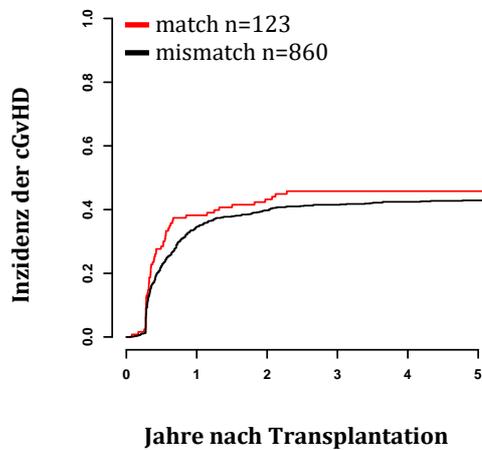


Abbildung 15 C) chronische GvHD

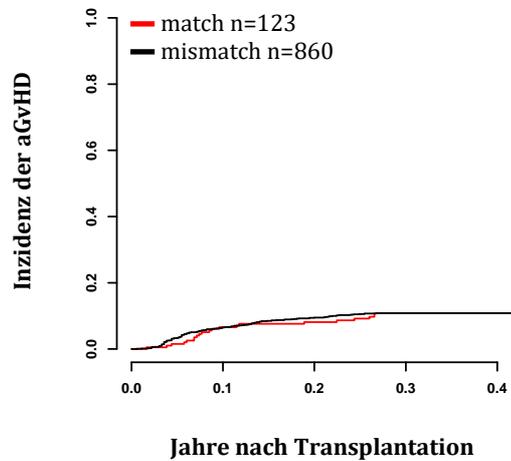


Abbildung 15 D) akute GvHD

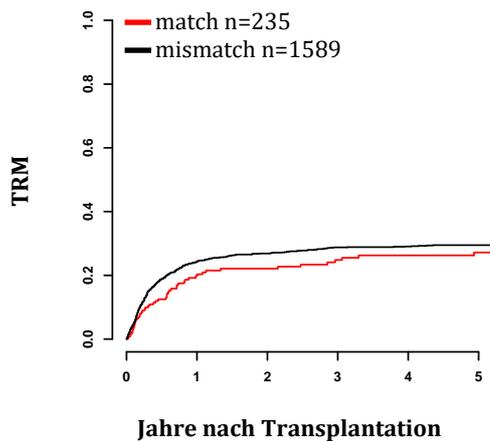


Abbildung 15 E) TRM

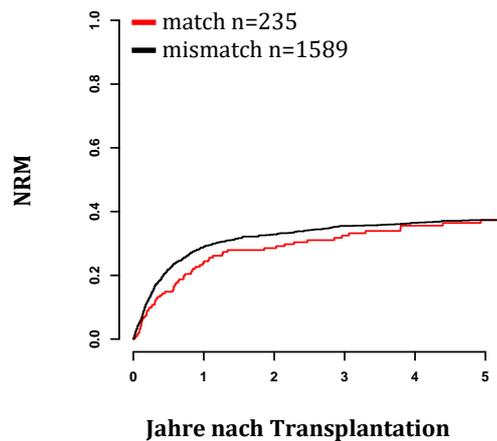


Abbildung 15 F) NRM

Abbildung 15 A)-F) Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation ohne Berücksichtigung weiterer Einflussparameter. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die nicht HLA-DP kompatibel waren (mismatch). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP kompatibel waren (match). GvHD=Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: Graft versus Host disease). TRM=Transplantationsassoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.: Non-relapse mortality), n= Anzahl.

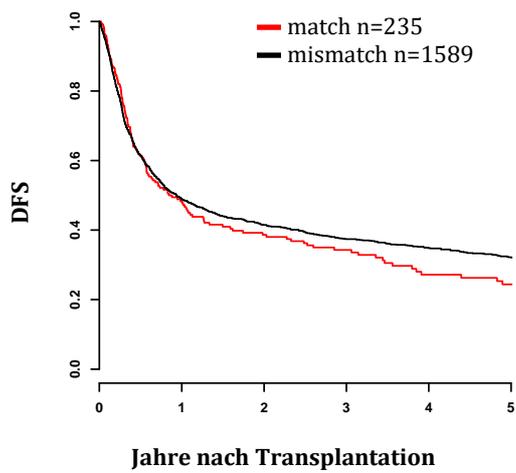


Abbildung 15 G) DFS

Abbildungen 15 E)-G) Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation ohne Berücksichtigung weiterer Einflussparameter. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die nicht HLA-DP kompatibel waren (mismatch). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP kompatibel waren (match). DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival). n=Anzahl.

3.2.2. Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA-Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren

Da bekannt ist, dass einzelne Inkompatibilitäten für die Genorte HLA-A bis HLA-DQB1 teilweise einen starken Einfluss auf den Erfolg der Transplantation ausüben und um Interferenzen der anderen Genorte zu vermeiden, wurden in der nachfolgenden Analyse nur solche Fälle berücksichtigt, die für alle anderen Genorte kompatibel waren (10/10) und somit konnte der Effekt des HLA-DP-Kompatibilitätsstatus isoliert analysiert werden. Insgesamt handelte sich bei den 10/10 Fällen um 1070 Patienten. Von diesen waren 920 HLA-DP inkompatibel und 150 kompatibel. Die Analyse dieser Fälle ergab eine klare, jedoch nicht statistisch signifikante Tendenz für ein erhöhtes Gesamtüberleben der DPMM- gegenüber der DPM-Fälle und eine signifikant verminderte Rezidivinzidenz bei DPMM- gegenüber den DPM-Transplantationen. In den ersten 3 Jahren nach Beobachtungsbeginn konnte ebenfalls eine klare, jedoch ebenfalls nicht signifikante Tendenz für eine erhöhte TRM und NRM beobachtet werden. Auch eine Tendenz für eine erhöhte akute GvHD-Inzidenz bei den DPMM- gegenüber den DPM-Fällen war ersichtlich. Passend zu den oben genannten Ergebnissen war, dass das krankheitsfreie Überleben bei DPMM-Transplantationen signifikant höher als bei DPM-Transplantationen war. Siehe hierfür Tabelle 18 und Abbildungen 16 A) bis G).

Tabelle 18 Inzidenzen und relative Anzahlen der verschiedenen Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation, bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. DPM=HLA-DP match, DPMM = HLA-DP mismatch, OS=Overall survival, RI=Rezidivinzidenz, cGvHD=chronische Graft versus Host Disease, aGvHD=akute Graft versus Host Disease, TRM=Transplant related mortality, NRM=non relapse mortality, DFS=disease free survival.

	1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
	DPM	DPMM	DPM	DPMM	DPM	DPMM	
OS	63,0%	63,7%	42,8%	50,2%	36,3%	45,8%	0,14
RI	32,7%	27,4%	42,4%	36,6%	53,6%	40,8%	0,055
cGvHD	32,0%	30,1%	40,4%	38,8%	40,4%	39,3%	0,81
TRM	15,3%	20,4%	20,3%	25,0%	24,2%	26,0%	0,64
NRM	18,4%	24,8%	28,3%	31,1%	33,5%	33,3%	0,87
DFS	48,9%	53,8%	32,2%	40,4%	21,0%	34,4%	0,039
	30 Tage		60 Tage		100 Tage		
aGvHD	0,8%	4,2%	3,9%	7,1%	6,4%	8,5%	0,39

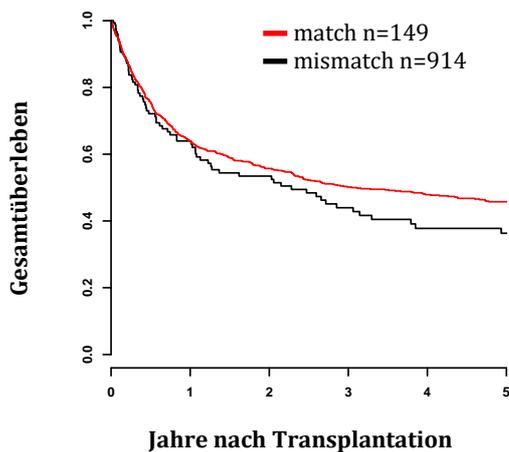


Abbildung 16 A) Gesamtüberleben

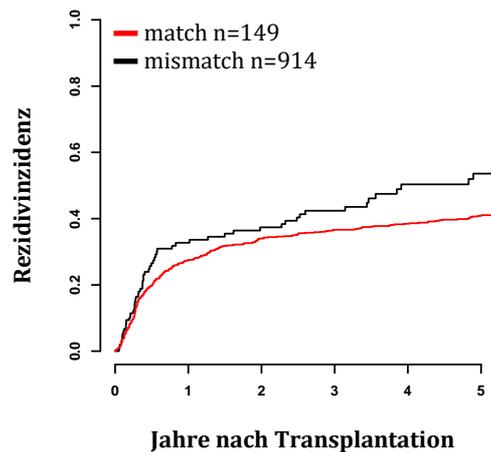


Abbildung 16 B) Rezidivinzidenz

Abbildung 16 A)-B) Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die nicht HLA DP kompatibel waren (mismatch). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP kompatibel waren (match). n= Anzahl.

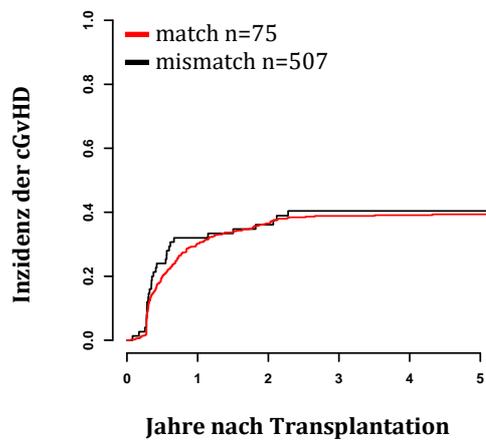


Abbildung 16 C) chronische GvHD

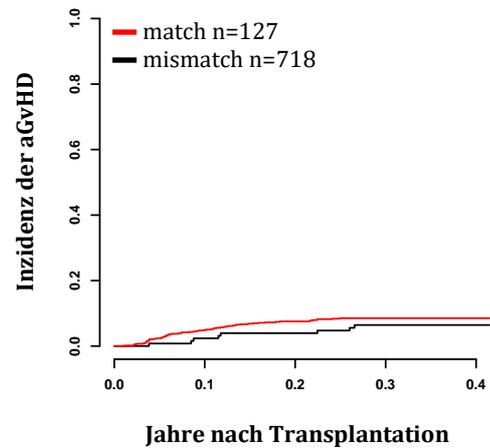


Abbildung 16 D) akute GvHD

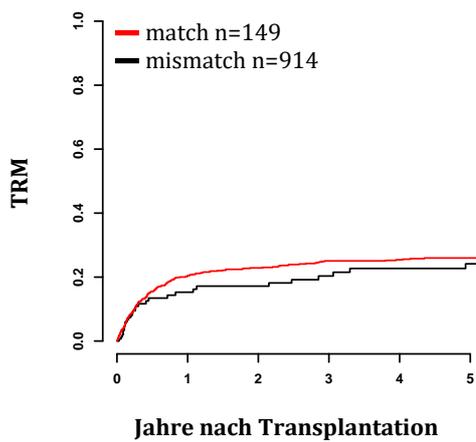


Abbildung 16 E) TRM

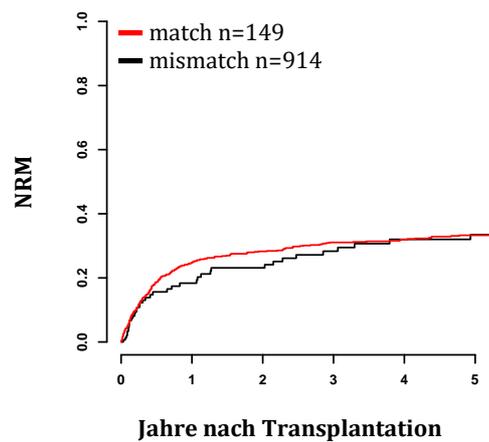


Abbildung 16 F) NRM

Abbildung 16 C)-F) Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die nicht HLA DP kompatibel waren (mismatch). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP kompatibel waren (match). GvHD=Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.: Non-relapse mortality). n=Anzahl.

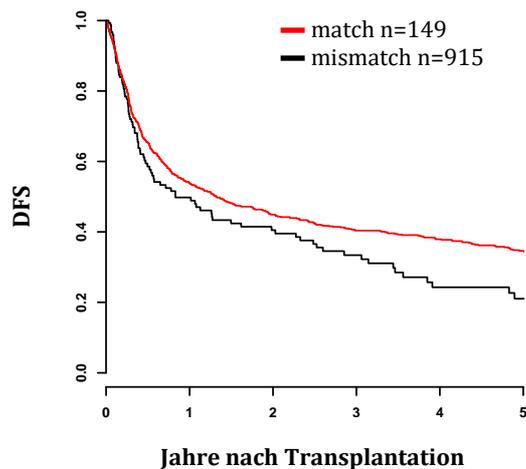


Abbildung 16 G) DFS

Abbildung 16 G): Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die nicht HLA DP kompatibel waren (mismatch). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP kompatibel waren (match). DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival). n=Anzahl.

3.3. HLA-DP Permissivitätseinteilung nach T-Zell Epitop-Modellen und ihr Einfluss auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation

Wie im Abschnitt 1.7 beschrieben, kann die HLA-DP-Kompatibilität nach T-Zell Epitopen-Modellen in Permissiv, Non-permissiv in Richtung GvH (non-permissiv GvH) und Non-permissiv in Richtung HvG (non-permissiv HvG) eingeteilt werden. Nach dem gleichen Algorithmus, wie auch bei der Analyse der HLA-DP-Kompatibilität in Abschnitt 3.2 vorgegangen wurde, wurde nun auch hier der Einfluss des Permissivitätsgrades auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT untersucht.

3.3.1. HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem „TCE4“-Modell

3.3.1.1. Einfluss der HLA-DP Permissivität, eingeteilt nach dem „TCE4“-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation ohne Berücksichtigung weiterer Einflussparameter

Zuerst wurde allgemein der Einfluss der Permissivitätseinteilung nach dem „TCE4“-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT untersucht. Eine Verteilung der Gesamtkohorte in die verschiedenen Permissivitätseinstufungen kann in Tabelle 19 gesehen werden. Es konnten bei einigen Endpunkten sowohl Vorteile als auch Nachteile der jeweiligen Permissivitätsstufen beobachtet werden. Beim Gesamtüberleben und beim krankheitsfreien Überleben zeigte sich in absteigender Reihenfolge das längste Gesamtüberleben/krankheitsfreie Überleben bei Non-permissiven GvH gefolgt von den Permissiven. Das kürzeste Gesamtüberleben/krankheitsfreie Überleben zeigte sich den bei Non-permissiven HvG. Die Rezidivinzidenz schien bei den Permissiven und den Non-permissiven HvG-Fälle ähnlich hoch zu sein. Die Non-permissiven GvH's zeigten hier eine geringere Rezidivinzidenz. Bei der Analyse der Inzidenzen von chronischen und akuten GvHD's konnte kaum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Permissivitätseinstufungen beobachtet werden. Die transplantationsassoziierte Mortalität und die rezidivfreie Mortalität verhielten sich ähnlich, in sofern, als dass in absteigender Reihenfolge die non-permissiven HvG's die höchste Transplantat assoziierte Mortalität und rezidivfreie Mortalität aufwiesen und gefolgt von den non-permissiven GvH's. Die geringste Transplantationsassoziierte Mortalität und rezidivfreie Mortalität konnte von den Permissiven beobachtet werden.

Tabelle 19 Tabellarische Darstellung der Verteilung der Permissivitätseinstufungen nach dem "TCE4"-Modell mit absoluter und relativer Anzahl in Prozent. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend, Non-permissiv HvG= nicht permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend.

	Absolute Anzahl	Relative Anzahl in %
Permissive	1052	57,45
Non-Permissiv GvH	381	20,81
Non-permissiv HvG	397	21,68

Tabelle 20 Inzidenzen und relativen Anzahlen der bekannten Endpunkte, abhängig aus der Analyse des Einflusses der Permissivitätseinteilung nach dem „TCE4-Modell“ auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD=akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), perm=permissiv, NpGvH=non-permissiv GvH, NpHvG=non-permissiv HvG.

	1 Jahr			3 Jahre			5 Jahre			p-Wert
	perm	NpGvH	NpHvG	perm	NpGvH	NpHvG	perm	NpGvH	NpHvG	
OS	58,7%	60,8%	53,9%	45,1%	48,6%	53,6%	40,7%	44,1%	37,3%	0,06
RI	30,6%	25,3%	28,3%	38,1%	31,0%	37,0%	41,9%	35,7%	41,5%	0,17
cGvHD	35,4%	35,1%	33,9%	40,7%	45,3%	42,7%	42,4%	45,9%	43,2%	0,18
TRM	21,9%	24,2%	27,8%	26,3%	29,1%	32,3%	27,2%	30,9%	32,3%	0,047
NRM	26,2%	29,6%	32,2%	33,0%	36,2%	39,3%	35,7%	38,9%	39,6%	0,059
DFS	49,0%	51,9%	45,2%	37,3%	40,4%	33,0%	31,7%	33,1%	28,4%	0,13
	30 Tagen			60 Tagen			100 Tagen			
aGvHD	6,0%	4,9%	5,3%	9,2%	8,6%	7,0%	10,5%	12,8%	10,0%	0,53

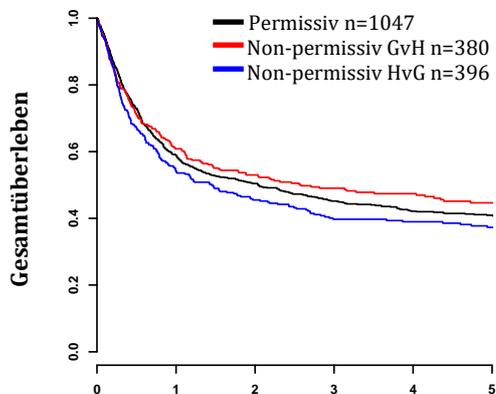


Abbildung 17 A) Gesamtüberleben

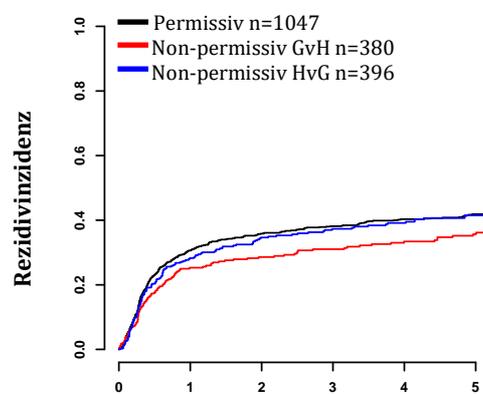


Abbildung 17 B) Rezidivinzidenz

Abbildung 17 A)-B): Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, welche HLA-DP permissiv waren. Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP Non-permissiv in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP Non-permissive in HvG Richtung waren. Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend, n= Anzahl.

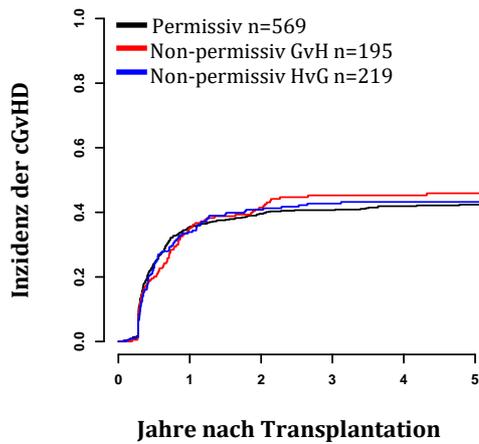


Abbildung 17 C) chronische GcHD

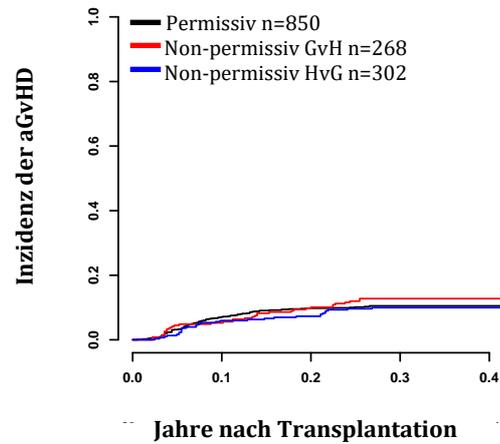


Abbildung 17 D) akute GvHD

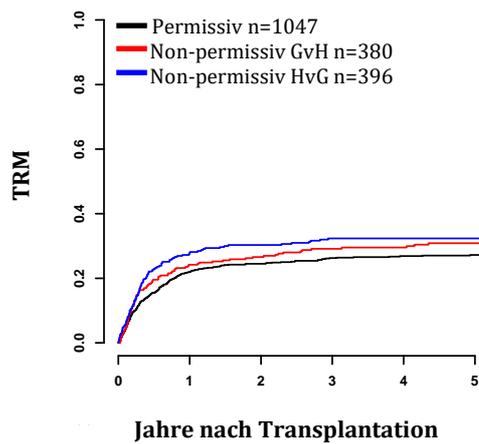


Abbildung 17 E) TRM

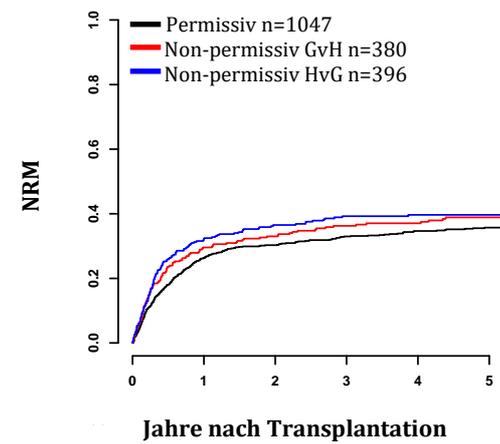


Abbildung 17 F) NRM

Abbildung 17 C)-F): Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die nicht HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP nonpermissive in HvG Richtung waren. Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. GvHD= Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), n= Anzahl.

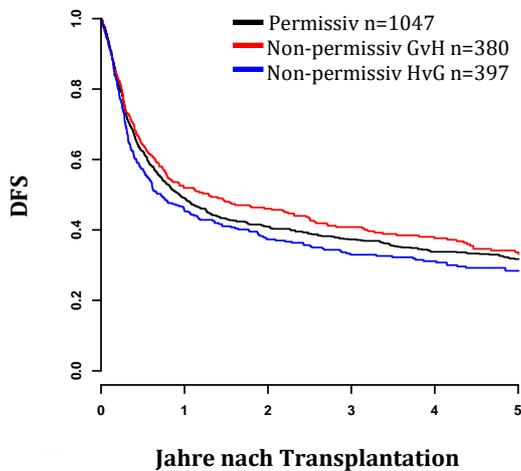


Abbildung 17 G) DFS

Abbildung 17 G): Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die nicht HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP nonpermissive in GvH-Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP nonpermissiv in HvG Richtung waren. Non-permissiv HvG = nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.3.1.2. Einfluss der HLA-DP-Permissivität eingeteilt nach dem „TCE4“-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA-Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1,-DQB1) kompatibel waren

Wurde nun die Kohorte auf nur 10/10M Patienten beschränkt, konnte das in 3.3.1.1 beschriebene Ergebnis noch ein wenig verdeutlicht werden (siehe Tabelle 21 für die Verteilung der Kohorte). Es zeigte sich nun bei den Endpunkten Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben ein statistisch signifikant größerer Überlebensvorteil der non-permissiven GvH gegenüber den anderen beiden Transplantationsgruppen.

Das Ergebnis der Rezidivinzidenz zeigte, dass non-permissiv GvH Transplantationen, weiterhin eine geringere Rezidivinzidenz als die anderen beiden Gruppen (permissiv und non-permissiv HvG) aufwiesen.

Betrachtete man die Inzidenz der chronischen und akuten GvHD konnte bei den 10/10M Patienten ein geringer Unterschied zwischen den einzelnen Permissivitätseinteilungen beobachtet werden. In beiden Fällen zeigte sich in absteigender Reihenfolge die höchste Inzidenz der sowohl akuten, als auch chronischen GvHD bei non-permissiv GvH Transplantationen, dann bei non-permissiv HvG und die geringste Inzidenz der GvHD bei den permissiven Transplantationen.

Auch bei der transplantatassoziierten Mortalität und der rezidivfreien Mortalität zeigte sich bei der 10/10M Kohorte ein größerer Abstand der non-permissiven GvH von den anderen beiden Gruppen in sofern, als dass die non-permissive GvH-Kohorte eine erhöhte Transplantatassoziierte und Rezidivfreie Mortalität aufwies.

Die Beobachtungen bezogen auf die TRM, NRM, GvHD und Rezidivinzidenz beschreiben Tendenzen und waren nicht statistisch signifikant.

Tabelle 21 Tabellarische Darstellung der Verteilung der Permissivitätseinstufungen nach dem "TCE4"-Modell mit absoluter und relativer Anzahl bei Transplantationen, die für klassische HLA-Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Non-permissiv HvG = nicht permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. 10/10M=Transplantationen, bei denen Patienten und Spender für klassische HLA Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren.

HLA-DPB- Permissivitätseinteilung nach TCE4 bei 10/10M	Absolute Anzahl	Relative Anzahl in %
Permissiv	642	60,0%
Non-permissiv GvH	212	19,8%
Non-permissiv HvG	216	20,2%

Tabelle 22 Inzidenzen und relativen Anzahlen der bekannten Endpunkteabhängig aus der Analyse des Einflusses der Permissivitätseinteilung nach dem „TCE4-Modell“ auf den Therapielerfolg der allogenen Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Perm=permissiv, NpGvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. NpHvG= nicht permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend.OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival).

	1 Jahr			3 Jahre			5 Jahre			p-Wert
	perm	NpGvH	NpHvG	perm	NpGvH	NpHvG	perm	NpGvH	NpHvG	
OS	63,3%	69,9%	59,2%	47,7%	60,0%	42,5%	43,2%	52,3%	40,0%	0,00945
RI	29,5%	24,3%	28,0%	38,9%	32,4%	37,8%	43,3%	37,1%	44,6%	0,40
cGvHD	30,5%	29,7%	30,4%	37,0%	44,3%	40,1%	37,3%	45,4%	40,1%	0,61
TRM	18,8%	18,0%	24,4%	23,5%	21,9%	29,6%	24,8%	24,4%	29,6%	0,16
NRM	23,0%	22,4%	28,3%	29,8%	27,0%	36,8%	32,8%	31,1%	36,8%	0,14
DFS	52,3%	59,9%	49,1%	37,9%	47,8%	34,8%	32,2%	29,2%	28,7%	0,03
	30 Tage			60 Tage			100 Tage			
aGvHD	3,6%	3,9%	3,7%	6,3%	8,4%	6,1%	7,2%	8,4%	6,1%	0,42

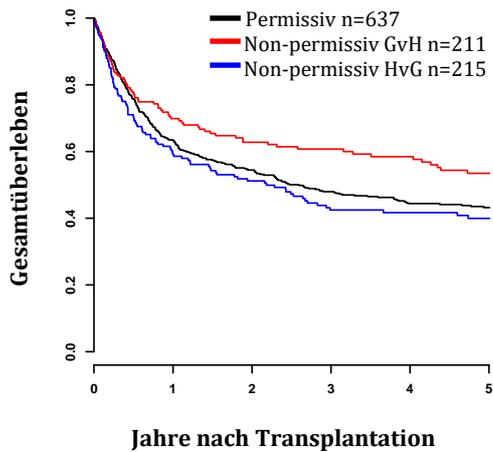


Abbildung 18 A) Gesamtüberleben

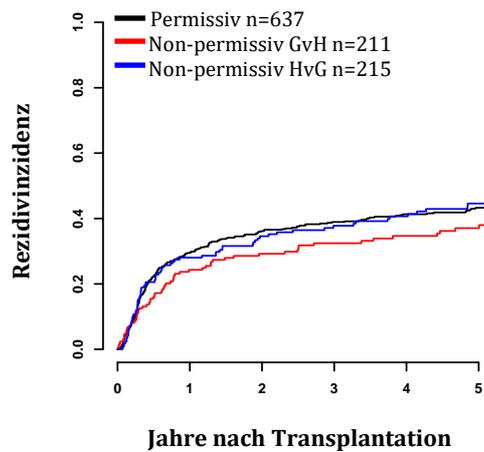


Abbildung 18 B) Rezidivinzidenz

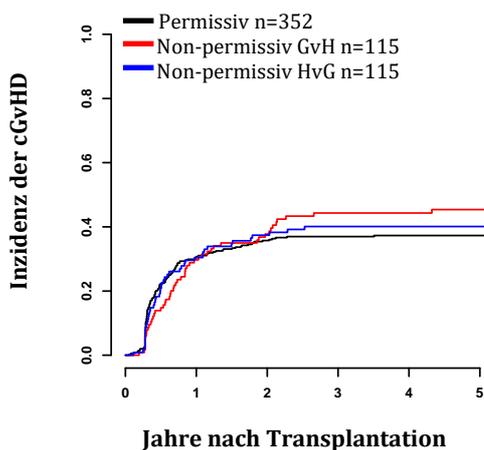


Abbildung 18 C) chronische GvHD

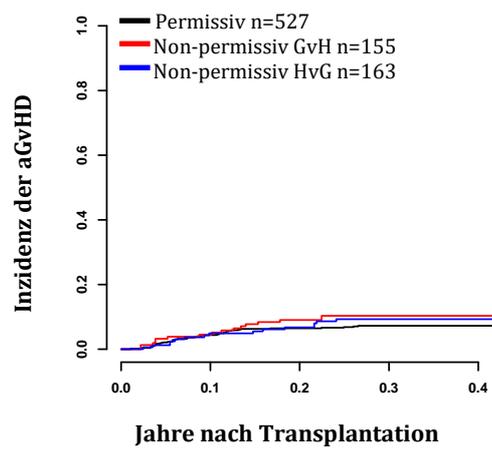


Abbildung 18 D) akute GvHD

Abbildung 18 A)-D): Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA-Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die nicht HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in HvG Richtung waren. Non-permissiv HvG = nicht permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend, GvHD = Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: Graft versus Host disease), n=Anzahl.

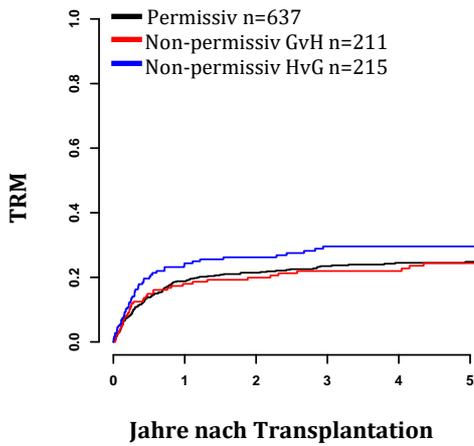


Abbildung 18 E) TRM

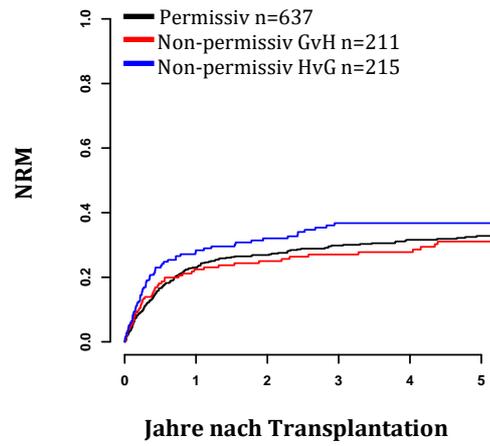


Abbildung 18 F) NRM

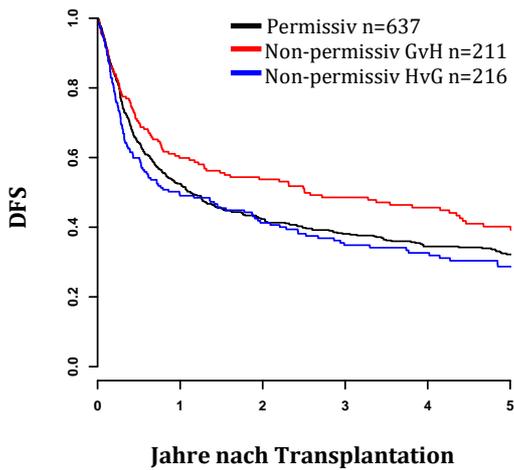


Abbildung 18 G) DFS

Abbildung 18 E)-G): Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation, bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die nicht HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP nonpermissiv in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP nonpermissive in HvG Richtung waren. Non-permissiv HvG=nicht permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. TRM=transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM=rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS=krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.3.2. HLA-DP-Permissivitätseinteilung eingeteilt nach dem „TCE3“-Modell

3.3.2.1. Einfluss der HLA-DP-Permissivität eingeteilt nach dem „TCE3“-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation ohne Berücksichtigung weiterer Einflussfaktoren

Wie im Abschnitt 1.7 beschrieben, kann die HLA-DP-Kompatibilität auch nach dem TCE3-Modell in permissiv, non-permissiv GvH und non-permissiv HvG eingeteilt werden. Nach dem gleichen Algorithmus wie auch bei der Analyse der Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell in Abschnitt 3.3.1 vorgegangen wurde, wurde nun auch hier der Einfluss des Permissivitätsgrades auf verschiedene Einflussparameter der allogenen HSCT untersucht.

Zuerst wurde allgemein der Einfluss der Permissivitätseinteilung nach dem „TCE3“-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT untersucht. Eine Verteilung der Gesamtkohorte in die verschiedene TCE3-Permissivitätseinstufungen wird in Tabelle 23 gezeigt.

Es zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Permissivitätseinteilung nach dem „TCE4“-Modell. Für die folgenden Beobachtungen konnten jeweils Trends in eine bestimmte Richtung beschrieben werden, die jedoch nicht statistisch signifikant stratifiziert werden konnten. Bei der Analyse des Gesamtüberlebens und des krankheitsfreien Überlebens zeigte sich in absteigender Reihenfolge das längste Gesamtüberleben/Krankheitsfreiem Überleben bei Non-permissiven GvH-, dann bei den permissiven- und das kürzeste Gesamtüberleben/krankheitsfreie Überleben bei den Non-permissiven HvG-Fällen.

Die Rezidivinzidenz schien bei den Permissiven- und den non-permissiven HvG – Fällen ähnlich hoch zu sein. Die non-permissiven GvH-Transplantationen zeigten hier eine geringere Rezidivinzidenz.

Bei der chronischen und akuten GvHD konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Permissivitätseinstufungen beobachtet werden. Die transplantatassoziierte Mortalität und die rezidivfreie Mortalität verhielten sich

ähnlich, in sofern, als dass in absteigender Reihenfolge die non-permissiven HvG-Fälle die höchste transplantatassoziierte und rezidivfreie Mortalität aufwiesen, gefolgt von den non-permissiven GvH-Fälle und die geringsten transplantatassoziierte und rezidivfreie Mortalität von den permissiven-Transplantationen beobachtet werden konnte.

Tabelle 23 Tabellarische Darstellung der Verteilung der Permissivitätseinstufungen nach dem "TCE3"-Modell mit absoluter und relativer Anzahl. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Non-permissiv HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend.

HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach TCE3	Absolute Anzahl	Relative Anzahl
Permissiv	1113	60,8%
Non-permissiv GvH	359	19,6%
Non-permissiv HvG	358	19,6%

Tabelle 24 Inzidenzen und relativen Anzahlen der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der Permissivitätseinteilung nach dem „TCE3“-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Werte in % angegeben. Perm=permissiv, NpGvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. NpHvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival).

	1 Jahr			3 Jahre			5 Jahre			p-Wert
	Perm	NpGvH	NpHvG	Perm	NpGvH	NpHvG	Perm	NpGvH	NpHvG	
OS	58,4	61,7	54,5	44,6	49,5	40,1	40,4	44,8	37,4	0,065
RI	30,5	23,8	29,4	38,2	29,6	37,9	41,7	34,7	42,4	0,12
cGvHD	35,7	34,9	33,1	40,8	46,1	42,3	42,4	46,8	42,8	0,87
TRM	22,5	23,4	27,7	26,8	28,3	32,4	27,7	30,3	34,4	0,078
NRM	26,9	28,8	31,7	33,5	35,7	39,1	36,1	38,6	39,5	0,12
DFS	48,5	53,4	45,3	36,8	41,6	32,9	31,5	34,1	28	0,077
	30 Tage			60 Tage			100 Tage			
aGvHD	5,9	5,6	4,7	9,0	9,3	6,5	10,6	13,0	9,5	0,42

3.3.2.2. Einfluss der HLA-DP-Permissivität, eingeteilt nach dem „TCE3“-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA-Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren.

Wurde nun als Kohorte die HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 kompatible Gruppe gewählt, konnte das in 3.3.2.1 beschriebene Ergebnis noch ein wenig verdeutlicht werden. Es zeigte sich nun bei den Endpunkten Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben ein größerer Unterschied in den Inzidenzen und somit ein größerer und statistisch signifikanter Überlebensvorteil der non-permissiven GvH-Fälle gegenüber den anderen beiden Permissivitätsgruppen (non-permissiv HvG und permissiv).

Die Analyse der chronischen und akuten GvHD zeigte bei den 10/10M-Transplantationen einen kleinen jedoch nicht signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Permissivitätseinteilungen. In beiden Fällen zeigte sich in absteigender Reihenfolge die höchste Inzidenz der GvHD bei non-permissiven GvH-Transplantationen, dann bei non-permissiven HvG und die geringste Inzidenz der GvHD bei den permissiven Fällen.

Auch bezüglich der transplantationsassoziierten Mortalität und rezidivfreien Mortalität zeigte sich bei der 10/10M-Kohorte zwar keine Signifikanz, jedoch ein größerer Abstand der non-permissiven GvH im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Die non-permissive GvH-Gruppe wies somit die höchste rezidivfreie- und transplantationsassoziierte Mortalität auf.

Tabelle 25 Tabellarische Darstellung der Verteilung der Permissivitätseinstufungen nach dem "TCE3"-Modell mit Absoluter und Relativer Anzahl bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Non-permissive HvG= nicht permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend.

	Absolute Anzahl	Relative Anzahl
Permissiv	680	63,6%
Non-Permissiv GvH	193	18%
Non-Permissiv HvG	197	18,4%

Tabelle 26 Inzidenzen und relativen Anzahlen der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der Permissivitätseinteilung nach dem „TCE3“-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Werte in % angegeben. Perm=permissiv, NpGvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. NpHvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival).

	1 Jahr			3 Jahre			5 Jahre			p-Wert
	Perm	NpGvH	NpHvG	Perm	NpGvH	NpHvG	Perm	NpGvH	NpHvG	
OS	62,9	71	59,9	47,5	62	42,5	43,1	55,2	39,8	0,007
RI	29,7	23,0	22,8	38,8	31,5	38,2	42,9	36,7	45,4	0,53
cGvHD	30,3	29,6	31,1	36,6	46,4	40,7	37,0	47,7	40,7	0,49
TRM	19,0	17,1	24,9	23,6	20,9	30,6	24,8	23,8	30,6	0,09
NRM	23,4	21,4	28,2	30,0	25,8	37,3	32,8	30,6	37,3	0,11
DFS	51,7	61,7	49,4	37,9	50,2	34,1	32,1	41,2	27,7	0,018
	30 Tage			60 Tage			100 Tage			
aGvHD	3,4	5,1	3,3	6,1	9,5	6,0	7,2	10,9	9,4	0,30

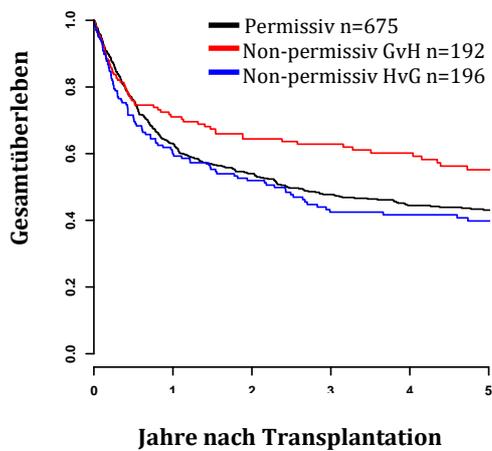


Abbildung 19 A) Gesamtüberleben

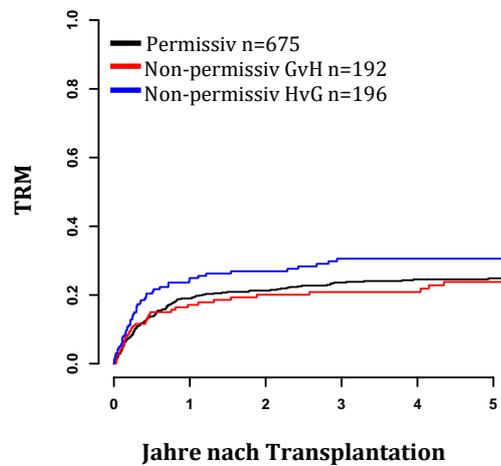


Abbildung 19 B) TRM

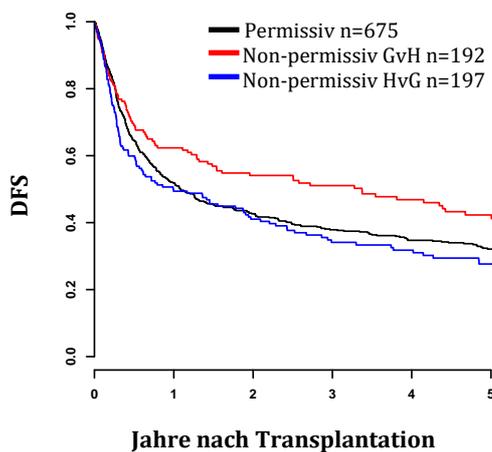


Abbildung 19 C) DFS

Abbildungen 19 A)-C): Univariate Analyse des Einflusses der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation, bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die nicht HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP nonpermissiv in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP nonpermissive in HvG Richtung waren. Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. GvHD= Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.4. Alter

3.4.1. Einfluss des HLA-DP-Kompatibilitätsstatus auf die allogene Stammzelltransplantation abhängig vom Alter bei Transplantationen die für klassische HLA-Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren

Da aus früheren Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe der Effekt der Kompatibilität für die HLA-Genorte A bis DQB1 mit steigendem Alter zunahm [29], sollte nun auch der Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der HSCT in Abhängigkeit vom Alter überprüft werden. Dafür wurden zusätzlich nur die Transplantationspaare gewählt, die für HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 kompatibel waren. Anschließend wurden sie in 3 Altersgruppen unterteilt: <35 Jahre, 35-55 Jahre und >55 Jahre (siehe Tabelle 27). Bezüglich des Gesamtüberlebens zeigte sich bei den <35-jährigen Patienten tendenziell ein längeres Überleben bei den HLA-DP-inkompatiblen Transplantationen. Auch bei Betrachtung der Rezidivinzidenz der verschiedenen Altersgruppen abhängig vom HLA-DP-Kompatibilitätsstatus zeigt sich bei den <35- und >55-jährigen eine verminderte Rezidivinzidenz bei HLA-DP-Inkompatibilität. Bei Betrachtung der Kurve der <35-jährigen bezüglich der cGvHD, ließ sich vermuten, dass DPM-Patienten eine höhere Inzidenz des Chronischen GVHD als DPMM Patienten aufwiesen. Da dieses Ergebnis sich jedoch nicht mit den vorherigen Ergebnissen der TRM und NRM deckte, könnte es vermutlich durch geringen Fallzahlen bedingt sein. Bei den über 55-jährigen konnte eine tendenziell höhere aGvHD-Inzidenz bei DPMM- im Vergleich zu DPM-Transplantationen vermerkt werden. Die Inzidenzen der TRM und NRM waren sowohl bei den <35-jährigen als auch den >55 jährigen tendenziell höhere bei DPMM-Transplantationen im Vergleich zu DPM-Transplantationen. Es handelte sich hier jedoch in keinem der beschriebenen Endpunkte um signifikante Ergebnisse.

Tabelle 27 Altersverteilung der Patienten die für für die typischen HLA`s (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP kompatibel tranplantiert wurden. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009.

Alter	Absolute Anzahl	Relative Anzahl in %
<35	208	11,36
35-55	428	23,38
>55	434	23,70

Tabelle 28 Inzidenzen und relativen Anzahlen der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität abhängig vom Alter, bei Transplantationen, die für die typischen HLA's kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Werte in % angegeben. Match= HLA-DP kompatible Transplantationen, mismatch= HLA-DP inkompatible Transplantat. OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (engl.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival).

	Alter	1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
		match	mismatch	match	mismatch	match	mismatch	
OS	<35	62,9	70,1	51,1	58,5	44,7	55,7	0,59
	35-55	62,0	64,5	47,9	51,4	35,2	47,0	0,1
	>55	59,5	59,4	32,1	44,1	32,1	39,4	0,64
RI	<35	38,2	21,5	38,2	28,4	50,2	31,3	0,078
	35-55	23,4	29,8	36,2	39,0	49,5	43,2	0,93
	>55	37,6	30,0	50,9	38,5	60,0	43,2	0,081
cGvHD	<35	30,0	24,0	35,0	30,2	35,0	30,2	0,66
	35-55	42,9	31,8	54,6	41,2	54,6	42,3	0,18
	>55	22,2	31,4	30,0	40,8	30,0	40,8	0,27
TRM	<35	9,9	18,6	13,8	24,3	20,2	26,2	0,27
	35-55	18,5	18,7	24,1	23,1	29,7	23,1	0,14
	>55	15,6	23,1	20,6	27,3	20,6	28,7	0,28
NRM	<35	9,9	19,8	17,6	27,0	24,1	29,7	0,26
	35-55	23,1	22,8	34,4	28,0	43,5	30,2	0,023
	>55	19,3	29,3	29,3	36,2	29,3	38,1	0,19
DFS	<35	45,4	60,8	37,0	50,4	29,6	45,8	0,22
	35-55	53,4	52,8	20,6	40,4	17,2	34,1	0,11
	>55	44,7	50,7	24,9	35,3	19,9	29,2	0,37
		30 Tage		60 Tage		100 Tage		
aGvHD	<35	0	6,0	3,4	9,1	3,4	9,1	0,31
	35-55	2,4	4,2	7,1	7,3	12,2	8,7	0,52
	>55	0	3,3	1,8	6,0	3,7	8,1	0,24

3.4.2. Einfluss der Interaktion des Patientenalters und der „TCE4“-Permissivität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation bei Transplantationen die für klassische HLA-Genorte kompatibel waren.

Betrachtet man diejenigen Patienten, die für die klassischen HLA-Merkmale kompatibel waren und teilt sie in 3 verschiedene Altersgruppen ein, so erhält man die Ergebnisse aus der Tabelle 29. Bei Betrachtung der Ergebnisse kommen zwei Vermutungen auf, die sich statistisch jedoch nicht stratifizieren ließen:

1. Jüngere Patienten die permissiv transplantiert wurden, erleiden öfter ein Rezidiv als solche mit non-permissiver Transplantation der gleichen Altersgruppe. Bei älteren Patienten scheint kaum ein Unterschied zwischen den Permissivitätseinstufungen im Bezug auf die Rezidivinzidenz vorzuliegen. (siehe Tabelle 29 für Rezidivinzidenzen und relativen Zahlen des DFS sowie die Abbildungen 21A)-C) und 26A)-C) für die jeweiligen Schaubilder)

2. Ältere Patienten (>55 Jahre) zeigen größere Unterschiede ihrer Permissivitätseinstufungen bezüglich der GvHD, in sofern, als dass die non-permissiven GvH-Patienten eine höhere Inzidenz an chronischer und akuter GvHD aufweisen, als Patienten mit den anderen beiden Permissivitätseinstufungen. Auch diese Vermutungen basieren auf der Interpretation der Schaubilder und konnten leider nicht statistisch verifiziert werden.

Patienten mittleren Alters zeigten hingegen eine Signifikanz der Analyse für OS, TRM und DFS. Einen größeren Überlebensvorteil erzielten hier Patienten mit non-permissivem GvH, gefolgt von den Permissiven. Den geringsten Überlebensvorteil zeigten die non-permissiven HvG-Fälle. Außerdem zeigte sich, in absteigender Richtung die höchste Inzidenz an transplantation-assoziiertes Mortalität bei non-permissiven HvG-Fällen, dann permissiven- und dann nonpermissiven GvH-Fällen. Zudem konnte ähnlich wie beim Gesamtüberleben ein größerer Vorteil bezüglich des

krankheitsfreien Überlebens bei non-permissiven GvH, dann bei Permissiven und zuletzt bei nonpermissiven HvG-Transplantationen beobachtet werden.

Tabelle 29 Inzidenzen und relativen Anzahlen der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell abhängig vom Alter, bei Transplantationen die für die typischen HLA's kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Werte in % angegeben. Perm=permissiv, NpGvH = nicht permisiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. NpHvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival).

		1 Jahr			3 Jahre			5 Jahre			p-Wert
		Perm	NpGvH	NpHvG	Perm	NpGvH	NpHvG	Perm	NpGvH	NpHvG	
OS	<35	66,2	78,4	70,8	55,7	68,9	45,1	52,7	65,0	45,1	0,36
	35-55	65,1	71	54,8	50,7	61	40,3	43,6	56,3	35	0,03
	>55	59,3	63,7	57,4	40,2	49,5	43,9	36	40,6	41,5	0,64
RI	<35	32,3	12,3	9,0	35,9	15,1	26,9	40,0	22,9	26,9	0,088
	35-55	28,4	27,3	32,4	38,6	38,3	39,1	43,9	42,1	45,3	0,94
	>55	29,0	27,9	31,5	40,9	35,9	31,3	44,7	39,6	51,5	0,57
cGvHD	<35	25,4	30,4	18,2	30,9	30,4	31,8	30,9	30,4	31,8	0,99
	35-55	33,4	30,6	34,6	40,4	39,4	42,3	41,2	51,8	42,3	0,79
	>55	30,4	28,4	31,7	37,0	45,9	41,5	37,0	45,9	41,5	0,73
TRM	<35	17,3	14,5	20,2	22,2	20,4	27,7	25,0	24,2	27,7	0,82
	35-55	18,3	10,3	26,8	22,9	13,6	32,2	24,1	13,6	32,3	0.03
	>55	19,8	27,6	23,6	24,5	31,1	27,5	25,2	35,4	27,5	0,26
NRM	<35	19,0	14,5	20,2	25,7	20,4	31,3	28,6	27,9	31,3	0,85
	35-55	21,6	17,7	30,5	27,4	21,0	38,4	32,8	21,0	38,4	0,07
	>55	26,2	31,6	29,5	34,0	36,8	37,3	34,7	43,3	37,3	0,33
DFS	<35	51	73,2	70,8	42,8	63,8	45,4	38,6	56	45,4	0,25
	35-55	54,1	60,8	42,7	39,5	48,2	30,5	31,6	42,5	24,2	0,04
	>55	50	51,6	45,1	33,2	38,8	35,1	29,4	26,8	26,9	0,56
		30 Tage			60 Tage			100 Tage			
aGvHD	<35	3,8	6,3	8,0	7,7	9,4	8,0	7,7	9,4	8,0	0,95
	35-55	4,5	1,6	4,4	7,6	4,8	8,8	8,6	7,9	11,8	0,68
	>55	2,7	5,0	1,4	4,4	11,7	2,9	5,8	13,3	7,3	0,14

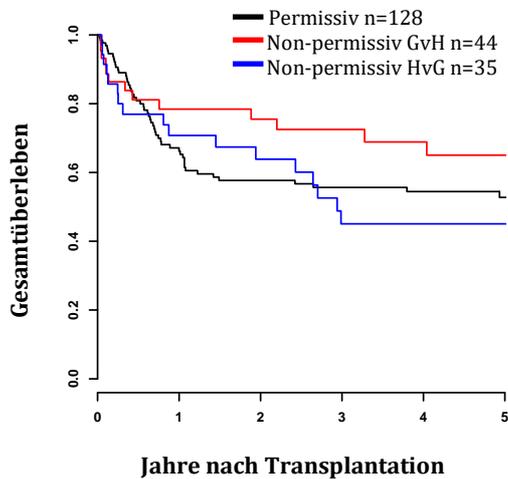


Abbildung 20 A) <35 - Jährige

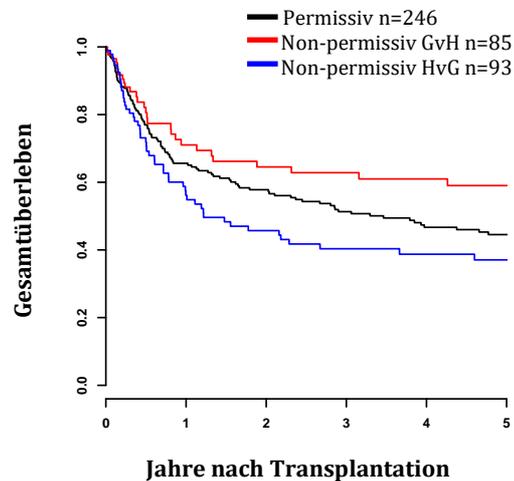


Abbildung 20 B) 35-55 - Jährige

C >55

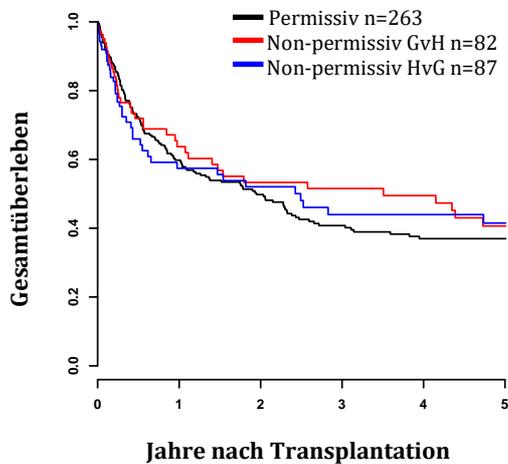


Abbildung 20 C) >55-Jährige

Abbildungen 20 A)-C): Gesamtüberlebensanalyse des Einflusses der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation, bei Transplantationen, die für klassische HLA-Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit vom Patientenalter. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH=nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in HvG Richtung waren. Non-permissiv HvG=nicht-permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend, n= Anzahl.

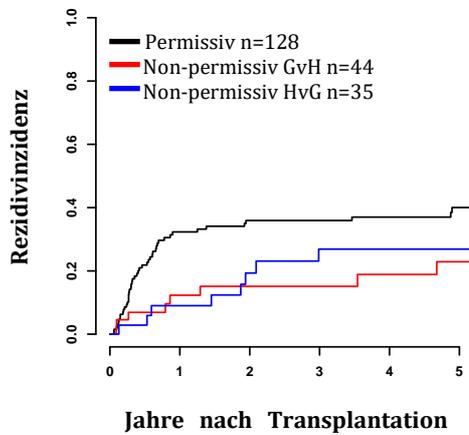


Abbildung 21 A) <35 - Jährige

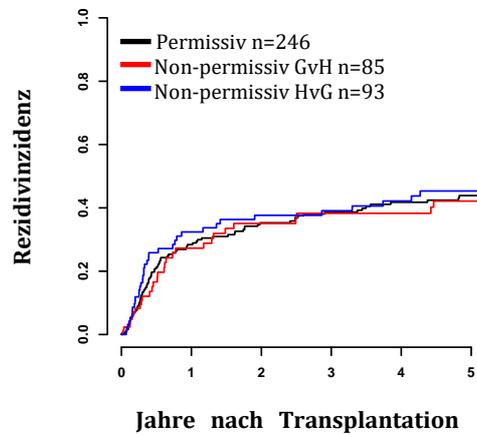


Abbildung 21 B) 35-55 - Jährige

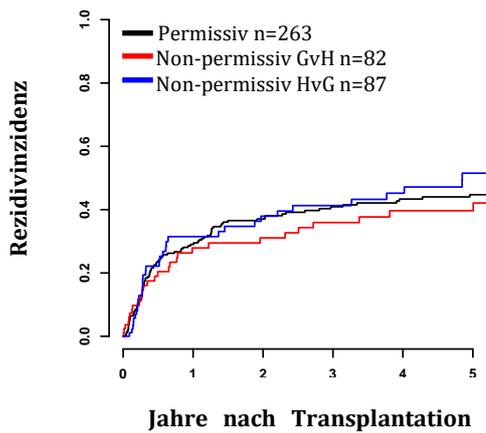


Abbildung 21 C) >55 - Jährige

Abbildungen 21 A)-C): Univariate Analyse der Rezidivinzidenz. Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf die Rezidivinzidenz bei allogenen Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit vom Patientenalter. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH=nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in HvG Richtung waren. (Non-permissiv HvG=nicht-permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend), n= Anzahl.

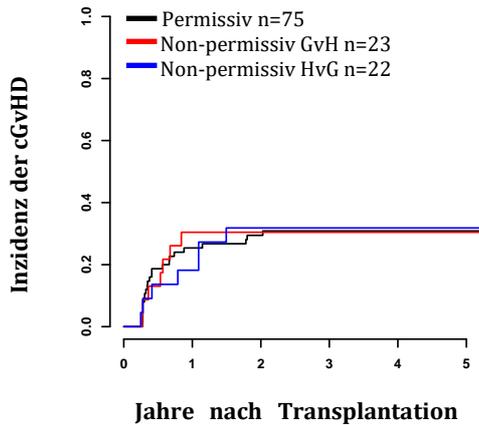


Abbildung 22 A) <35 - Jährige

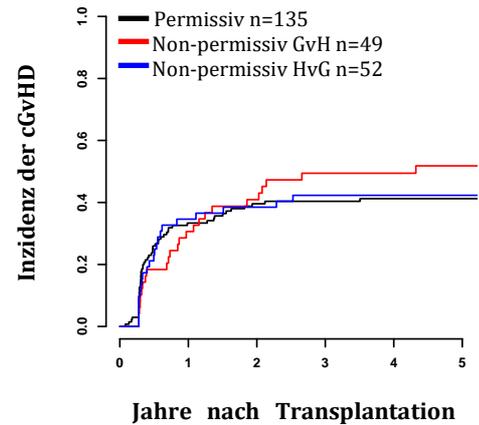


Abbildung 22 B) 35-55 - Jährige

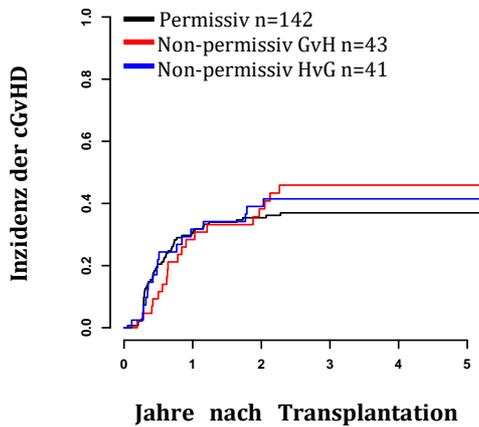


Abbildung 22 C) > 55-Jährige

Abbildungen 22 A)-C): Univariate Analyse der chronischen GVHD Inzidenz. Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf die Chronischen GvHD-Inzidenz bei allogenen Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren in Abhängigkeit vom Patientenalter. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH=nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in HvG Richtung waren. (Non-permissiv HvG=nicht-permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend), cGVHD= chornische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), n= Anzahl.

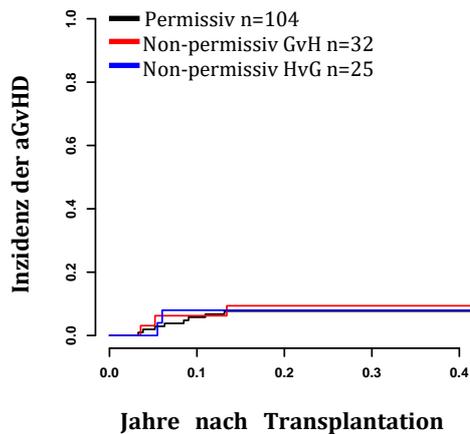


Abbildung 23 A) <35 - Jährige

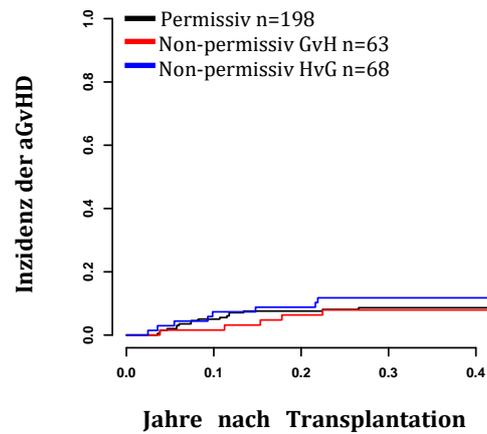


Abbildung 23 B) 35-55 - Jährige

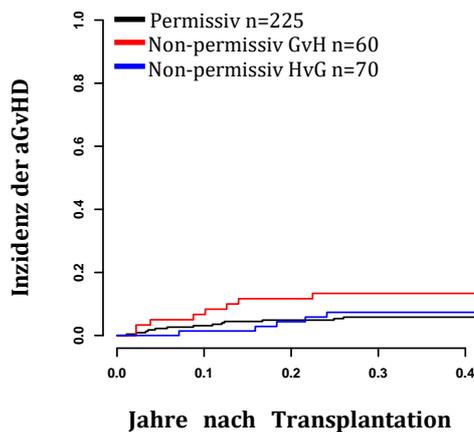


Abbildung 23 C) >55- Jährige

Abbildungen 23 A)-C): Univariate Analyse der akuten GvHD Inzidenz. Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf die akuten GvHD-Inzidenz bei allogenen Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren in Abhängigkeit vom Patientenalter. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH=nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in HvG Richtung waren. (Non-permissiv HvG=nicht-permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), n= Anzahl.

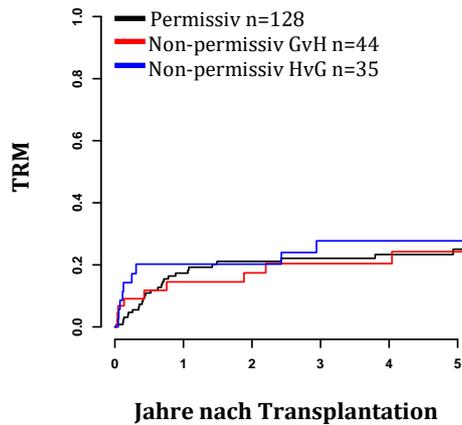


Abbildung 24 A) < 35-Jährige

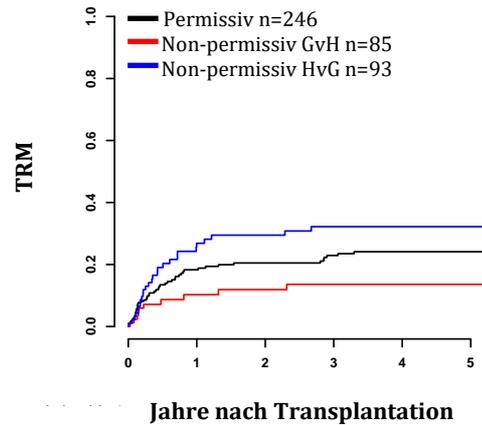


Abbildung 24 B) 35-55 - Jährige

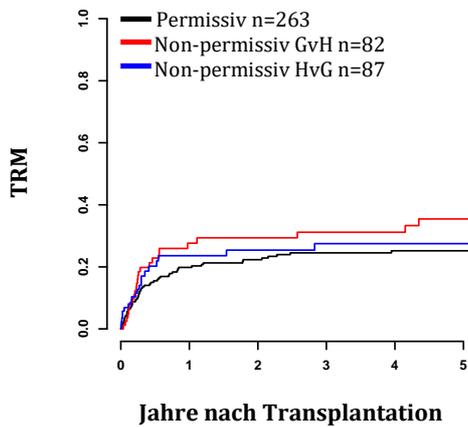


Abbildung 24 C) >55 Jährige

Abbildungen 24 A)-C): Univariate Analyse der Transplantationsassoziierten Mortalität (TRM). Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Model auf die TRM bei Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Patientenalters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH=nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in HvG Richtung waren. (Non-permissiv HvG=nicht-permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), n= Anzahl.

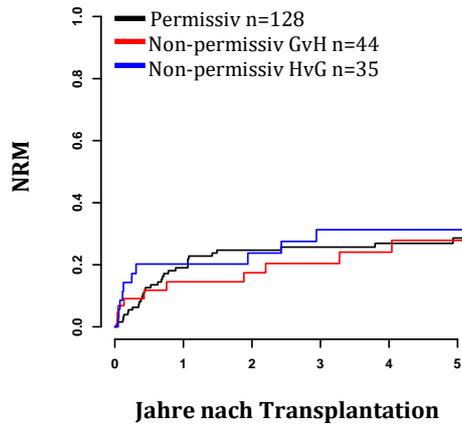


Abbildung 25 A) <35 - Jährige

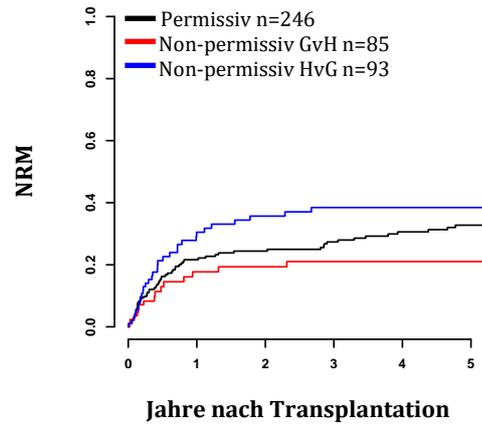


Abbildung 25 B) 35-55 - Jährige

C >55

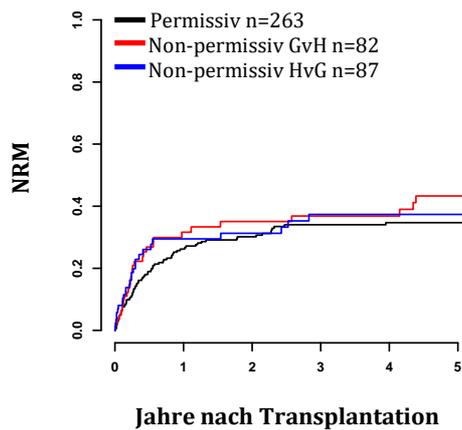


Abbildung 25 C) >55 - Jährige

Abbildungen 25 A)-C): Univariate Analyse der rezidivfreien Mortalität (NRM). Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf die NRM bei Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Patientenalters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH=nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in HvG Richtung waren. (Non-permissiv HvG=nicht-permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend), NRM=Rezidivfreie Mortalität (engl.: non-relapse mortality), n= Anzahl.

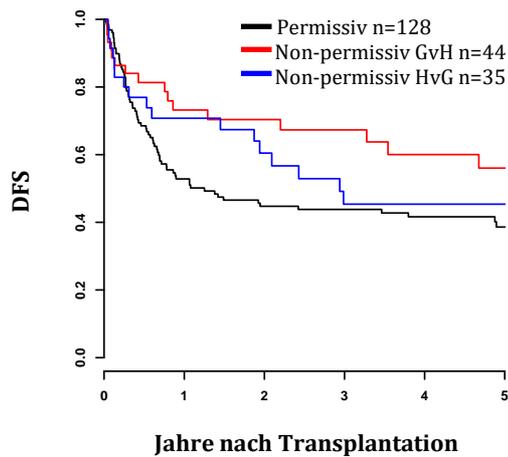


Abbildung 26 A) <35 -Jährige

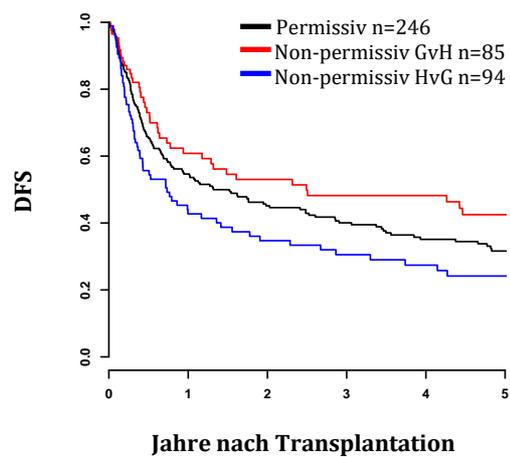


Abbildung 26 B) 35-55 - Jährige

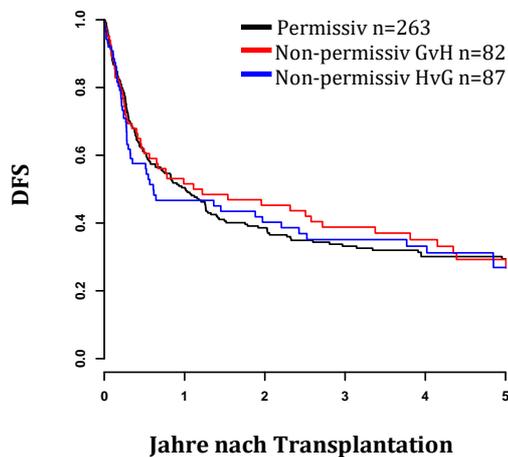


Abbildung 26 C) > 55 - Jährige

Abbildungen 26 A)-C): Überlebensanalyse des krankheitsfreien Überleben (DFS). Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf das Krankheitsfreie Überleben bei Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Alters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissiv). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH=nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissiv in HvG Richtung waren. (Non-permissiv HvG=nicht-permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.4.3. Einfluss der Interaktion des Patientenalters und der „TCE3“-Permissivität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation bei Transplantationen die für klassische HLA-Genorte kompatibel waren.

In diesem Abschnitt wurde der Teil der Kohorte der für die klassischen HLA's kompatibel war in die drei HLA-DP-Permissivitätsgruppen des TCE3-Modells eingeteilt und anschließend, in Abhängigkeit des Patientenalters, auf ihren Einfluss auf die bekannten Endpunkte analysiert. Die Abbildungen 27-33A)-C) zeigen die Ergebnisse dieser Analysen. Ähnlich wie bei der Analyse der Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell, können hier die zwei gleichen Vermutungen aufgestellt werden:

1. Junge Patienten mit HLA-DP-permissiven Transplantationen hatten eine höhere Rezidivinzidenz als Patienten des gleichen Alters mit non-permissiven Transplantationen. Bei älteren Patienten schien die Permissivitätseinteilung keinen erheblichen Einfluss bezüglich der Rezidiv Inzidenz zu haben. (siehe Tabelle 30 für Rezidivinzidenzen und relative Zahlen des DFS)
2. Bezüglich der GvHD zeigten die älteren Patienten jedoch größere Unterschiede. Die älteren Patienten aus der Gruppe der non-permissiven GvH-Transplantationen wiesen eine höhere Inzidenz an chronischer und akuter GvHD auf, als die Patienten aus den anderen Permissivitätseinstufungen. Jüngere Patienten zeigten hier diesmal keinen Unterschied innerhalb ihrer Permissivitätseinstufungen. Diese Vermutungen basieren auf der Interpretation der Schaubilder und konnten nicht statistisch verifiziert werden.

Patienten mittleren Alters zeigten hingegen einen signifikanten p-Wert bei der Analyse der OS, TRM, DFS und anders als bei der Permissivitätseinteilung nach TCE4 auch bei der NRM. Einen größeren Überlebensvorteil zeigten non-permissive GvH's, dann permissive und den geringsten Überlebensvorteil die non-permissiven HvG's. Es zeigte sich außerdem, in absteigender Reihenfolge die höchste Inzidenz an TRM und

NRM bei non-permissiven HvG, dann Permissiven und dann non-permissiven GvH. Zudem konnte, ähnlich wie bei der Analyse des Gesamtüberlebens, ein größerer Vorteil des krankheitsfreien Überlebens bei non-permissiven GvH, dann bei permissiven und zu letzt bei non-permissiven HvG Patienten beobachtet werden.

Tabelle 30 Inzidenzen und relativen Anzahlen der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell abhängig vom Patientenalter, bei Transplantationen die für die typischen HLA's kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Werte in % angegeben. Perm=permissiv, NpGvH = nicht permisiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. NpHvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival).

	TCE	1 Jahr			3 Jahre			5 Jahre			p-Wert
		Perm	NpGvH	NpHvG	Perm	NpGvH	NpHvG	Perm	NpGvH	NpHvG	
OS	<35	68,6	72,7	69,9	57,6	65,1	43,1	54,8	60,4	43,1	0,57
	35-55	64,6	72,6	54,3	50,3	64,8	38	43,5	64,8	34,3	0,004
	>55	57,6	66,4	61,5	38,8	52,4	47,6	34,9	42,1	45,1	0,46
RI	<35	31,0	13,5	9,3	34,5	16,7	27,9	38,3	26,0	27,9	0,24
	35-55	29,0	25,4	32,5	38,9	36,2	40,0	43,7	40,5	47,0	0,85
	>55	29,7	25,8	31,4	41,2	34,7	41,4	44,8	38,9	51,8	0,59
cGvHD	<35	26,0	26,3	20,0	32,3	26,3	30,0	32,3	26,3	30,0	0,91
	35-55	34,0	27,9	34,8	40,5	49,4	43,5	41,3	52,2	43,5	0,85
	>55	28,9	33,3	32,5	35,2	53,0	42,5	35,2	53,0	42,5	0,34
TRM	<35	15,7	19,3	20,8	21,2	22,6	28,7	23,9	27,3	28,7	0,67
	35-55	17,6	10,2	29,3	21,8	13,9	53,3	22,9	13,9	35,3	0,012
	>55	21,8	22,7	21,9	26,3	26,7	25,9	26,9	31,7	24,9	0,82
NRM	<35	17,3	19,3	20,8	24,6	22,6	32,4	27,3	31,6	32,3	0,64
	35-55	21,2	16,8	33,4	26,4	20,5	42,4	31,3	20,5	42,4	0,023
	>55	28,6	27,1	25,6	36,1	32,9	33,8	36,8	40,4	33,8	0,92
DFS	<35	53,1	67	69,9	44,3	62,8	43,4	40,4	53,4	43,4	0,63
	35-55	53,6	62,6	40,5	39,7	49,6	26,7	31,9	47,4	19,6	0,005
	>55	47,9	54,4	48	31,7	40	37,8	28,1	28,3	29,4	0,62
		30 Tage			60 Tage			100 Tage			
aGvHD	<35	3,7	7,1	7,7	7,5	10,7	7,7	7,5	10,7	7,7	0,85
	35-55	4,7	18,5	33,3	7,4	5,6	8,3	8,9	7,4	11,7	0,71
	>55	2,1	7,3	1,7	4,2	12,7	3,2	5,5	14,5	8,0	0,07

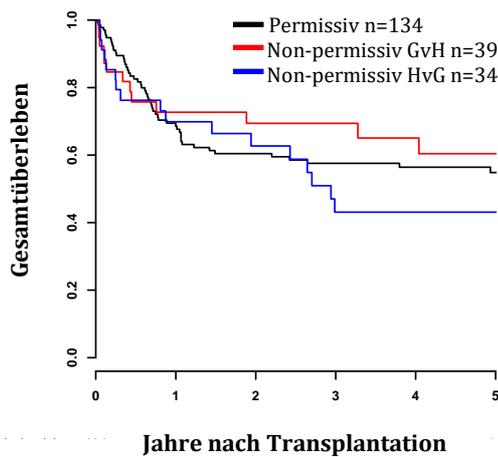


Abbildung 27 A) < 35 - Jährige

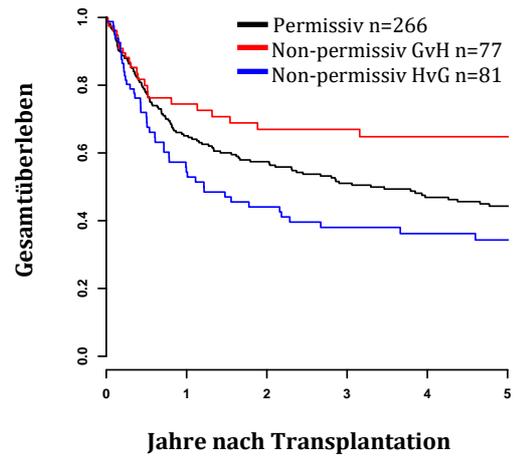


Abbildung 27 B) 35-55 Jährige

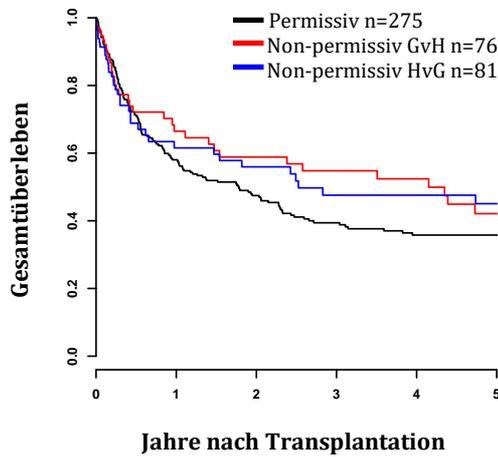


Abbildung 27 C) >55 - Jährige

Abbildungen 27 A)-C): Überlebensanalyse des Gesamtüberlebens. Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell auf das Gesamtüberleben bei Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA-Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Patientenalters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH = nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP nonpermissive in HvG Richtung waren. (Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend). N= Anzahl.

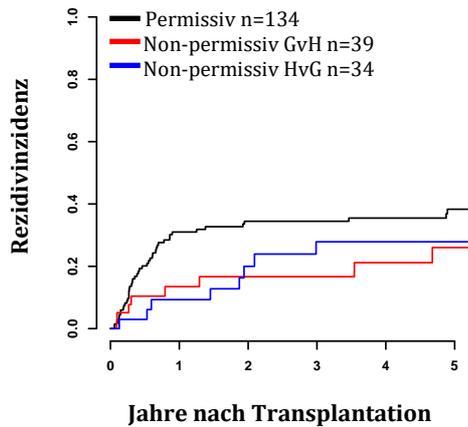


Abbildung 28 A) <35 - Jährige

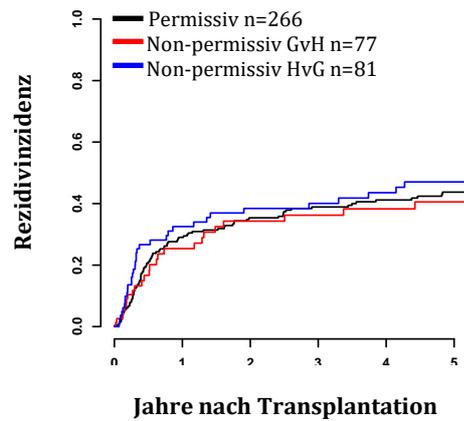


Abbildung 28 B) 35-55 - Jährige

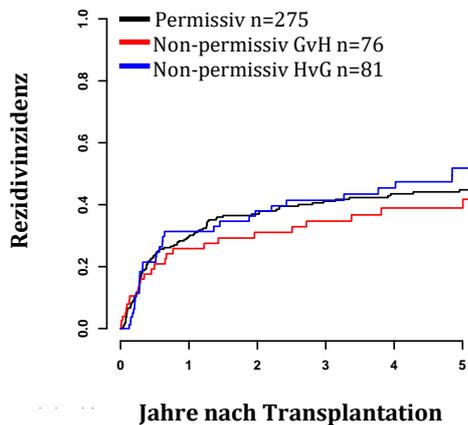


Abbildung 28 C) >55 - Jährige

Abbildungen 28 A-C): Univariate Analyse der Rezidivinzidenz. Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell auf die Rezidivinzidenz nach Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA-Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Patientenalters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH = nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in HvG Richtung waren. (Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend.) N= Anzahl.

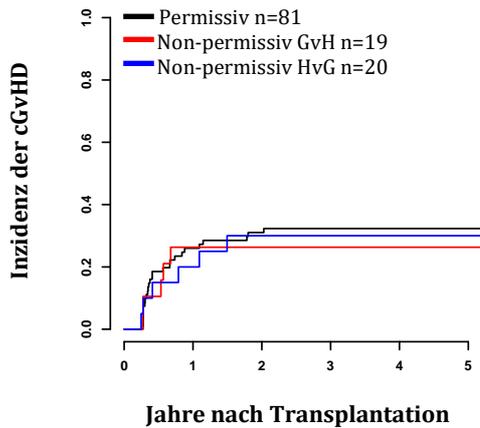


Abbildung 29 A) <35 - Jährige

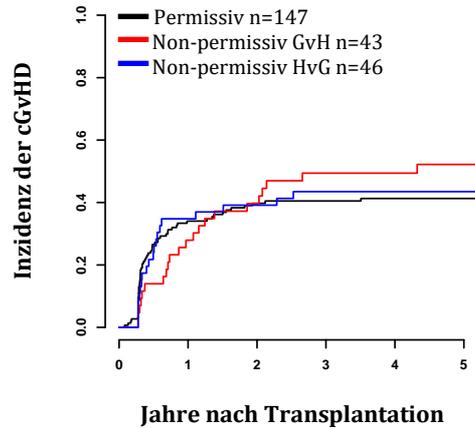


Abbildung 29 B) 35-55 - Jährige

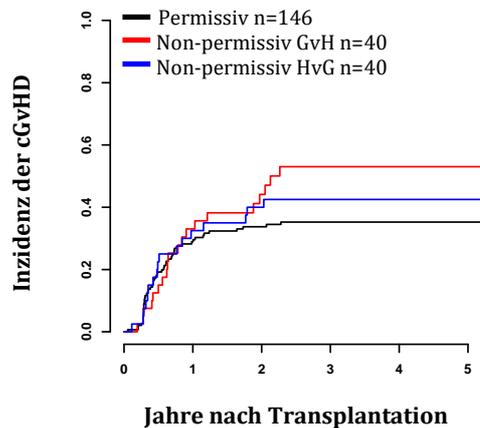


Abbildung 29 C) >55 - Jährige

Abbildungen 29 A)-C): Univariate Analyse der chronischen GvHD Inzidenz. Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell auf die Inzidenz einer chronischen GvHD nach Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Alters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in HvG Richtung waren. (Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend). cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), n= Anzahl.

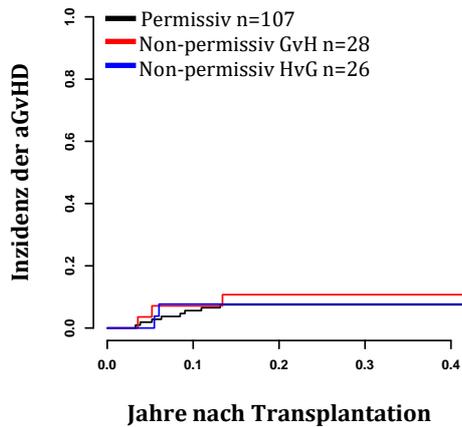


Abbildung 30 A) <35 - Jährige

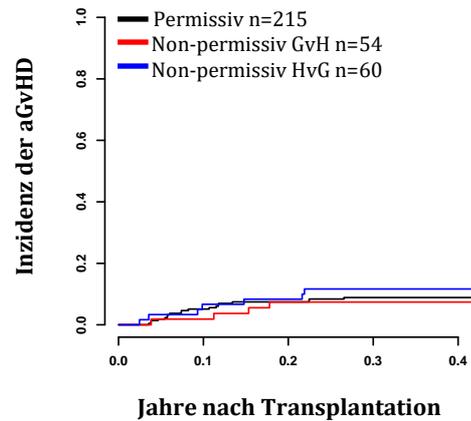


Abbildung 30 B) 35-55 - Jährige

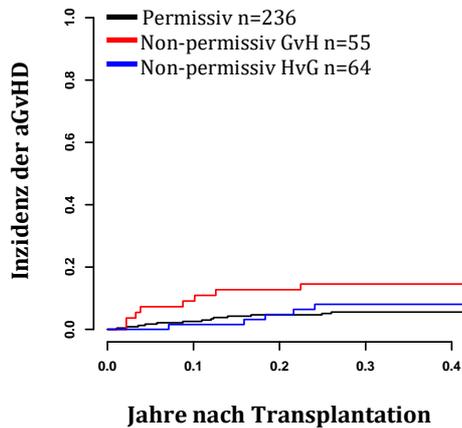


Abbildung 30 C) >55 - Jährige

Abbildungen 30 A)-C): Univariate Analyse der akuten GvHD Inzidenz. Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell auf die Inzidenz der akuten GvHD nach Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Alters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in GvH Richtung waren. (Non-permissiv GvH = nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend). Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in HvG Richtung waren. (Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend). aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), n= Anzahl.

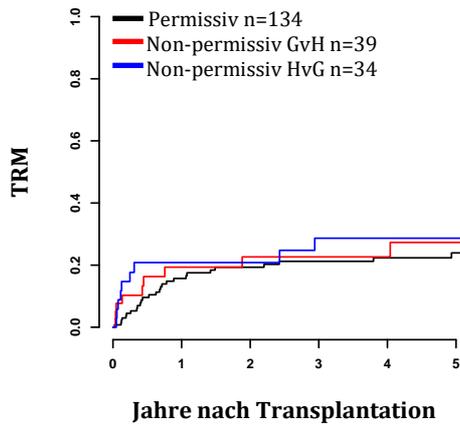


Abbildung 31 A) <35 - Jährige

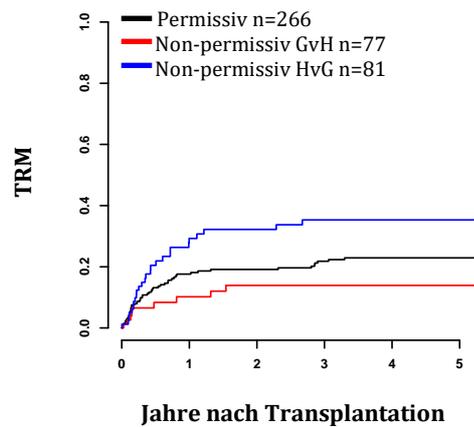


Abbildung 31 B) 35-55 - Jährige

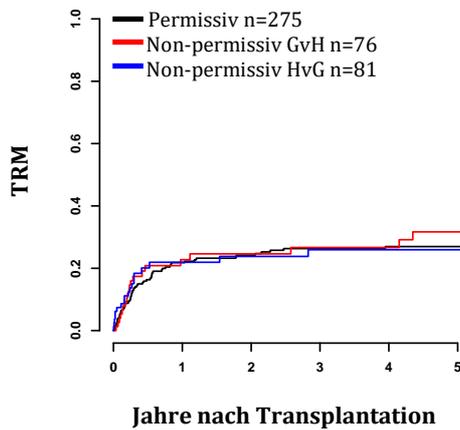


Abbildung 31 C) >55 - Jährige

Abbildungen 31 A)-C): Univariate Analyse der Transplantations assoziierte Mortalität (TRM). Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell auf die TRM bei Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Alters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in HvG Richtung waren. Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), n= Anzahl.

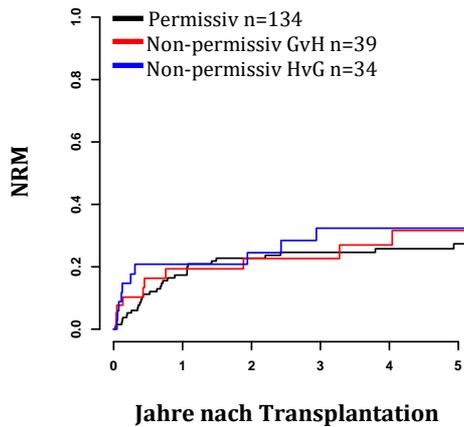


Abbildung 32 A) < 35 - Jährige

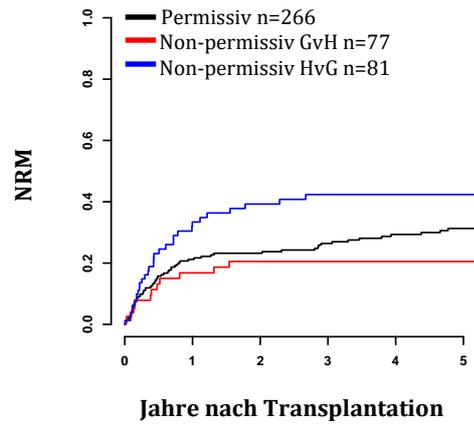


Abbildung 32 B) 35-55 - Jährige

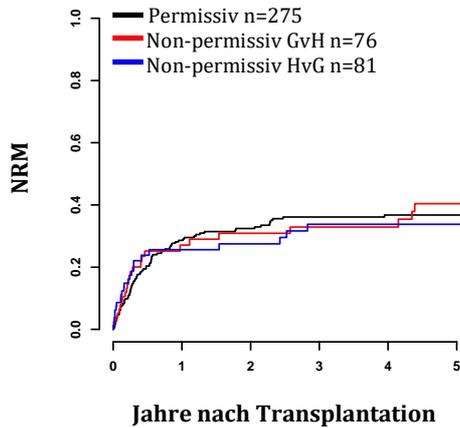


Abbildung 32 C) > 55 - Jährige

Abbildungen 32 A)-C): Univariate Analyse rezidivfreien Mortalität (NRM). Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell auf die NRM bei Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Alters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissive in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in HvG Richtung waren. Non-permissive HvG= nicht permissive in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), n= Anzahl.

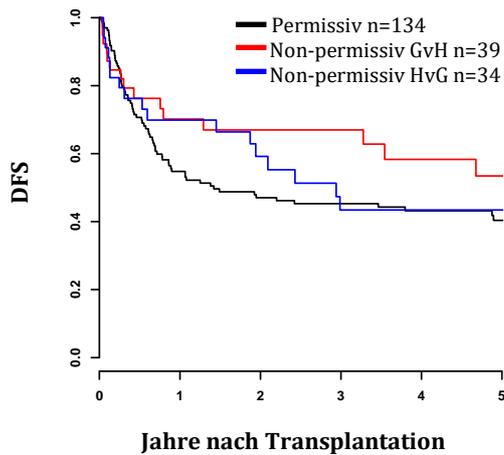


Abbildung 33 A) < 35 - Jährige

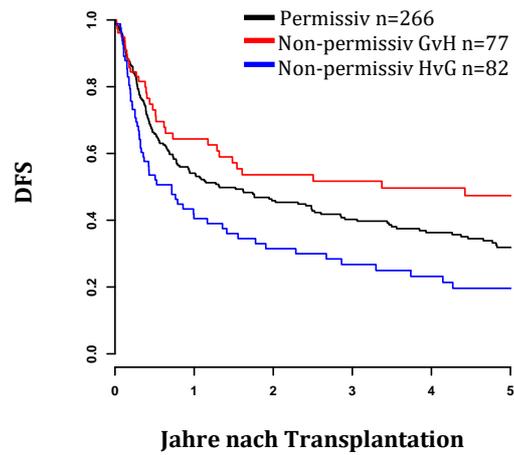


Abbildung 33 B) 35-55 - Jährige

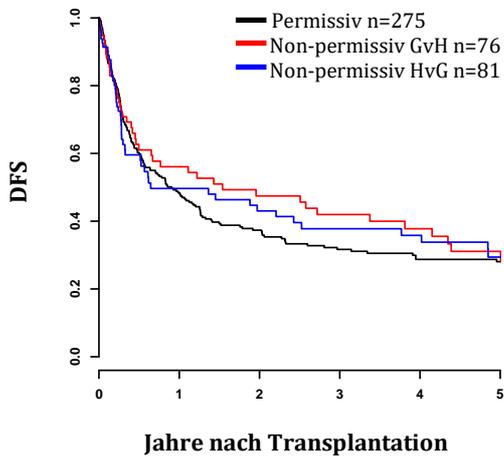


Abbildung 33 C) >55- Jährige

Abbildungen 33 A)-C): Überlebensanalyse des Krankheitsfreien Überlebens (DFS). Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE3-Modell auf das krankheitsfreie Überleben bei Stammzelltransplantationen, die für klassische HLA Genorte kompatibel waren, in Abhängigkeit des Alters. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten, die HLA-DP permissiv waren (permissive). Die rote Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in GvH Richtung waren. Non-permissiv GvH = nicht permissiv in Richtung Transplantat gegen Wirt Reaktion gehend. Die blaue Linie steht für die Patienten, die HLA-DP non-permissive in HvG Richtung waren. Non-permissive HvG= nicht permissiv in Richtung Wirt gegen Transplantations Reaktion gehend. DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.5. Einfluss des HLA-DP-Kompatibilitätsstatus auf die allogene Stammzelltransplantation, abhängig vom CMV-Serostatus

3.5.1. Einfluss des CMV Serostatus auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT

In der einschlägigen Literatur wird berichtet, dass der CMV-Serostatus des Spenders und des Patienten das Ergebnis der Stammzelltransplantation entscheidend beeinflussen kann. Im Folgenden wurde überprüft, ob sich dieser Sachverhalt auch in unserer Kohorte abbilden lässt und ob die HLA-DP-Kompatibilität hierbei eine regulierende Rolle spielt. Hierfür haben wir zunächst den Einfluss der jeweils CMV-Serostatus gematchten (Spender und Empfänger haben den gleichen Serostatus, entweder beide positiv oder beide negativ) (=CMVM) bzw. gemismatchten Transplantationspaare (Patient und Spender haben jeweils unterschiedliche Serostatus, z.B. positiv auf negativ) (=CMVMM)) auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT untersucht.

Dabei zeigen sich signifikante Ergebnisse in den folgenden Endpunkten:

Es konnte ein längeres Gesamtüberleben bei CMVM- gegenüber CMVMM-Patienten beobachtet werden.

Darüberhinaus zeigt sich auch eine geringere TRM und NRM bei CMVM-Patienten im Vergleich zu CMVMM-Patienten. Es konnte zudem die Tendenz eines verlängerten krankheitsfreien Überleben der CMVM-Patienten gegenüber der CMVMM-Patienten beobachtet werden.

Tabelle 31 Tabellarische Darstellung der absoluten und relativen Anzahl an Cytomegalievirus (CMV) Serostatus gematchten und gemismatchten allogenen Stammzelltransplantationen dieser Kohorte. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009.

CMV-Status Patient-Spender	Absolute Zahl	Relative Zahl
Match (CMVM)	812	61,3%
Mismatch (CMVMM)	513	38,7%

Tabelle 32 Inzidenzen und relative Anzahlen der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses des Cytomegalievirus (CMV)-Matchingstatus auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. CMVM=Transplantationen mit gematchten CMV-Serostatus, CMVMM=Transplantationen mit gemismatchten CMV-Serostatus. OS=Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival).

	1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
	CMVM	CMVMM	CMVM	CMVMM	CMVM	CMVMM	
OS	60,3%	53,7%	52,0%	40,5%	42,1%	36,2%	0,017
RI	30,0%	29,6%	37,8%	37,6%	42,8%	42,2%	0,78
cGvHD	34,4%	33,4%	42,2%	41,7%	43,7%	42,6%	0,84
TRM	21,3%	27,7%	25,4%	32,2%	26,6%	33,3%	0,011
NRM	26,6%	31,8%	32,9%	38,1%	35,3%	40,6%	0,048
DFS	50,1%	45,3%	38,5%	34,2%	31,8%	27,5%	0,077
	30 Tage		60 Tage		100 Tage		
aGvHD	7,9%	6,5%	11,1%	10,6%	13,5%	12,1%	0,51

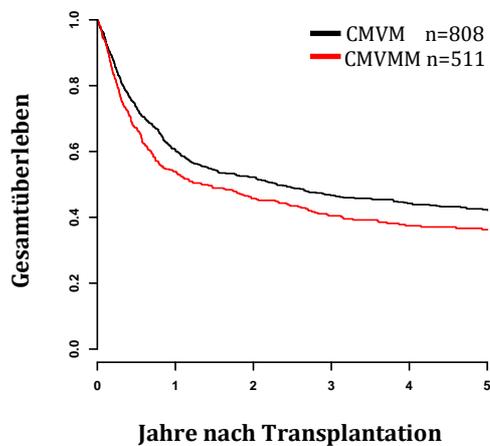


Abbildung 34 A) Gesamtüberleben

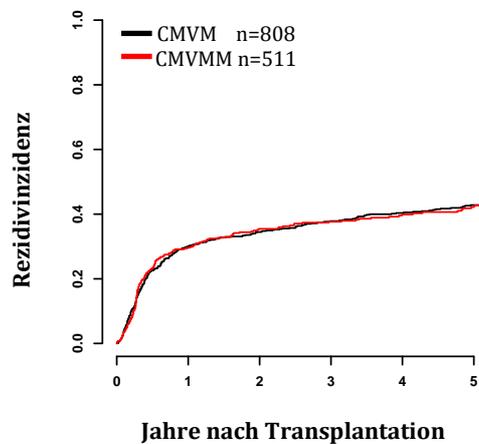


Abbildung 34 B) Rezidivinzidenz

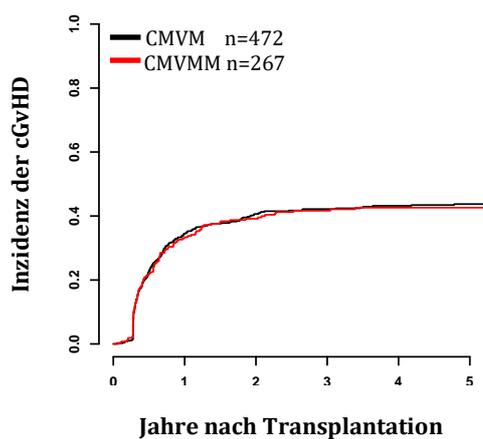


Abbildung 34 C) Inzidenz der chronischen GvHD

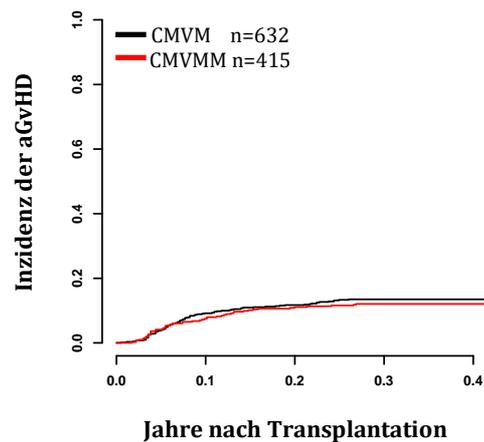


Abbildung 34 D) Inzidenz der akuten GvHD

Abbildung 34 A)-D): Univariate Analyse des Einflusses des CMV-Matchingstatus auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. CMV= Cytomegalievirus. Die schwarze Linie zeigt die Patienten die CMV gematcht waren (CMVM). Die rote Linie steht für die Patienten, die CMV-gemismatcht waren (CMVMM). cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), n= Anzahl.

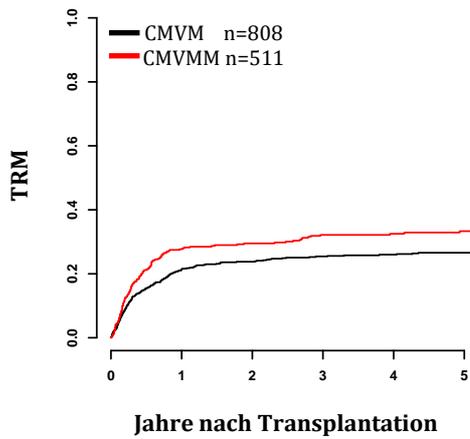


Abbildung 34 E) TRM

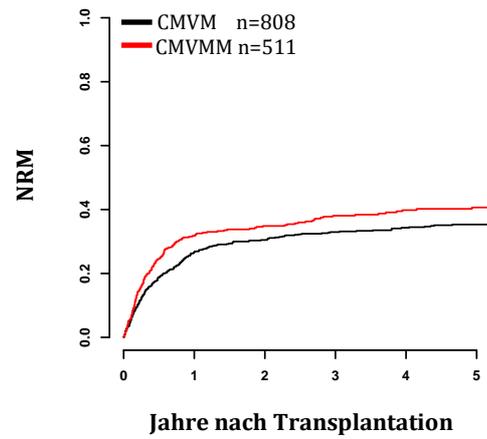


Abbildung 34 F) NRM

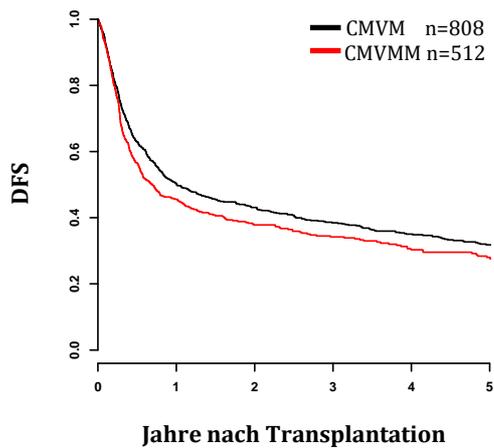


Abbildung 34 G) DFS

Abbildung 34 E)-G) : Univariate Analyse des Einflusses des CMV-Matchingstatus auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. CMV= Cytomegalievirus. Die schwarze Linie zeigt, die Patienten die CMV gematcht waren (CMVM). Die rote Linie steht für die Patienten, die CMV-gemismatcht waren (CMVMM). TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.5.2. Einfluss des Patienten- und Spender-CMV-Serostatus auf den Therapierfolg der HSCT

Wie im Abschnitt 1.3.5 der Einleitung beschrieben, gehört eine Infektion zu den häufigsten Komplikationen nach einer allogenen HSCT. Eine wichtige Rolle spielt hierbei vor allem die CMV-Infektion/-Reaktivierung. Eine Reinfektion kann durch die Transplantation von Stammzellen eines CMV-seropositiven Spender (dCMV+) in einen ebenfalls CMV-seropositiven Patienten (pCMV+) erfolgen. Eine Neuinfektion tritt auf wenn ein CMV-seronegativer Patienten (pCMV-) eine Stammzelltransplantation von einem CMV-seropositiven Spender (dCMV+) erhält.

Die Verteilung des CMV-Serostatus in der Kohorte und der zugehörige HLA-DP-Kompatibilitätsstatus wird in Tabelle 32 aufgezeigt.

Bezüglich des Gesamtüberlebens kann bei pCMV+ als auch bei dCMV+ ein leicht geringerer Überlebensvorteil gegenüber dem jeweiligen negativen Serostatus beobachtet werden. Auch bei der Inzidenz der chronischen GvHD zeigt sich eine erhöhte Inzidenz bei pCMV+ im Vergleich zu pCMV- und ebenfalls eine erhöhte Inzidenz der akuten GvHD bei pCMV+ und dCMV+ gegenüber den jeweiligen, negativen Serostaten. Bei Betrachtung der Transplantationsassoziierten Mortalität und Rezidivfreien Mortalität zeigt sich eine erhöhte Inzidenz dieser bei dCMV+ gegenüber den dCMV-.

Tabelle 33 Tabellarische Darstellung der absoluten und relativen Anzahl des CMV Serostatus von Spender und Empfänger mit dem dazugehörigen HLA-DP-Kompatibilitätsstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. CMV=Cytomegalievirus, pCMV+ = Patient mit positiven CMV Serostatus, pCMV- = Patient mit negativem CMV Serostatus, dCMV+ = Spender mit positiven CMV Serostatus, dCMV- = Spender mit negativem CMV Serostatus, DPM = Transplantationen mit kompatibelem HLA-DP, DPMM = Transplantationen mit inkompatiblen HLA-DP.

CMV-Serostatus	Absolute Anzahl			Relative Anzahl in %		
	Insgesamt	DPM	DPMM	Insgesamt	DPM	DPMM
pCMV+	770	99	671	42,1	5,4	36,7
pCMV-	562	70	492	30,7	3,8	26,9
dCMV+	722	88	634	39,4	4,8	34,6
dCMV-	1027	144	883	56,1	7,9	48,2

Tabelle 34 Inzidenzen und relative Anzahl der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses des CMV-Serostatus von Spender und Empfänger auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Werte in % angegeben. CMV-=negativer CMV-Serostatus, CMV+=positiver CMV-Serostatus. OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), CMV=Cytomegalievirus.

		1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
		CMV-	CMV+	CMV-	CMV+	CMV-	CMV+	
OS	Patient	60,2	56,1	45,4	43,1	41,0	38,9	0,49
	Spender	59,8	55,7	46,6	42,5	42,0	39,0	0,11
RI	Patient	30,1	29,7	39,4	36,5	43,7	41,7	0,72
	Spender	29,3	28,6	37,2	36,1	40,6	41,0	0,99
cGvHD	Patient	32,7	35,0	39,3	43,9	40,4	45,4	0,20
	Spender	34,6	34,9	41,7	42,2	42,8	43,9	0,74
TRM	Patient	22,8	24,3	27,7	28,2	29,5	28,9	0,98
	Spender	22,1	25,6	26,4	30,0	27,5	30,7	0,07
NRM	Patient	27,5	29,3	34,5	35,4	37,5	37,3	0,97
	Spender	26,5	30,2	33,1	36,6	36,0	38,0	0,19
DFS	Patient	49,2	47,8	36,2	37,1	30,2	30,2	0,78
	Spender	50,0	47,3	38,4	35,2	32,6	29,2	0,12
		30 Tage		60 Tage		100 Tage		
aGvHD	Patient	6,5	8,1	9,7	11,8	11,8	13,7	0,35
	Spender	5,3	6,5	7,8	10,3	9,8	12,8	0,08

3.5.3. Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität in Abhängigkeit des CMV-Serostatus des Spenders auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT

Da der Spender-CMV-Serostatus neben der HLA-Kompatibilität häufig als Selektionskriterium für die Auswahl eines geeigneten nicht-verwandten Spenders benutzt wird, wurde in diesem Abschnitt selektiv die Interaktion der HLA-DP-Kompatibilität mit dem Spender-CMV-Serostatus analysiert. Im Folgenden werden nun jeweils CMV-positive (dCMV+) und CMV-negative Spender (dCMV-) bezüglich des DP-Kompatibilitätsstatus (DPM vs. DPMM) einander gegenüber gestellt. Hierbei fiel auf, dass der HLA-DP-Kompatibilitätsstatus abhängig vom CMV-Serostatus des Spenders einen jeweils Gegenteiligen Einfluss auf das Stammzelltransplantationsergebnis hatte: Bei Patienten mit CMV-negativen Spendern, wiesen HLA-DP gematchte Transplantationen eine signifikant höhere Rezidivrate im Vergleich zu HLA-DP gemismatchten Transplantationen auf. Bei Patienten mit einem CMV-seropositiven Spender allerdings, weisen HLA-DP gematchte Transplantationen eine geringere Rezidivinzidenz im Vergleich zu HLA-DP gemismatchten Transplantationen auf. Letzteres ist jedoch nicht signifikant, was vermutlich den zu geringer Fallzahl zu schulden ist. Der gleiche „Umkehreffekt“ bei CMV-seropositiven Spendern ist auch bei allen anderen Endpunkten zu beobachten. Die beschriebenen Effekte sind in Tabelle 35 und Abbildung 35-41 abgebildet.

Tabelle 35 Tabllarische Darstellung der absouten und relativen Anzahl des Spender-CMV-Serostatus und des jeweilige HLA-DP-Kompatibilitätsstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. CMV=Cytomegalievirus, dCMV+ = Spender mit positiven CMV Serostatus, dCMV- = Spender mit negativem CMV Serostatus, DPM = Transplantationen mit kompatiblen HLA-DP, DPMM = Transplantationen mit inkompatiblen HLA-DP.

CMV und DP-Kompatibilitätsstatus	Absolute Anzahl	Relative Anzahl
dCMV-DPM	144	8,2%
dCMV-DPMM	883	50,5%
dCMV+DPM	88	5%
dCMV+DPMM	634	36,3%

Tabelle 36 Inzidenzen und relative Anzahl der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der HLA-DP-Kompatibilität in Abhängigkeit vom CMV-Serostatus des Spenders auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. DPM=Transplantationen mit kompatiblen HLA-DP, DPMM=Transplantationen mit inkompatiblen HLA-DP , Werte in % angegeben, OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease) TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS=Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), CMV=Cytomegalievirus.

		1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
		DPM	DPMM	DPM	DPMM	DPM	DPMM	
OS	dCMV+	51,2%	56,5%	39,4%	42,8%	35,0%	39,6%	0,32
	dCMV-	61,1%	59,3%	46,2%	46,7%	38,6%	42,5%	0,75
RI	dCMV+	21,5%	29,5%	26,3%	27,3%	34,6%	41,8%	0,19
	dCMV-	36,3%	28,2%	47,5%	35,6%	54,5%	38,6%	0.005
cGvHD	dCMV+	28,2%	35,7%	36,3%	42,9%	36,3%	44,7%	0,39
	dCMV-	42,2%	33,3%	49,6%	40,4%	49,6%	41,6%	0,10
TRM	dCMV+	27,8%	25,3%	31,0%	29,8%	31,0%	30,6%	0,53
	dCMV-	15,6%	23,1%	20,7%	27,3%	24,5%	28,0%	0,55
NRM	dCMV+	34,4%	29,6%	40,9%	36,0%	43,1%	37,3%	0,17
	dCMV-	18,2%	27,8%	27,2%	34,1%	33,7%	36,5%	0,13
DFS	dCMV+	46,7%	47,4%	35,2%	35,0%	26,8%	29,5%	0,63
	dCMV-	46,9%	50,2%	31,7%	39,2%	23,1%	33,9%	0,29
		30 Tagen		60 Tagen		100 Tagen		
aGvHD	dCMV+	8,2%	6,2%	11,0%	10,2%	15,2%	12,5%	0,53
	dCMV-	3,3%	5,7%	5,8%	8,2%	8,5%	10,0%	0,55

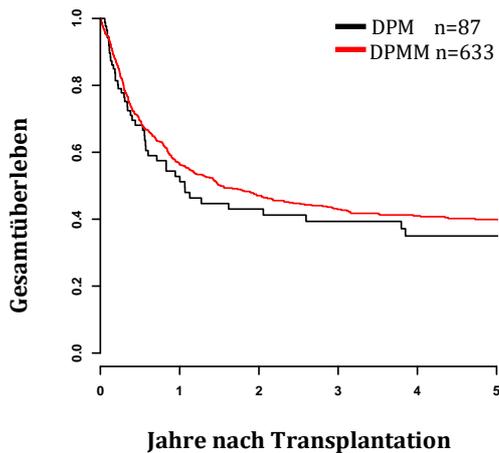


Abbildung 35 A) Gesamtüberleben: dCMV+

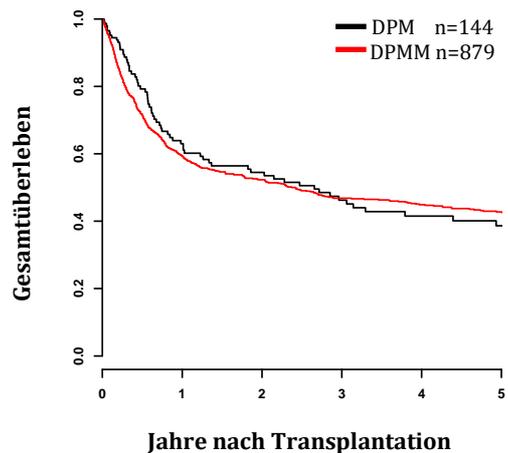


Abbildung 35 B) Gesamtüberleben: dCMV-

Abbildungen 35 A) und B): Überlebensanalyse der Patienten mit CMV-positivem (dCMV+) und CMV-negativem (dCMV-) Spender in Abhängigkeit von ihrem HLA-DP-Kompatibilitätsstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Abbildung 35 A) zeigt die Spender mit positivem CMV-Serostatus und Abbildung 35 B) die Spender mit negativem CMV-Serostatus. Die schwarze Linie zeigt jeweils die Transplantationen mit einer HLA-DP-Kompatibilität (DPM) und die rote Linie die Patienten mit einer HLA-DP-Inkompatibilität (DPMM), n= Anzahl.

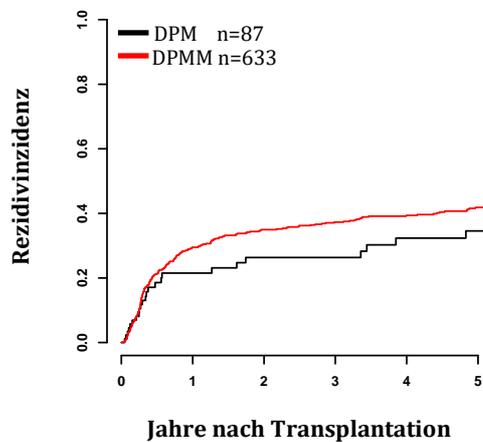


Abbildung 36 A) Rezidivinzidenz: dCMV+

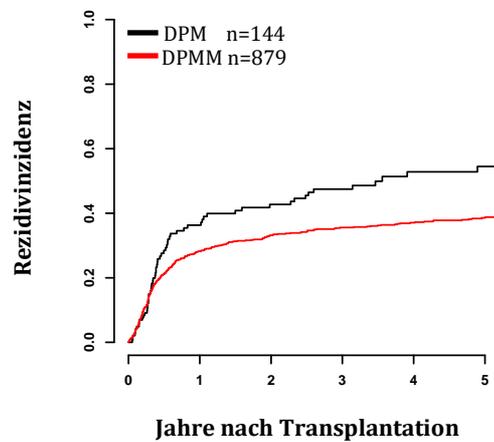


Abbildung 36 B) Rezidivinzidenz: dCMV-

Abbildungen 36 A) und B): Univariate Analyse. Rezidivinzidenz der Patienten mit CMV-positivem (dCMV+) und CMV-negativem (dCMV-) Spender in Abhängigkeit von ihrem HLA-DP-Kompatibilitätsstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Abbildung 36 A) zeigt die Spender mit positivem CMV-Serostatus und Abbildung 36 B) die Spender mit negativem CMV-Serostatus. Die schwarze Linie zeigt jeweils die Transplantationen mit einer HLA-DP-Kompatibilität (DPM) und die rote Linie die Patienten mit einer HLA-DP-Inkompatibilität (DPMM), n= Anzahl.

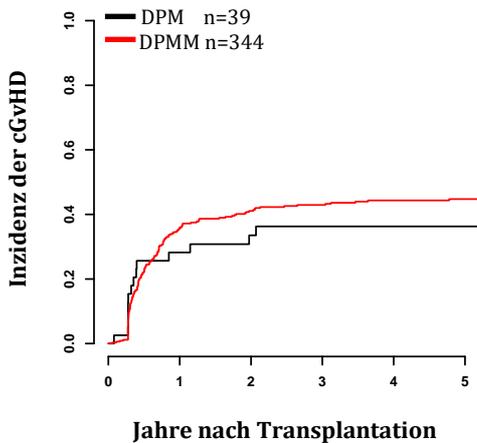


Abbildung 37 A) Inzidenz der cGvHD: dCMV+

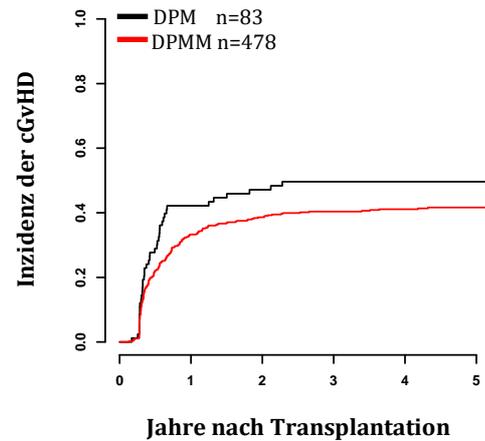


Abbildung 37 B) Inzidenz der cGvHD: dCMV-

Abbildungen 37 A) und B): Univariate Analyse. Inzidenz der chronischen GvHD der Patienten mit CMV-postivem (dCMV+) und CMV-negativem (dCMV-) Spender in Abhängigkeit von ihrem HLA-DP-Kompatibilitätstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Abbildung 37 A) zeigt die Spender mit positivem CMV-Serostatus und Abbildung 37 B) die Spender mit negativem CMV-Serostatus. Die schwarze Linie zeigt jeweils die Transplantationen mit einer HLA-DP-Kompatibilität (DPM) und die rote Linie die Patienten mit einer HLA-DP-Inkompatibilität (DPMM), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), CMV=Cytomegalievirus, n= Anzahl.

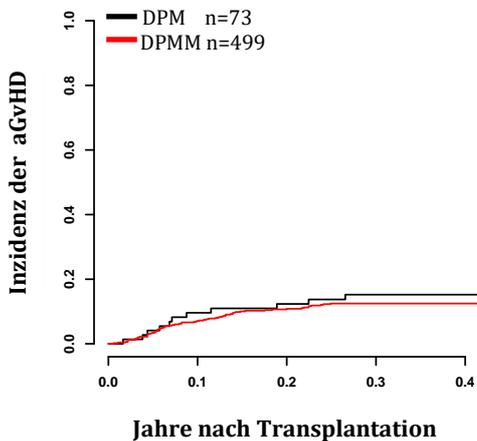


Abbildung 38 A) Inzidenz der aGvHD: dCMV+

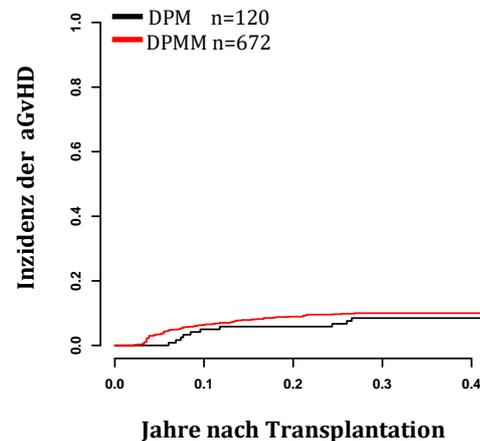


Abbildung 38 B) Inzidenz der aGvHD: dCMV-

Abbildungen 38 A) und 38 B): Univariate Analyse. Inzidenz der akuten GvHD der Patienten mit CMV-postivem (dCMV+) und CMV-negativem (dCMV-) Spender in Abhängigkeit von ihrem HLA-DP-Kompatibilitätsstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Abbildung 38 A) zeigt die Spender mit positivem CMV-Serostatus und Abbildung 38 B) die Spender mit negativem CMV-Serostatus. Die schwarze Linie zeigt jeweils die Transplantationen mit einer HLA-DP-Kompatibilität (DPM) und die rote Linie die Patienten mit einer HLA-DP-Inkompatibilität (DPMM), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), CMV=Cytomegalievirus, n= Anzahl.

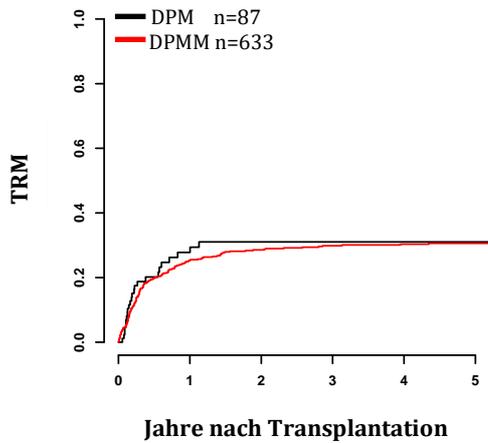


Abbildung 39 A) TRM: dCMV+

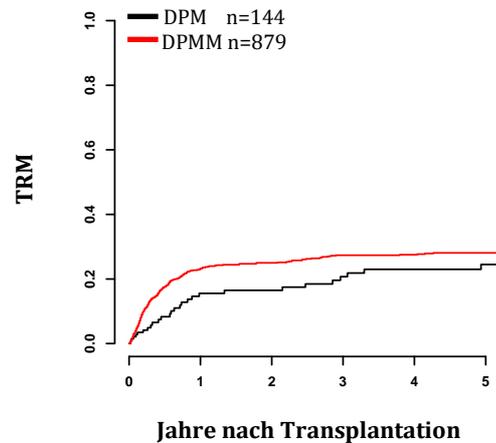


Abbildung 39 B) TRM: dCMV-

Abbildungen 39 A) und 39 B): Univariate Analyse. Inzidenz der Transplantationsassoziierten Mortalität (TRM) der Patienten mit CMV-positivem (dCMV+) und CMV-negativem (dCMV-) Spender in Abhängigkeit von ihrem HLA-DP-Kompatibilitätsstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Abbildung 39 A) zeigt die Spender mit positivem CMV-Serostatus und Abbildung 39 B) die Spender mit negativem CMV-Serostatus. Die schwarze Linie zeigt jeweils die Transplantationen mit einer HLA-DP-Kompatibilität (DPM) und die rote Linie die Patienten mit einer HLA-DP-Inkompatibilität (DPMM), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), CMV=Cytomegalievirus, n= Anzahl.

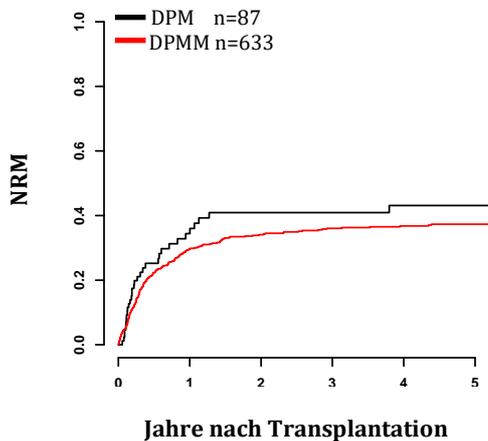


Abbildung 40 A) NRM: dCMV+

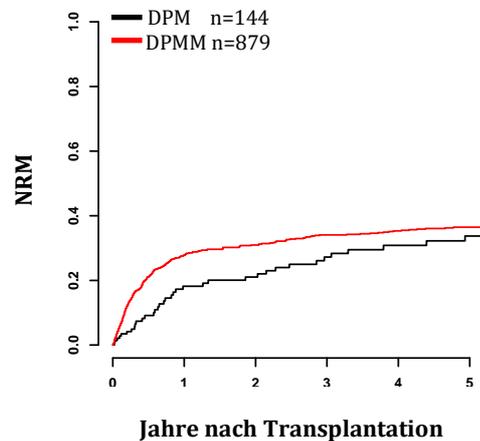


Abbildung 40 B) NRM: dCMV-

Abbildungen 40 A) und 40 B): Univariate Analyse. Inzidenz der rezidivfreien Mortalität (NRM) der Patienten mit CMV-positivem (dCMV+) und CMV-negativem (dCMV-) Spender in Abhängigkeit von ihrem HLA-DP-Kompatibilitätsstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Abbildung 40 A) zeigt die Spender mit positivem CMV-Serostatus und Abbildung 40 B) die Spender mit negativem CMV-Serostatus. Die schwarze Linie zeigt jeweils die Transplantationen mit einer HLA-DP-Kompatibilität (DPM) und die rote Linie die Patienten mit einer HLA-DP-Inkompatibilität (DPMM), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.: Non-relapse mortality), CMV=Cytomegalievirus, n= Anzahl.

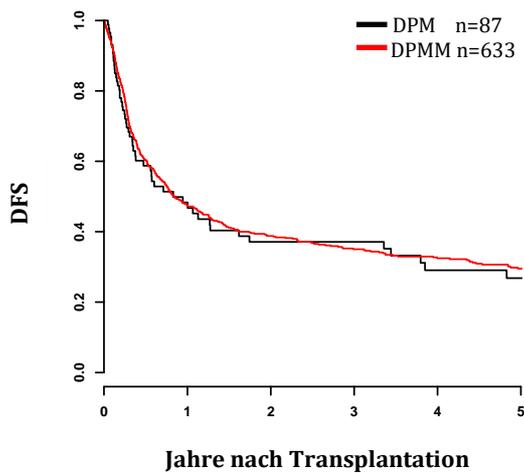


Abbildung 41 A) DFS: dCMV+

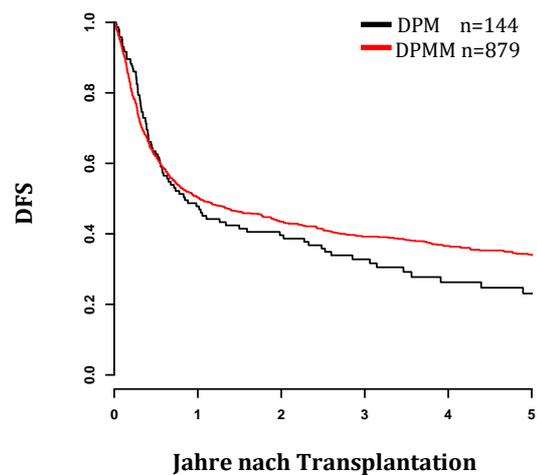


Abbildung 41 B) DFS: dCMV-

Abbildungen 41 A) und 41 B): Überlebensanalyse des krankheitsfreien Überlebens der Patienten mit CMV-positivem (dCMV+) und CMV-negativem (dCMV-) Spender in Abhängigkeit von ihrem HLA-DP-Kompatibilitätsstatus. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Abbildung 41 A) zeigt die Spender mit positivem CMV-Serostatus und Abbildung 41 B) die Spender mit negativem CMV-Serostatus. Die schwarze Linie zeigt jeweils die Transplantationen mit einer HLA-DP-Kompatibilität (DPM) und die rote Linie die Patienten mit einer HLA-DP-Inkompatibilität (DPMM), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), CMV=Cytomegalievirus, n= Anzahl.

3.5.4. Betrachtung der Kombinationen aus HLA-DP-Kompatibilität und CMV-Serostatus des Spenders und der jeweilige Einfluss auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT

Da allgemein die Ergebnisse einer HSCT bei CMV-negativen Spendern günstiger ausfallen jedoch im vorangegangenen Abschnitt eine Interaktion zwischen HLA-DP-Inkompatibilität und CMV-Seropositivität des Spenders beobachtet wurde, wollten wir in dieser Auswertung den Spender CMV-Serostatus und HLA-DP-Kompatibilitätsstatus gegenüberstellen. Zur besseren Veranschaulichung sind in den Abbildungen 42 A)-G), dCMV-DPM, dCMV-DPMM, pCMV+DPM und dCMV+DPMM in einem Schaubild dargestellt. Die jeweiligen Inzidenzen lassen sich der Tabelle 36 entnehmen. Hier zeigte sich wieder ein signifikantes Ergebnis bezüglich der Rezidivinzidenz, welches schon den oben beschriebenen Effekt wiedergibt: Patienten

mit einem CMV-seronegativen und HLA-DP-kompatiblen Spender, haben im Vergleich zum CMV-seronegativen und HLA-DP-Inkompatiblen Spender, sowie gegenüber dem Patienten mit CMV-seropositiven und HLA-DP-kompatiblen Spender eine signifikant erhöhte Rezidivinzidenz. Interessanterweise sieht man im gleichen Schaubild, dass Patienten mit einem CMV-seropositiven und HLA-DP-kompatiblen Spender die geringste Rezidivinzidenz aufweisen. Das erstaunliche ist hier also, dass der CMV-Serosstatus des Spenders bestimmt, ob eine HLA-DP-kompatible Transplantation mit einer hohen Rezidivrate, bzw. einer niedrigen Rezidivrate einher geht. Auch bei den anderen Endpunkten konnte dieser „Umkehreffekt“ beobachtet werden. Dieser war zwar nicht signifikant, aber dennoch eindrücklich. Ein ähnlicher Effekt unter der Abhängigkeit vom CMV-Serostatus des Patienten konnte nicht beobachtet werden. Auch die Grunderkrankung, hatte keinen signifikanten Einfluss auf dieses Ergebnis.

Tabelle 37 Inzidenzen und relative Anzahl der bekannten Endpunkte aus der Analyse des Einflusses der HLA-DP Kompatibilität in Abhängigkeit vom CMV Serostatus des Spenders auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. CMV=Cytomegalievirus, CMV+ = Spender mit positiven CMV-Serostatus, CMV- = Spender mit negativem CMV-Serostatus, DPM = Transplantationen mit kompatibelem HLA-DP, DPMM = Transplantationen mit inkompatiblen HLA-DP, Werte in % angegeben, OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (engl.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival).

	1 Jahr				3 Jahre				5 Jahre				p-Wert
	CMV - DPM	CMV - DPMM	CMV + DPM	CMV + DPMM	CMV - DPM	CMV - DPMM	CMV + DPM	CMV + DPMM	CMV - DPM	CMV - DPMM	CMV + DPM	CMV + DPMM	
OS	61,1	59,3	51,2	56,3	45,1	46,7	39,4	42,7	38,6	42,5	35,0	39,6	0,30
RI	36,3	28,2	21,5	29,5	47,5	35,6	26,3	37,3	54,5	38,6	34,6	41,8	0,02
cGvHD	42,2	33,3	28,2	35,7	49,6	40,4	36,3	42,9	49,6	41,6	36,3	44,7	0,34
TRM	15,6	23,1	27,8	24,3	20,7	27,3	31,0	29,8	24,5	28,1	31,0	30,6	0,13
NRM	18,2	27,8	34,4	29,6	27,2	34,1	40,9	36,0	33,7	36,5	43,1	37,3	0,12
DFS	46,9	50,3	46,7	47,2	31,7	39,2	35,2	34,8	23,1	33,9	26,8	29,5	0,29
	30 Tage				60 Tage				100 Tage				
aGvHD	3,3	5,6	8,2	6,2	5,8	8,2	11,0	10,2	8,5	10,0	15,0	12,5	0,27

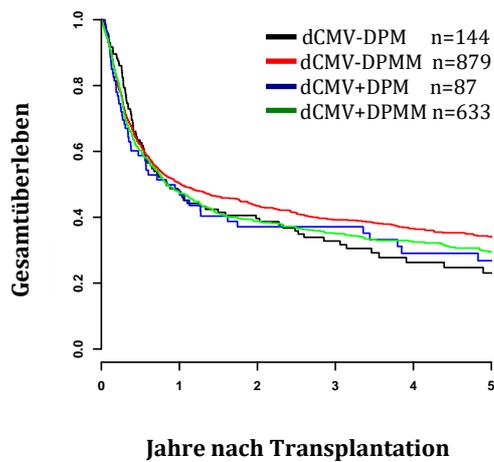


Abbildung 42 A) Gesamtüberleben

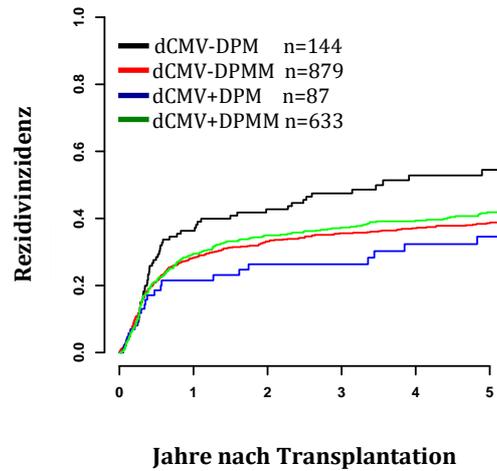


Abbildung 42 B) Rezidivinzidenz

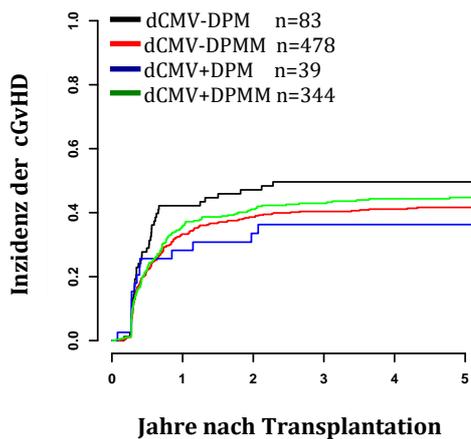


Abbildung 42 C) Inzidenz der cGvHD

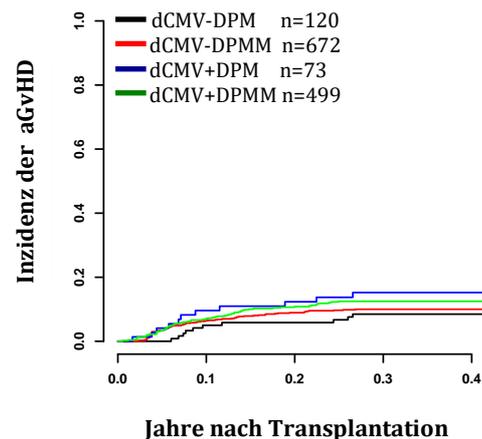


Abbildung 42 D) Inzidenz der aGvHD

Abbildung 42 A)-D): Univariate Analyse des Einflusses der Interaktion zwischen Spender-CMV-Serostatus und HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie steht für Transplantationen mit CMV negativen, HLA-DP-kompatiblen Spendern (dCMV-DPM). Die rote Linie steht für Transplantationen mit CMV negativen, HLA-DP-inkompatiblen Spendern (dCMV-DPMM). Die blaue Linie zeigt Transplantationen mit CMV positiven, HLA-DP-kompatiblen Spendern (dCMV+DPM). Die grüne Linie steht für Transplantationen mit CMV positiven, HLA-DP-inkompatiblen Spendern (dCMV+DPMM). CMV= Cytomegalievirus, cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), n= Anzahl.

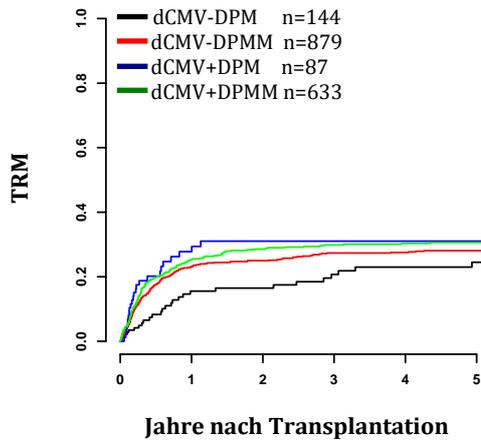


Abbildung 42 E) TRM

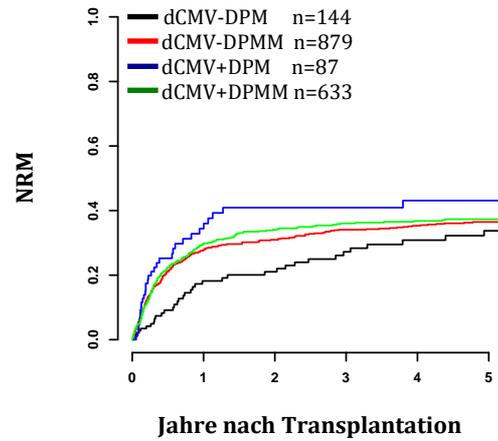


Abbildung 42 F) NRM

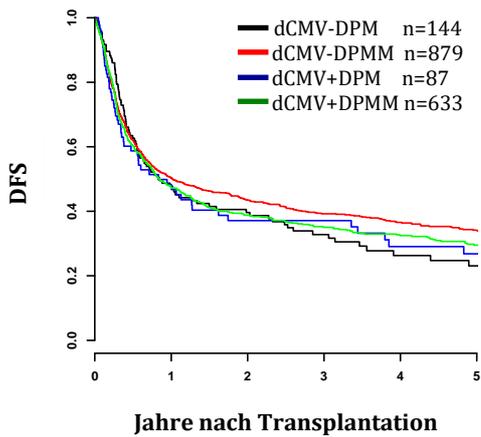


Abbildung 42 G) DFS

Abbildung 107-113: Univariate Analyse des Einflusses der Interaktion zwischen Spender-CMV-Serostatus und HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie steht für Transplantationen mit CMV-negativen, HLA-DP-kompatiblen Spendern (dCMV-DPM). Die rote Linie steht für Transplantationen mit CMV-negativen, HLA-DP-inkompatiblen Spendern (dCMV-DPMM). Die blaue Linie zeigt Transplantationen mit CMV-positiven, HLA-DP-kompatiblen Spendern (dCMV+DPM). Die grüne Linie steht für die Transplantationen mit CMV-positiven, HLA-DP-inkompatiblen Spendern (dCMV+DPMM). CMV= Cytomegalievirus, TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.5.5. Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität in Abhängigkeit vom CMV-Serostatus des Spenders auf den Therapieerfolg der HSCT bei Transplantationen die für klassische HLA Genorte (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1) kompatibel waren.

Ein Einfluss auf die beobachteten Ergebnisse durch maximale Kompatibilität der übrigen HLA-Klasse-I und -II konnte nicht beobachtet werden.

3.5.6. Interaktion zwischen HLA-DP-Permissivität eingeteilt nach TCE4 und CMV-Serostatus des Spender und ihr Einfluss auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT bei Transplantationen die für klassische HLA Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren.

Da im Abschnitt 3.5.3 gezeigt werden konnte, dass in unserer Kohorte die Rolle der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT abhängig vom CMV-Serostatus des Spenders ist, wurde im Folgenden nun die Permissivitätseinteilung nach TCE4 auf einen solchen Effekt ebenfalls untersucht. Die Verteilung der Kohorte in die jeweiligen Untergruppen lässt sich aus der Tabelle 37 entnehmen.

Die Schaubilder 43 A)-C) zeigen die TCE4-Einteilung, zusammengefasst in permissiv und nonpermissiv abhängig vom CMV-Serostatus des Spenders bei 10/10 gematchten Patienten. Die jeweiligen Inzidenzen können aus Tabelle 38 entnommen werden. Es lässt sich hierbei ein besseres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben der dCMV- HLA-DP-nonpermissiven Patienten gegenüber den anderen 3 Gruppen (dCMV- HLA-DP-permissiv, dCMV+ HLA-DP-nonpermissiv und dCMV+ HLA-DP-permissiv) beobachten, welcher jedoch nicht signifikant ist. Ebenfalls nicht signifikant aber auf dem Schaubild angedeutet, kann eine erhöhte Rezidivinzidenz bei

dCMV- HLA-DP-permissiven Fällen beobachtet werden. Dies würde sich mit der erhöhten Rezidivinzidenz der dCMV- DPM gegenüber den dCMV-DPMM decken, wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben.

Zusätzlich scheint ein dCMV- HLA-DP-nonpermissiver Status eine erhöhte cGvHD Inzidenz aufzuweisen, aber ein dCMV+ HLA-DP-nonpermissiver Status eher eine erhöhte aGvHD-Inzidenz. Während die oben beschriebene Beobachtung nicht signifikant war, ist letztere Beobachtung signifikant. Auch eine erhöhte Inzidenz der TRM in dieser Gruppe (dCMV+ HLA-DP-nonpermissiv) ist gegenüber den anderen signifikant erhöht. Hinzu kommt, dass auch die NRM bei den dCMV- HLA-DP-nonpermissiven Fällen tendenziell erhöht ist.

Tabelle 38 Tabellarische Darstellung der Verteilung der Permissivitätseinstufungen nach dem "TCE4"-Modell in Abhängigkeit des CMV-Serostatus des Spenders mit absoluter und relativer Anzahl bei Transplantationen, die für klassische HLA-Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. CMV=Cytomegalievirus, dCMV+ = Spender mit positivem CMV-Serostatus, dCMV- = Spender mit negativem CMV-Serostatus, non-permissiv= nicht-permissive.

	Absolute Anzahl	Relative Anzahl
dCMV- permissive	592	33,8%
dCMV- nonpermissive	435	24,9%
dCMV+ permissive	415	23,7%
dCMV+ nonpermissive	307	17,6%

Tabelle 39 Inzidenzen und relative Anzahl der bekannten Endpunkte bei Transplantationen, die für klassische HLA-Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren, abhängig vom CMV-Serostatus des Spenders und Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell, wobei die non-permissiven Untergruppen zusammengefasst wurden. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. CMV=Cytomegalievirus, dCMV+=Spender mit positiven CMV-Serostatus, dCMV- = Spender mit negativem CMV-Serostatus, perm = permissive, nonp= nicht permissiv, Werte in % angegeben, OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival). Werte in % angegeben.

	1 Jahr				3 Jahre				5 Jahre				p-Wert
	dCMV - perm	dCMV - nonp	dCMV + perm	dCMV + nonp	dCMV - perm	dCMV - nonp	dCMV + perm	dCMV + nonp	dCMV - perm	dCMV - nonp	dCMV + perm	dCMV + nonp	
OS	61,4	57,7	56	55,4	47,4	45,5	43,2	41,1	41,9	42,2	39,9	37	0,75
RI	30,3	26,2	29,4	25,3	41,2	34,8	37,4	35,9	46,3	39,8	41,1	42,6	0,60
cGvHD	30,5	29,0	30,8	29,1	36,8	44,6	37,8	37,2	37,4	45,6	37,8	37,2	0,73
TRM	19,1	17,5	17,8	27,0	24,1	22,0	21,9	31,2	26,0	23,4	22,6	32,3	0,046
NRM	22,3	22,3	22,8	30,6	29,6	29,1	28,9	36,5	34,4	31,0	29,5	38,7	0,21
DFS	50,9	48,6	47,8	46,5	38,8	37,8	36	33,7	32,6	32,7	31,2	26,4	0,42
	30 Tage				60 Tage				100 Tage				
aGvHD	2,7	3,8	5,1	4,0	5,1	6,0	8,3	9,5	5,8	7,1	9,7	14,3	0,03

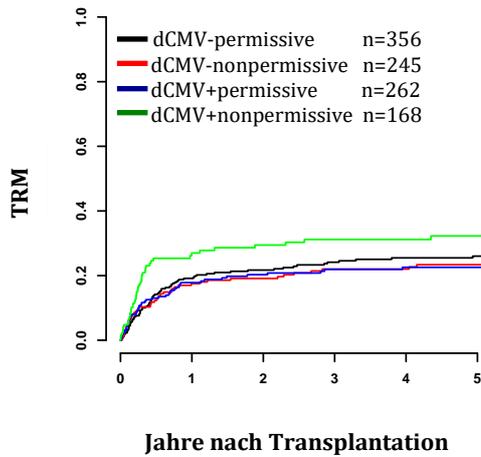


Abbildung 43 A) TRM

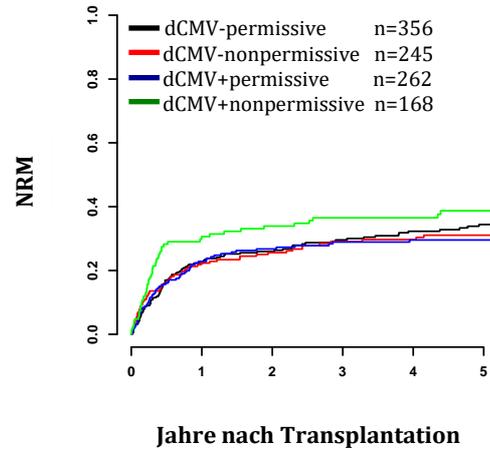


Abbildung 43 B) NRM

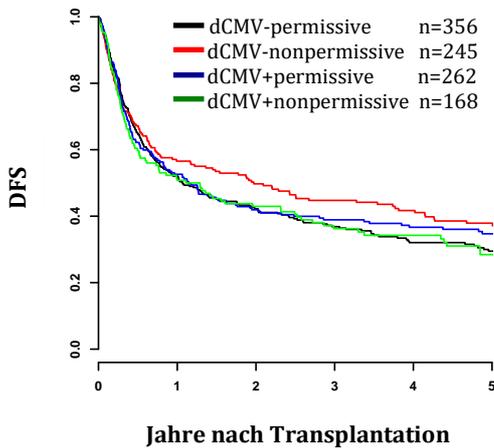


Abbildung 43 C) DFS

Abbildung 43 A-C): Univariate Analyse des Einflusses der Interaktion zwischen Spender-CMV-Serostatus und HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach dem TCE4-Modell auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie steht für Transplantationen mit CMV-negativen, HLA-DP-permissiven Spendern (dCMV-permissive). Die rote Linie steht für Transplantationen mit CMV-negativen, HLA-DP-non-permissiven Spendern (dCMV-nonpermissive). Die blaue Linie zeigt die Transplantationen mit CMV-positiven, HLA-DP-permissiven Spendern (dCMV+permissive). Die grüne Linie steht für die Transplantationen mit CMV-positiven, HLA-DP-non-permissiven Spendern (dCMV+nonpermissive), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival). n= Anzahl.

3.6. Einfluss der HLA-DP-Expression (nach E. Petersdorf) auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT

3.6.1. Einfluss einer niedrigen HLA-DP-Expression des Spenders auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT, bei einzelner HLA-DP Inkompatibilität und bei Transplantationen die für die klassischen HLA kompatibel waren, ohne Berücksichtigung der Grunderkrankung des Patienten.

Neben dem Aspekt der HLA-DP-Kompatibilität beschreiben Petersdorf et al. [65], dass auch die Expressionstärke des HLA-DP-Moleküls einen Einfluss auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT hat. Die Expressionstärke könne in niedrig- (A) und hochexprimiert (G) unterteilt werden. An dieser Stelle soll nun geprüft werden, ob auch diese Theorie sich auf unsere Kohorte abbildet. Als Voraussetzung wurden nur die Patienten aus der Kohorte ausgewählt, die für die klassischen HLA-Merkmale kompatibel waren und denen ein Spender mit einem niedrig exprimierenden HLA-DP (A) zugewiesen wurde. Anschließend wurden hier der Therapieerfolg der allogenen HSCT abhängig vom Expressionsallel des Patienten (A oder G) untersucht.

Es zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil und ein tendenziell verlängertes krankheitsfreies Überleben der Patienten mit niedrigexprimierendem Allel A im Vergleich zu Patienten mit einem HLA-DP-hochexprimierendem Allel G. Die Rezidivinzidenz zeigte kaum einen Unterschied zwischen den beiden Expressionsformen. Bei der Inzidenz der chronischen GvHD zeigte sich eine leicht erhöhte, aber nicht signifikante Inzidenz der Empfänger mit Expressionsallel A gegenüber denen mit dem Allel G. Bei der Analyse der akuten GvHD zeigen Empfänger mit Allel G eine minimal erhöhte Inzidenz gegenüber Allel-A-Empfängern. Anders als bei E. Petersdorf konnte hier keine Signifikanz aufgezeigt werden. Die

NRM- und TRM-Analyse zeigte eine erhöhte Inzidenz der transplantationassoziierten Mortalität sowie Signifikanz der rezidivfreien Mortalität bei Empfängern mit Allel G.

Tabelle 40 Inzidenzen und relative Anzahl aus der Analyse der bekannten Endpunkte bei Spendern mit Expressionsmuster A (niedrige HLA-DP-Expression) abhängig vom Expressionsmuster des Patienten bei Transplantationen, die für die typischen HLA's kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. A= niedrige HLA-DP-Expression, G= hohe HLA-DP-Expression, OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival). Werte in % angegeben.

Empfängerallel	1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
	A	G	A	G	A	G	
OS	68,1	57,3	57,2	43,7	53,1	40,1	0,02
RI	28,5	30,4	38,8	40,0	40,3	42,1	0,80
cGvHD	31,5	25,6	36,9	35,0	36,9	35,0	0,78
TRM	17,9	23,8	22,0	29,6	22,0	30,8	0,09
NRM	21,4	30,2	26,9	37,0	28,5	39,3	0,049
	30 Tagen		60 Tagen		100 Tagen		
aGvHD	4,1	4,5	4,7	8,1	5,9	9,0	0,32

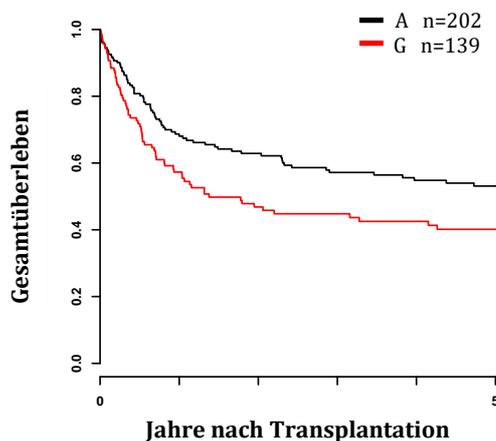


Abbildung 44 A) Gesamtüberleben Spender A

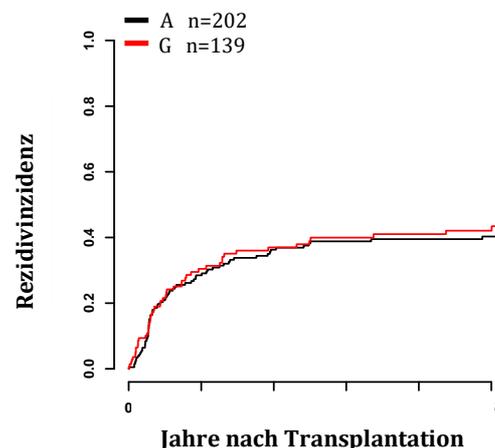


Abbildung 44 B) Rezidivinzidenz Spender A

Abbildung 44 A) – 44 B): Univariate Analyse des Einflusses von der Empfänger-HLA-DP-Expressionsstärke bei niedrig-exprimiertem HLA-DP des Spenders, bei Transplantationen die für die klassischen HLA kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie steht für Patienten mit niedrigexprimierendem HLA-DP (=A). Die rote Linie für Patienten mit hochexprimierendem HLA-DP (=G), n= Anzahl.

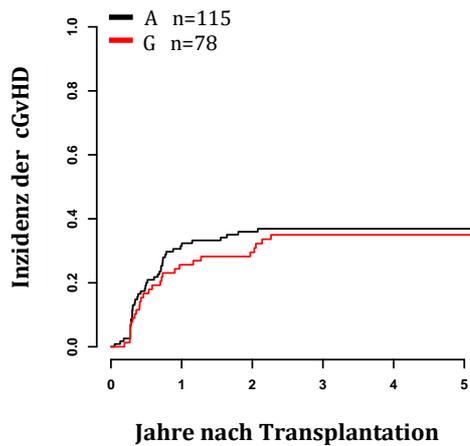


Abbildung 44 C) Inzidenz der cGvHD Spender A

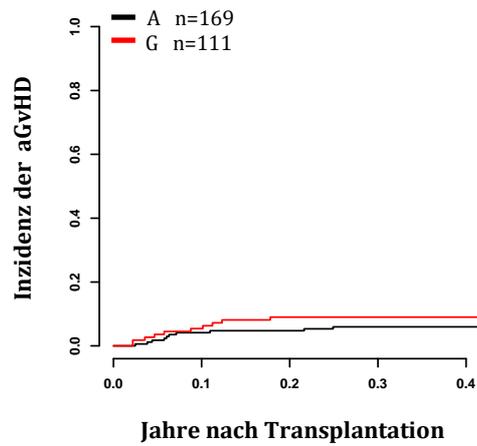


Abbildung 44 D) Inzidenz der aGvHD Spender A

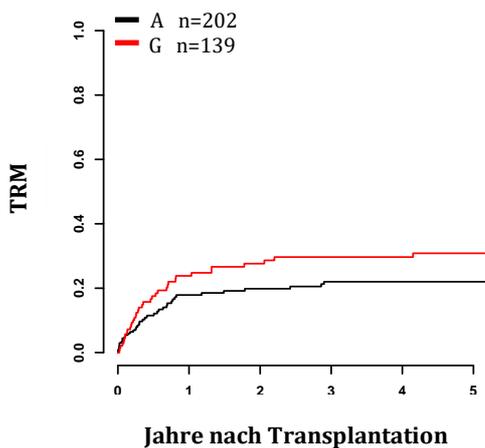


Abbildung 44 E) TRM Spender A

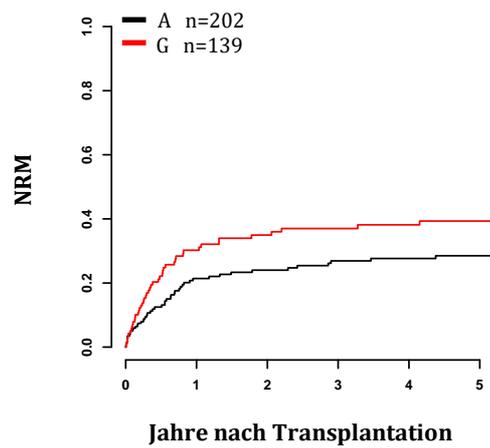


Abbildung 44 F) NRM Spender A

Abbildung 44 C) - 44 F): Univariate Analyse des Einflusses der Empfänger-HLA-DP-Expressionsstärke bei niedrig-exprimiertem HLA-DP des Spenders, bei Transplantationen die für die klassischen HLA kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie steht für Empfänger mit niedrig-exprimierendem-HLA-DP (=A). Die rote Linie für Empfänger mit hoch-exprimierendem-HLA-DP (=G), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), n= Anzahl.

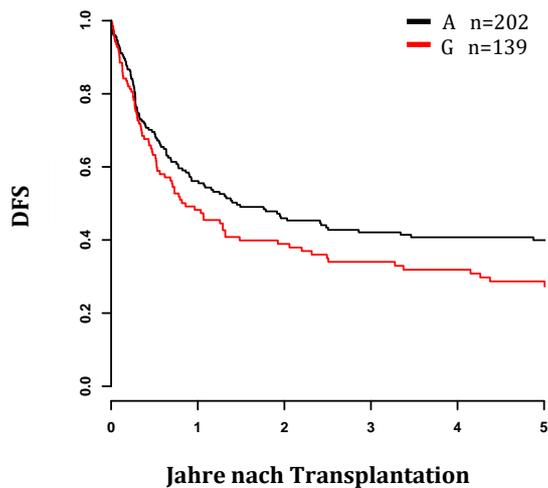


Abbildung 44 G) DFS Spender A

Abbildung 44 G): Univariate Analyse des Einflusses der Empfänger-HLA-DP-Expressionsstärke bei niedrig-exprimiertem-HLA-DP des Patienten, bei Transplantationen die für die klassischen HLA kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie steht für Patienten mit niedrig-exprimierendem HLA-DP (=A). Die rote Linie für Patienten mit hoch-exprimierendem HLA-DP (=G), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.6.2. Einfluss einer hohen HLA-DP-Expression des Spenders auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT, bei einzelner HLA-DP Inkompatibilität und bei Transplantationen die für die klassischen HLA kompatibel waren, ohne Berücksichtigung der Grunderkrankung des Patienten.

Auch in diesem Punkt wird die Theorie von Petersdorf et al. weiter untersucht. Als Voraussetzung wurden hier alle 10/10 gematchten Patienten unabhängig der Grunderkrankung selektiert, deren Spender das mit einer hohen HLA-DP-Expression assoziierten Expressionsallel G aufwies. Anschließend wurden der Therapieerfolg der allogenen HSCT abhängig vom Expressionsallels des Empfängers (A=niedrig, G=hoch), untersucht.

Anders als bei Spendern mit dem Expressionsallel A, ist hier nun kein Überlebensvorteil und kein Unterschied im krankheitsfreien Überleben, abhängig vom Expressionsallel des Empfängers zu erkennen. Auch die Rezidivinzidenz verhält sich hier anders und zeigt eine erhöhte Rezidivinzidenz bei Patienten mit dem niedrigexprimierendem Allel A. Jedoch ist dieses Ergebnis nicht signifikant. Ebenfalls nicht signifikant aber mit klarer Tendenz im Schaubild, ist eine leicht erhöhte Inzidenz einer chronischen GvHD bei Spendern mit dem Allel G zu vermerken.

Signifikant erhöht ist nun hier aber eine erhöhte Inzidenz der akuten GvHD bei Patienten mit dem Expressionsallel A gegenüber denen mit dem Expressionsallel G. Die Ergebnisse der Analyse der NRM und TRM ähneln derer mit den Spendern mit Expressionsalles A, in sofern, als dass Patienten mit Allel G eine erhöhte Inzidenz der NRM und TRM aufzeigten. Auch diese Ergebnisse konnten nicht statistisch stratifiziert werden sondern beschreibt nur Tendenzen.

Tabelle 41 Inzidenzen und relative Anzahl aus der Analyse der bekannten Endpunkte bei Spendern mit Expressionsmuster G (hohe HLA-DP-Expression), abhängig vom Expressionsmuster des Patienten bei Transplantationen, die für die typischen HLA's kompatibel sind. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. A=niedriger HLA-DP Expression, G=hohe HLA-DP-Expression, OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival). Werte in % angegeben.

	1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
Empfängerallel	A	G	A	G	A	G	
OS	64,8	61,3	45,8	46,9	43,3	40,0	0,67
RI	27,4	22,4	39,4	27,4	45,8	34,2	0,14
cGvHD	30,1	31,0	36,6	41,0	36,6	44,8	0,58
TRM	19,3	28,3	23,6	35,5	23,6	35,5	0,110
NRM	22,9	29,7	28,0	37,0	29,3	41,5	0,11
DFS	52,6	52,4	36,4	43,9	28,8	34,8	0,73
	30 Tagen		60 Tagen		100 Tagen		
aGvHD	5,4	0,0	10,1	0,02	11,7	0,02	0,043

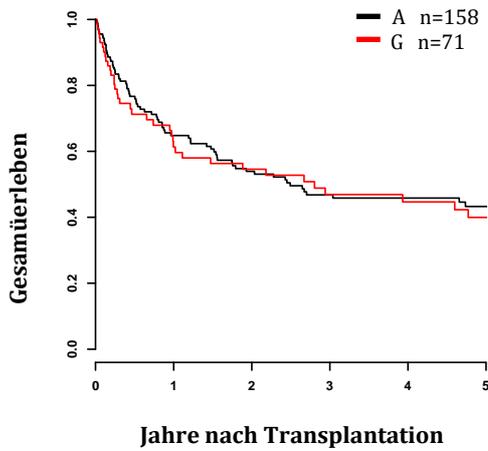


Abbildung 45 A) Überlebensanalyse Spender G

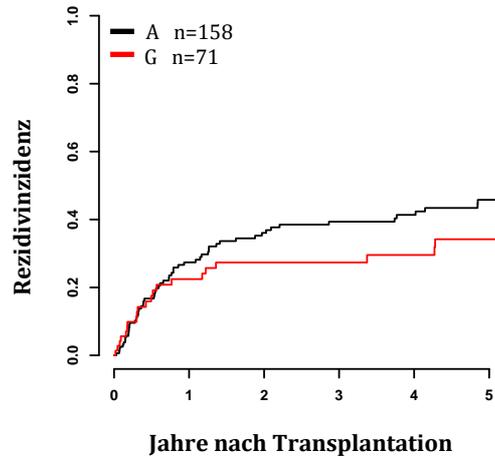


Abbildung 45 B) Rezidivinzidenz Spender G

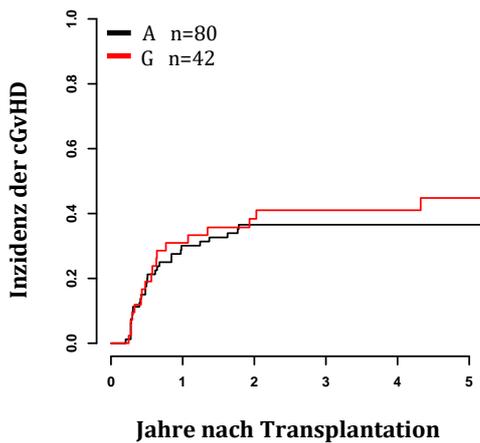


Abbildung 45 C) Inzidenzen der cGvHD Spender G

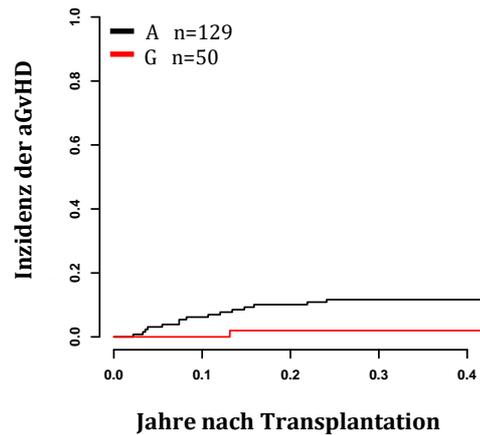


Abbildung 45 D) Inzidenzen der aGvHD Spender G

Abbildung 45 E) – 45 G): Univariate Analyse des Einflusses von Empfänger-HLA-DP-Expressionsstärke bei hoch -exprimiertem HLA-DP des Patienten, bei Transplantationen die für die klassischen HLA's kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie steht für Empfänger mit niedrig-exprimierendem HLA-DP (=A). Die rote Linie für Empfänger mit hoch-exprimierendem HLA-DP (=G), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), n= Anzahl.

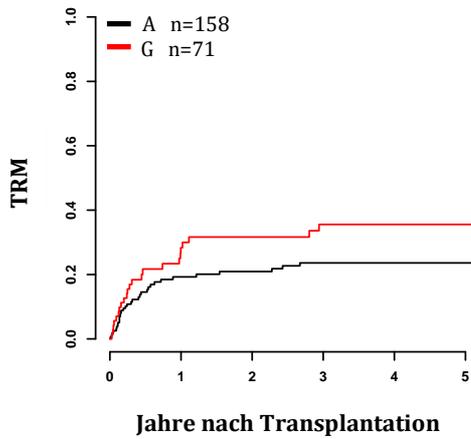


Abbildung 16 TRM Spender G

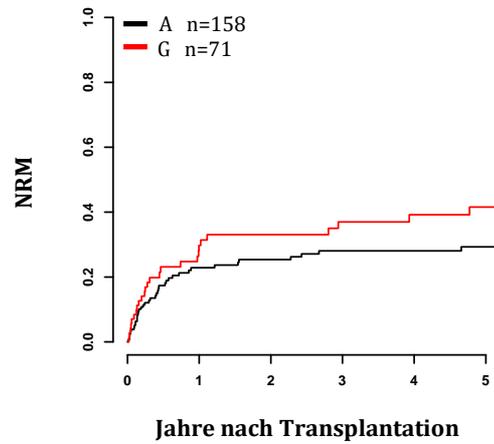


Abbildung 17 NRM Spender G

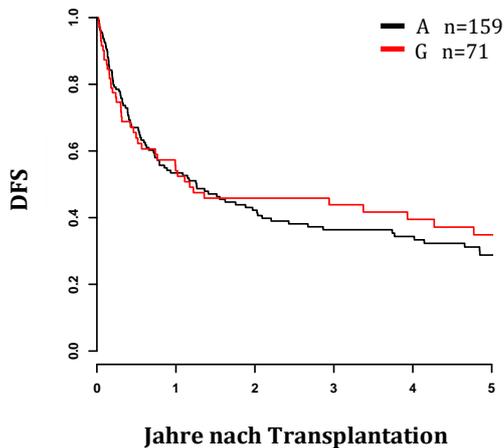


Abbildung 45 G) DFS Spender G

Abbildung 45 E) – 45 G): Univariate Analyse des Einflusses von Empfänger-HLA-DP-Expressionsstärke bei hoch -exprimiertem HLA-DP des Patienten, bei Transplantationen die für die klassischen HLA's kompatibel waren. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. Die schwarze Linie steht für Empfänger mit niedrig-exprimierendem HLA-DP (=A). Die rote Linie für Empfänger mit hoch-exprimierendem HLA-DP (=G), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality)DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival), n= Anzahl.

3.6.3. Einfluss der niedrigen HLA-DP-Expression beim Spender, bei singulärer HLA-DP-Inkompatibilität und bei 10/10-gematchten Transplantationen ohne Lymphome als Grunderkrankung

Da bei der Studie von Petersdorf et al. keine Patienten für die Analysen verwendet wurden, die Lymphome hatten, wurden für nachfolgende Analysen aus unserer Kohorte nun die Lymphome als Grunderkrankung herausgenommen.

Bei Spendern mit dem Expressionsallel A veränderte sich kaum etwas an den Ergebnissen. Lediglich die Signifikanz bezüglich der DFS konnte nicht mehr erreicht werden.

Tabelle 42 Inzidenzen und relative Anzahl aus der Analyse der bekannten Endpunkte bei Spendern mit Expressionsmuster A abhängig vom Expressionsmuster des Patienten bei Transplantationen die für die typischen HLA kompatibel sind und unter Ausschluss der Patienten mit Lymphomen. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. A=(niedriger HLA-DP-Expression), G=(hohe HLA-DP-Expression), OS= Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (engl.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival). Werte in % angegeben.

	1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
	A	G	A	G	A	G	
OS	67,7	58,6	60,1	43,2	57,6	41,8	0,029
RI	23,2	27,4	29,4	37,6	30,5	39,0	0,36
cGvHD	33,8	21,4	40,1	26,9	40,1	26,9	0,15
TRM	19,9	25,0	22,8	32,6	22,8	34,1	0,098
NRM	22,4	28,0	26,2	36,9	26,2	39,9	0,08
DFS	60,6	52,8	50,9	35,0	49,8	32,2	0,056
	30 Tage		60 Tage		100 Tage		
aGvHD	4,1	3,7	5,0	8,5	5,8	9,80	0,3

3.6.4. Einfluss der HLA-DP hoch exprimierenden Spender mit nur einer HLA-DP Inkompatibilität bei Transplantationen die für klassische HLA Genorte (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1) kompatibel waren ohne Lymphome als Grunderkrankung

Auch bei Spendern mit dem Expressionsallel G (hoch-exprimierendem HLA-DP), veränderte sich kaum etwas an den Ergebnissen. Die Inzidenzen können der Tabelle 42 entnommen werden.

Tabelle 43 Inzidenzen und relative Anzahl aus der Analyse der bekannten Endpunkte bei Spendern mit Expressionsmuster G abhängig vom Expressionsmuster des Patienten bei Transplantationen die für die typischen HLA kompatibel sind und unter Ausschluss der Patienten mit Lymphomen. Multizentrische Studie mit Transplantationen von 1999-2009. A=(niedriger HLA-DP-Expression), G=(hohe HLA-DP-Expression), OS=Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), RI= Rezidiv Inzidenz (eng.: Relapse Incidence), cGvHD=chronische Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: chronic Graft versus Host disease), aGvHD= akute Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: acute Graft versus Host disease), TRM=Transplantations-assoziierte Mortalität (engl.: transplant related mortality), NRM= Rezidivfreie Mortalität (engl.:Non-relapse mortality), DFS= Krankheitsfreies Überleben (engl.: Disease free survival). Werte in % angegeben.

	1 Jahr		3 Jahre		5 Jahre		p-Wert
	A	G	A	G	A	G	
OS	65,1	60,9	45,5	49,5	42,2	40,4	0,84
RI	25,2	20,4	36,2	24,5	42,3	33,2	0,22
cGvHD	24,6	32,4	29,6	42,0	29,6	42,00	0,25
TRM	17,7	28,1	23,4	35,2	23,4	35,2	0,15
NRM	22,5	29,9	28,3	36,9	29,9	43,0	0,15
DFS	55,4	55,8	40,9	47,1	33,1	35,6	0,92
	30 Tage		60 Tage		100 Tage		
aGvHD	10,0	2,4	10,0	2,4	10,0	2,4	0,12

4. Diskussion

Seit über 50 Jahren stellt die Stammzelltransplantation ein erfolgreiches, kuratives Therapieverfahren für viele hämatologische Erkrankungen dar. Aufgrund der stetigen Verbesserung und Optimierung der Rahmenbedingungen, steigt die Zahl der Stammzelltransplantationen jährlich an (BMDW, April 2017). Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind vor allem eine HLA-Kompatibilität der HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ -Allele die wichtigste Voraussetzung für eine optimale allogene HSCT (Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V.) [55,29,75].

Dennoch treten auch bei „10/10“- HLA-gematchten Patienten Komplikationen auf, die den Therapieerfolg der HSCT einschränken. Neben der typischen HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ Kompatibilität sollten deshalb auch weitere Einflussfaktoren beachtet werden. In dieser Studie wurde nun analysiert, welche Rolle die HLA-DP-Kompatibilität in der allogenen Stammzelltransplantation spielt.

4.1. Patientencharakteristik

Anhand der demographischen Charakterisierung der Patienten in dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dieser Kohorte um eine gute Repräsentation der allogenen Stammzelltransplantierten handelt. Nach wie vor sind es, auch in dieser Kohorte mit knapp 53%, vor allem ältere Patienten (>50-jährig), die durch eine Stammzelltransplantation therapiert wurden und heutzutage von dieser auch weiterhin profitieren [34]

Da sich die Zahl der Stammzelltransplantationen jährlich erhöht, konnte auch in unserer Studie ein größerer Anteil an Stammzelltransplantationen in den letzten Jahren beobachtet werden: 2006 - 2009 fanden 71% der Transplantationen dieser Kohorte statt (BMDW, April 2017).

Seitdem es durch Stimulation des Knochenmarks mit Granulozytenkolonie-stimulierenden Faktor (GCSF) möglich ist, Stammzellen in das periphere Blut zu entlocken, werden heutzutage bei einem Großteil der allogenen Stammzelltransplantationen die Stammzellen über das periphere Blut entnommen.

Dies zeigt sich auch in dieser Kohorte, in welcher knapp 92 % der Patienten [6] eine periphere Blutstammzellspende nach GSCF-Vorbehandlung des Spenders erhielten.

Minorhistokompatibilitätsantigene werden bei männlichen Patienten auf dem Y-Chromosom exprimiert. Bei weiblichen Spendern könnte dies zu einer Spender-T-Zell Reaktion führen. Deshalb birgt die Kombination aus männlichem Patienten und weiblichem Spender ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung einer GvHD [55, 80]. Um dies zu umgehen, wird stets eine andere Kombination angestrebt. Auch dies spiegelt sich in dieser Kohorte, bei der es sich bei knapp 88 % nicht um eine Kombination aus männlichem Patienten und weiblichem Spender handelt.

Für den besten Therapieerfolg der allogenen HSCT ist des Weiteren eine gute Konditionierung mit idealerweise einer „myeloablativen Konditionierung“ nötig, die einerseits maligne Zellen des blutbildenden Systems eradiziert, andererseits jedoch ohne nachfolgende Stammzelltransplantation letal enden kann. Auch bei den Patienten dieser Studie, wurde bei knapp 62 % der HSCT eine myeloablativ Konditionierung vorgeschrieben [25].

4.2. Validität der Studienkohorte

Wie schon in Teil 3.1 beschrieben handelt es sich bei dem von der „European Group for Blood an Marrow Transplantation“ benanntem EBMT-Riscscore um einen Wert, der die Höhe des Risikos einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation wiedergibt. Er wird aus 5 verschiedenen Einflussfaktoren berechnet, die nachweislich ein mit einem geringeren Gesamtüberleben, rezidivfreien Überleben und einer höheren behandlungsassoziierten Mortalität einer geht. Zu diesen Einflussfaktoren gehören wie schon im Abschnitt 2.3.4 des Material und Methodik-Teils beschrieben: Patientenalter, Krankheitsstadium, vergangene Zeit zwischen Diagnosestellung bis zur Transplantation, Spendertyp und Spender-Empfängerkombination. Um die Validität der Kohorte dieser Studie zu überprüfen, können mit dieser Methode die Überlebensdaten der Kohorte mit dem EBMT-Riscscore verglichen werden. Korrelieren diese, so kann von einer validen Kohorte ausgegangen werden. Wie die Abb. 14 des Abschnitts 3.1 zeigt, konnte eine eindeutige Korrelation der Daten

unserer Kohorte mit dem EBMT-Riscore beobachtet werden. Unsere Kohorte kann somit als validiert angesehen werden.

4.3. Einfluss der HLA-DP Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation

Der Einfluss der HLA-DP Kompatibilität auf den Therapieerfolg der HSCT wurde schon in vielen Studien kontrovers diskutiert.

Des Öfteren wurde die Theorie vertreten, dass Patienten, die HLA-DP inkompatible Transplantate erhielten, häufiger an einer GvHD leiden, als HLA-DP kompatible Transplantationen [50,31,93,64,49]. Andererseits sind HLA-DP inkompatible Transplantationen mit einer verminderten Rezidivinzidenzrate assoziiert [57,78,44]. Durch Fleischhauer et al. konnte zusätzlich ein Modell erstellt werden, das auf der T-Zellreaktivität einzelner HLA-DP-Inkompatibilitäten basiert und letztere in permissive und nicht permissive einteilt [100,27,14]. Hierbei konnten signifikante Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden.

Neben der Einteilung nach der Kompatibilität der HLA-DP-Merkmale vertritt die Forschungsgruppe von Petersdorf die Theorie, dass die HLA-DP Expression beim Spender und Empfänger ebenfalls mit der Inzidenzhöhe der akuten GvHD im Zusammenhang steht [65].

4.3.1. Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität ohne Berücksichtigung weiterer Einflussfaktoren

Wie schon oben kurz beschrieben, wurde im Rahmen verschiedener Studien der Effekt der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT analysiert. Größtenteils wurde hierbei festgestellt, dass durch einen HLA-DP-Mismatch vor allem die GVHD Inzidenz stieg und gleichzeitig die Inzidenz eines Rezidivs sank. Es wurden aber auch Studien veröffentlicht, die die genannten

Beobachtungen bezüglich der Inzidenz der GVHD nicht bestätigen konnten [67,31]. Da diese Thematik weiterhin als umstritten gilt, wurde auch in unserer Studie die Rolle des HLA-DP in der HSCT analysiert.

Betrachtet man nun die Schaubilder und Inzidenzen aus dem Abschnitt 3.2 fällt auf, dass trotz erhöhter transplantationsassoziierter Mortalität und erhöhter rezidivfreier Mortalität bei den HLA-DP inkompatiblen Transplantationen, welche einen indirekten Hinweis auf eine erhöhte Inzidenz für eine cGvHD oder Infektion geben, die Inzidenzen der chronischen GvHD nicht signifikant erhöht sind. Begründet werden könnte dies mit der geringen klinischen Dokumentation der GvHD-Fälle in dieser Studie. Die Tendenz einer verminderten Rezidivinzidenz bei den HLA-DP inkompatiblen transplantierten Patienten, kann auch in unserer Kohorte beobachtet werden. Da eine GvHD und ein GVL-Effekt meist in Verbindung zueinander stehen und gemeinsam auftreten, konnte kein Einfluss auf das Gesamtüberleben beobachtet werden [31, 44].

Bei Betrachtung der Kurvenverläufe erkennt man eindeutige Trends bezüglich der jeweiligen Endpunkte, die jedoch nicht signifikant bestätigt werden können. Wohlmöglich liegt dies an dem Ungleichgewicht der HLA-DP-Kompatibilität, bei knapp 90% HLA-DP inkompatibel transplantierten und knapp 10% HLA-DP kompatibel transplantierten Patienten in dieser Kohorte. Größere Kohorten werden deshalb benötigt, um statistisch stratifizierte Aussagen treffen zu können.

4.3.2. Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität bei Transplantationen die für klassische HLA Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren

Da die meisten der oben genannten Studien bei 10/10 gematchten Patienten durchgeführt worden sind, wurden die bekannten Endpunkte auch in dieser Kohorte bei den 10/10 gemachten Patienten in Abhängigkeit vom HLA-DP-Kompatibilitätsstatus analysiert. Es konnte hierbei nun wieder verdeutlicht werden, dass die Rezidivinzidenz bei HLA-DP gematchten Patienten höher ist, als bei den HLA-DP inkompatiblen Fällen. Anders als bei der Untersuchung des Einflusses des HLA-DP-Kompatibilitätsstatus auf die ganze Kohorte, war hier der p-Wert im knapp

unsignifikanten Bereich. Dafür konnte jedoch ein signifikant verbessertes krankheitsfreies Überleben der HLA-DP inkompatiblen Transplantationen beobachtet werden. Vergleicht man dies nun mit den bereits vorhandenen Studien, bestätigt dies nur noch mehr die Theorie, dass bei HLA-DP inkompatiblen Transplantationen ein Graft-versus-Leukämie-Effekt vermutlich durch alloreaktive CD4+ T-Zellen der Spender induziert wird. Dies ist mit einer verminderten Rezidivinzidenz assoziiert [76, 57, 78, 44].

4.4. HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach den T-Zell Epitop-Modellen und ihr Einfluss auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation

4.4.1. Ohne Berücksichtigung weiterer Faktoren

Knapp 90 % der allogenen Stammzelltransplantationen basieren auf einem Mismatch der HLA-DP-Allele. Dies liegt hauptsächlich daran, dass der HLA-DP-Genort nicht im Kopplungsgleichgewicht mit den anderen HLA-Klasse II Genorten ist, wie es z. B. der Fall für HLA-DR und -DQ ist. Dadurch werden die meisten unverwandten allogenen Stammzelltransplantationen HLA-DP inkompatibel durchgeführt. Das Problem hierbei ist, dass viele Analysen der Beeinflussung der HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg der HSCT, durch das große Ungleichgewicht zwischen HLA-DP kompatiblen und inkompatiblen Transplantationen (90 % zu 10 %) nicht signifikant untermauert werden können. Die Arbeitsgruppe um Katharina Fleischhauer mit Elisabeta Zino und Crivello [100,14] entwickelte einen Algorithmus, der auf einem T-Zell-Epitop-Alloreaktivitätsmuster von HLA-DP-Inkompatibilitäten basiert und diese in permissiv und nicht permissiv unterteilt. Diese Einteilung zielt darauf hin unter den vielen HLA-DP inkompatiblen Spendern solche zu identifizieren, die von dem Gleichgewicht zwischen GvL und GvH profitieren würden. Das erste Modell dieser TCE-Einteilung, das „TCE3“-Modell, fasst die verschiedenen HLA-DP-Allele in 3 verschiedene Gruppen ein: permissiv, nicht permissiv in Richtung GvH und nicht

permissiv in Richtung HvG. Die Permissivitäts-Vektor-Richtung wurde anhand der TCE-Reaktivität entweder gegen das gemismatchte Spender-, oder gegen das gemismatchte Empfänger-HLA-DP-Allel, vergeben [100].

Das zweite TCE-Modell, das „TCE4“-Modell nach Crivello et al. [14] unterteilt die HLA-DP-Allele in 4 Gruppen. Alle die in der TCE4-Einteilung als permissiv definiert sind, sind es auch in der TCE3-Einteilung. Jedoch sind einige von den permissiven der Gruppe TCE3 in der neuen Version als nicht permissiv klassifiziert und aufgrund von zusätzlichen Referenz-Allelen in der Gruppe der Nichtpermissivität eingeteilt.

Der Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung auf den Therapieerfolg der HSCT wurde in einigen multizentrischen Studien anschließend ebenfalls untersucht [50, 66, 27, 15, 26, 9, 48, 25, 68].

Einiger dieser Studien zeigten hierbei eine signifikant erhöhte transplantationsassoziierte Mortalität bei HLA-DP-non-permissiven Transplantationen gegenüber HLA-DP permissiven sowie gegenüber HLA-DP kompatiblen Fällen [40,100,25,68]. Darüber hinaus, wurde zusätzlich ein vermehrtes Auftreten von aGVHD in non-permissiven Fällen, sowohl in GvH, als auch in HvG-Richtung gegenüber permissiven Transplantationen beobachtet [100]. Interessanterweise wird von Zino et al. ebenfalls eine verminderte Rezidivinzidenz der GvH-non-permissiven Fälle im Vergleich zu den HvG non-permissiven als auch zu den permissiven Transplantationen beschrieben. Demnach besteht offensichtlich innerhalb der HLA-DP-non-permissiven Gruppe ein Unterschied zwischen den non-permissiv in GVH- und HvG-Richtung gehenden Fällen. Zino et al. begründen die Ergebnisse mit einem dualen Mechanismus der Entstehung einer aGVHD. Zum einen entstünden sie durch die Aktivierung von T-Zellen des Spenders, die spezifisch gegen die gemismatchten HLA-DP-Epitope des Patienten sind und die gleichzeitig auch einen GvL-Effekt hervorrufen. Zum anderen durch die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen der Patienten T-Zellen, nachdem diese immunogene Spender HLA-DP-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen des Spenders erkannt haben.

Ein signifikanter Einfluss der Permissivität/Nonpermissivität auf das Gesamtüberleben konnte allerdings von keiner der Studien gezeigt werden, da sich GvH- und GvL-Effekte die Waage hielten. [100]

Auch in unserer Studie wurden die bekannten Endpunkte in Abhängigkeit der TCE3 und TCE4 Einteilung untersucht. Einige der oben genannten Ergebnisse konnten dabei bestätigt werden: Betrachtet man die Ergebnisse nach dem TCE4-Modell waren die Ergebnisse in sofern rekonstruierbar, als dass eine signifikant erhöhte transplantationsassoziierte Mortalität der non-permissiven gegenüber den permissiven Transplantationen beobachtet werden konnte. Im Rahmen der HLA-DP Kompatibilitätseinteilung nach dem TCE3-Modell konnte der gleiche Effekt beobachtet werden, jedoch waren die Ergebnisse bei der TCE3-Einteilung nicht signifikant. Anders als in den zuvor genannten Studien lies sich in userer Kohorte kein signifikanter Effekt der TCE3- und TCE4-Einteilung auf die Rezidivinzidenz und die akute GvHD-Inzidenz nachweisen, obwohl die Ergebnisse eine klare Tendenz für den zu erwartenden Effekt aufwiesen. (verminderte Rezidivinzidenz der non-permissiven-GvH Fälle im Vergleich zu den anderen beiden Permissivitätsgruppen (permissiv und nonpermissiv HvG)). Ein Grund für die fehlende Signifikanz bezüglich der akuten GvHD könnte sicherlich das Fehlen des aGvHD-Status bei einem großen Teil der Patienten aus dieser Kohorte sein.

Vergleicht man die permissiven zu den non-permissiven Transplantationen, eingeteilt nach dem TCE4-Modell, konnte eine tendenziell, verminderte rezidivfreie Mortalität beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war. Dies könnte implizieren, dass Patienten mit einem permissiven Spender weniger an einer GvHD und Infektionen, dafür jedoch mehr an Rezidivereignissen versterben. Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen wider, in denen ein eindeutiger Trend einer erhöhten Rezidivinzidenz der permissiven Transplantationen im Vergleich zu den nonpermissiven GvH Transplantationen ausgemacht werden konnte. Bei der Auswertung nach dem TCE3-Modell konnte kein eindeutiger Trend bezüglich der rezidivfreien Mortalität beobachtet werden. Anders als bei dem TCE4-Modell kann hier ein knapp die Signifikanzgrenze verfehlender Effekt der TCE3-Einteilung auf das krankheitsfreie Überleben beobachtet werden. Hierbei scheinen die GvH-non-permissiven Fälle das längste krankheitsfreie Überleben aufzuweisen, gefolgt von den permissiven und den HvG-non-permissiven Transplantationen. Auch diese Beobachtung deckt sich mit der oben beschriebenen Rezidivinzidenz der TCE3 Einteilung. Überraschenderweise fällt jedoch auf, dass ein fast signifikanter Gesamtüberlebensvorteil der sowohl nach TCE4 und TCE3 eingeteilten GvH non-permissiven Transplantationen gegenüber den

permissiven und den nonpermissiven HvG Fällen zu beobachten ist. Erklären ließe sich dies durch die vermutlich verminderte Rezidivhäufigkeit durch den gesteigerten GVL-Effekt und der damit wahrscheinlich verminderten Transplantatabstoßung (Host versus Graft-Reaktion), was insgesamt mit einem besseren Überleben einhergeht.

Betrachtet man nun weitere Faktoren, die diese Ergebnisse beeinflussen könnten, wie zum Beispiel der Kompatibilitätsstatus der anderen HLA's oder auch Alter, CMV Status usw. so verändern sich diese Ergebnisse.

4.4.2. Einfluss der HLA-DP-Permissivität, eingeteilt nach „T-Zell-Epitope-matching“ bei Transplantationen die für klassische HLA-Genorte kompatibel waren

Die meisten publizierten Studien untersuchten den HLA-DP-Effekt in Transplantationskohorten, die für die klassischen HLA-Merkmale kompatibel waren (10/10-match). In der Arbeit von Touzeau et al. wurden 141 10/10-gematchte Patienten auf die bekannten Endpunkte, abhängig vom HLA-DP-Permissivitätsstatus analysiert [92]. Hierbei konnte allerdings kein Einfluss der TCE4-Einteilung auf die untersuchten Endpunkte beobachtet werden, anders als dies bei sonstigen Studien beschrieben wurde, in denen non-permissive Inkompatibilität im Vergleich zu permissiven Inkompatibilitäten eine zwar erhöhte TRM, aber auch ebenfalls eine erhöhte Gesamtmortalität aufzeigten [68]. Letzteres Ergebnis konnte von Pidala et al. sowohl für 8/8 (=Kompatibilität für HLA-A,-B,-C und -DR), als auch für 10/10 (=Kompatibilität für HLA-A,-B,-C,-DR und -DQ) nachgewiesen werden, weshalb Pidala et al. zum Entschluss kam, dass ein 10/10-Match zwar immer das Ziel für ein besseres Überleben darstellt, jedoch bei nicht möglichem 10/10 Match, ein Verhindern von HLA-DP-Non-permissivität indiziert ist. Auch Fleischhauer et al. konnten mit ihrer Studie eine verminderte Gesamtmortalität, erhöhte NRM und erhöhte aGvHD-Inzidenz bei non-permissiven Fällen im Vergleich zu den permissiven Fällen nachweisen. Betrachtet man nun die Ergebnisse unserer Kohorte kann dies nicht bestätigt werden. Bei Vernachlässigung des Matching-Status konnte kein Überlebensnachteil der nonpermissiven Transplantationen beobachtet werden. Es

konnte im Gegenteil sogar ein Vorteil der nonpermissiven GvH gegenüber der permissiven Fällen beschrieben werden. Bei 10/10 Fällen konnte diese Beobachtung in dieser Kohorte sogar signifikant bestätigt werden. Auch ein erhöhtes krankheitsfreies Überleben der GvH-non-permissiven gegenüber der permissiven und HvG-nonpermissiven Fälle konnte in dieser Subanalyse signifikant nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die Einteilung nach dem TCE3-Modell.

Ein Grund für die fehlenden Signifikanzen der Gruppe von Touseaud et al. könnte aufgrund der geringen Kohortenanzahl mit nur 141 untersuchten Transplantationen begründet sein. Die Diskrepanz unserer Ergebnisse zu den Ergebnissen von Pidala et al. könnte aufgrund der unterschiedlichen Kohorten-Auswahlkriterien bedingt sein. Während bei Pidala et al. bei 5428 (10/10) Transplantationspaaren, nur Patienten mit einer myeloablativen Konditionierung und ohne Lymphome als Grunderkrankung selektiert wurden, waren in unserer Kohorte Lymphome und Patienten mit Konditionierung reduzierter Intensität mit eingeschlossen. Bei Fleischhauer et al. unterscheiden sich die Patientenmerkmale und Kriterien ebenfalls im Vergleich zu unserer Kohorte. Während das mittlere Durchschnittsalter bei Fleischhauer um die 34 liegt sind in unserer Studie 70 % der Patienten über 40 Jahre alt. Darüber hinaus wurden in unserer Studie nur maligne hämatologische Grunderkrankungen eingeschlossen. Fleischhauer et al. untersuchte Transplantationen aller Grunderkrankungen. Des weiteren unterscheidet sich die Verteilung der Stammzellquelle innerhalb der Kohorte von Fleischhauer von unserer, in sofern, als dass in ihrer Kohorte 90 % der Stammzellen aus dem Knochenmark und 10% aus dem peripheren Blut bezogen wurden, bei unserer Kohorte jedoch 90 % der Stammzellen aus peripherem Blut und nur 10 % aus dem Knochenmark bezogen wurden.

4.5. Alter

4.5.1. Einfluss der HLA-DP Kompatibilität auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation in Abhängigkeit vom Patientenalter

Da eine kürzlich veröffentlichte Studie von D. Fuerst et al. [30] aus unserer Arbeitsgruppe das Altersrisiko einer Stammzelltransplantation mit dem Risiko von HLA-Kompatibilitäten in der Stammzelltransplantation verglich und dabei einen größeren Effekt der HLA-Inkompatibilität auf den Therapieerfolg vor allem bei Älteren (über 55-jährig) beschrieb, sollte nun auch der Einfluss auf den Therapieerfolg der HSCT abhängig von HLA-DP-Status der verschiedenen Altersgruppen analysiert werden.

In der Gesamtkohorte konnte hierbei kein signifikanter HLA-DP-induzierter Einfluss auf die HSCT-Endpunkte in Abhängigkeit vom Patientenalter beobachtet werden.

4.5.2. Einfluss der HLA-DP-Permissivitätseinteilung nach „T-Zell-Epitope-matching“ auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation eingeteilt in drei Altersklassen bei Transplantationen die für klassische HLA-Genorte kompatibel waren.

Bei Betrachtung der nach den beiden Permissivitätsmodellen (TCE3 und TCE4) eingeteilten 10/10 gematchten Transplantationen, fällt auf, dass die Patienten im mittleren Alter (>35 und <55 Jahre) eindeutige Ergebnisse bezüglich einzelner Endpunkte aufweisen. Es zeigten sich hier die für die Gesamtkohorte beschriebenen Ergebnisse vor allem bei Patienten mittleren Alters als signifikant. Da diese Ergebnisse sich weder bei unter 35 noch bei über 55 jährigen als signifikant

erweisen, könnte man spekulieren, dass vom TCE-Modell vor allem Patienten mittleren Alters profitieren würden. Die anderen Altersgruppen hatten zwar ähnliche Trends in den Kurvenverläufen, jedoch waren diese nicht signifikant.

Es zeigte sich bei den Patienten mittleren Alters ein besseres Gesamtüberleben der non-permissiven-GvH-Transplantationspaare gegenüber den permissiven Transplantationspaaren. Diese wiederum hatten ein besseres Gesamtüberleben gegenüber den non-permissiven HvG-Transplantationspaaren. Hierfür könnte es mehrere Erklärungen geben. Zum einen konnte, wie oben beschrieben, für die Gesamtkohorte eine tendenziell verminderte Rezidivinzidenz verzeichnet werden. Dies bestätigt sich bei den 36- bis 54-Jährigen indirekt durch ein signifikant verlängertes krankheitsfreies Überleben der non-permissiven gegenüber den permissiven Transplantationspaaren. Das kürzeste krankheitsfreie Überleben in der mittleren Altergruppe hatten die non-permissiven HvG Transplantationspaare. Bezüglich der GvHD lassen sich hier keine Signifikanzen zeigen, was vermutlich den fehlenden Informationen bezüglich des GvHD-Status zu schulden ist. Dennoch lässt sich wie erwartet eine tendenziell höheren cGvHD-Inzidenz und aber auch aGvHD-Inzidenz bei älteren Patienten (> 55 Jahre) zeigen.

Warum die HvG non-permissiven Fälle jedoch so ein geringes Gesamtüberleben und eine so signifikant hohe TRM und NRM aufweisen, könnte man durch das vermehrte Auftreten von Transplantatabstoßungen erklären, da hier die Reaktion vom Patienten gegen den Spender gerichtet ist (Host versus Graft). Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch nach der TCE4 Einteilung reproduzieren. Soweit bekannt, wurde die TCE3- und TCE4-Permissivitätseinteilung noch nicht von anderen Studiengruppen abhängig vom Alter betrachtet. Weshalb zur Bestätigung dieser Ergebnisse noch weitere Studien diesbezüglichen durchgeführt werden sollten.

Interessanterweise fällt auf, dass der Kurvenverlauf bezüglich der cGvHD deutlicher in der älteren Patientengruppe wird. Bei Patienten höheren Alters tritt bei non-permissiven GvH Transplantationen vermehrt eine chronische GvHD auf als bei non-permissive HvG Transplantationen. Die geringste Inzidenz einer cGvHD war bei permissiven Transplantationen zu vermerken. Dies lässt sich jedoch nicht statistisch stratifizieren, was womöglich der geringen GvHD-Status Information zu schulden ist.

Bei jüngeren Patienten lässt sich dies jedoch nicht eindeutig zeigen. Hier wiederum lässt sich eine tendenziell erhöhte Rezidivinzidenz der permissiven Tx-Paare gegenüber den non-permissiven zeigen.

Letztere Beobachtungen könnten trotz Fehlen der Signifikanzen in Richtung der Ergebnisse von D. Fuerst gehen [30]. Er zeigte, dass HLA-Inkompatibilitäten vor allem eine Rolle bei älteren Patienten spielen, wenn man die klassischen Loci als Kriterium nimmt. Dieser Effekt scheint sich bei HLA-DP-Inkompatibilitäten tendenzweise fortzusetzen.

4.6. Einfluss des HLA-DP-Kompatibilitätstatus auf den Therapieerfolg der allogene Stammzelltransplantation, abhängig vom CMV-Serostatus

Neben der GvHD und dem Rezidiv stellt die Infektion, vor allem mit CMV, eine der häufigsten Komplikationen der HSCT dar [21]. Da Cytomegalie-Viren in hämatopoetischen Zellen latent persistieren können, und unter anderem das HLA-DP-Molekül, Partikel des CMV-Virus präsentieren [95], sollte nun in dieser Kohorte analysiert werden, ob der CMV-Serostatus von Spender und Empfänger einen Einfluss auf den Therapieerfolg der HSCT hat.

Einfluss des CMV-Seromatchings auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT

Ljungman et al. beschrieben, dass bei gleichem CMV-Serostatus des Patienten und Spenders, der Patient ein besseres Überleben aufwies als wenn Patient und Spender einen unterschiedlichen CMV-Serostatus hatten [47]. Wie dem Ergebnisteil zu entnehmen ist, trifft dies auch für unsere Kohorte zu. Auch die TRM und NRM waren vorteilhafter bei CMV-Serostatus-gematchten Patienten. Anders als bei Ljungman et al, konnte der Effekt des besseren Gesamtüberlebens der CMV-Serostatus gematchten Patienten, hier auch in der gesamten Kohorte und nicht nur bei den Patienten mit myeloablativen Konditionierung gezeigt werden.

Allgemeiner Einfluss des Patienten- und Spender-CMV-Serostatus auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation

In unserer Studie konnten wir beobachten, dass Transplantationen mit CMV-seropositiven Spendern im Vergleich zu Transplantationen mit CMV-seronegativen Spendern mit einer erhöhten Inzidenz von TRM und aGvHD assoziiert sind.

Ein Grund für die beobachtete höhere TRM und die dazu passende erhöhte akute GvHD könnte eine Hochregulation der HLA-DP-Moleküle auf der Oberfläche der Antigenpräsentierenden Zellen sein, die durch einen positiven CMV-Serostatus ausgelöst wird, wie es die Studie von Stevanovic et al, Blood 2013 bereits beschreibt [81]. Stevanovic et al. beschreiben jedoch, dass nicht nur der CMV-Status hierbei eine Rolle spielt, sondern auch der HLA-DP-Kompatibilitätsgrad zwischen Spender und Empfänger. In seiner Studie wird ein hochregulierender Effekt einer CMV-Infektion auf die HLA-DP-Expression bei DP-inkompatiblen Transplantationen beschrieben. Ferner führen Stevanovic et al. [81] auf, dass durch die Hochregulation der HLA-DP-Moleküle eine größere Angriffsfläche bei HLA-DP Inkompatibilität entsteht und somit eine cGVHD häufiger stattfinden kann. In unserer Kohorte konnten diese Ergebnisse zwar nicht signifikant bestätigt werden, allerdings weisen die Ergebnisse eindeutig auf diese Theorie hin, da bei CMV-seronegativen Spendern, die HLA-DP-inkompatiblen Fälle seltener eine cGVHD erleiden, als die HLA-DP-kompatiblen Fälle. Bei CMV-Seropositiven Spendern zeigte sich der gegenteilige Effekt. Hier konnten bei den HLA-DP-inkompatiblen Fällen höhere cGVHD-Inzidenzen vermerkt werden, als bei den HLA-DP-kompatiblen Fällen. Wie zuvor auch an einer anderen Stelle erwähnt, könnte die fehlende Signifikanz trotz eindeutiger Tendenz auf die ungleiche Verteilung der DP-Kompatibilitäten zu Gunsten der DP-inkompatiblen Fälle (knapp 90 %) zurückgeführt werden.

Einfluss der HLA-DP-Kompatibilität in Abhängigkeit des CMV-Serostatus des Spender auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation

Angesichts der Theorie von Stevanovic et al. wurde der Effekt der HLA-Kompatibilität abhängig von CMV-Serostatus des Spenders auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT auch für unsere Kohorte untersucht. Hierbei konnte zunächst festgestellt

werden, dass sich die Transplantationsergebnisse von CMV-seropositiven und CMV-seronegativen Spendern bezüglich der Rezidivinzidenz, cGvHD und NRM widersprüchlich verhielten. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant trotz der eindeutigen Tendenzen die in den Abbildungen zu erkennen sind. Signifikant jedoch konnte aufgezeigt werden, dass Transplantationen mit CMV-seronegativen Spendern eine erhöhte Rezidivinzidenz aufwiesen wenn sie HLA-DP kompatibel waren. Bei Transplantationen von CMV-seropositiven Spendern war diese Beobachtung invers, d.h. die Rezidivinzidenz war höher bei den HLA-DP-inkompatiblen Fällen als den HLA-DP kompatiblen. Bisher konnte diese Beobachtung in keinen weiteren Literaturen wiedergefunden werden und sollte deshalb in weiteren großen multizentrischen Studien bestätigt werden.

Eine verminderte Rezidivinzidenz bei CMV-Infektion konnte auch von Ahmet et al. [22] beschrieben werden, der diesen Effekt jedoch nur bei AML-Patienten analysierte und dies unabhängig des HLA-DP-Kompatibilitätsstatus beobachtete.

Eine Theorie warum es zu der verminderten Rezidivinzidenz bei CMV-positivem, DP-kompatiblen Spender kommen könnte, wäre ein Vorhandensein von alloreaktiven T-Lymphozyten, welche auf die kompatiblen viruspräsentierenden HLA-Moleküle stärker reagieren. Auf diese Weise könnten die restlichen malignen Zellen des Empfängers im Sinne eines GVL-Effekts abgetötet werden. Diese angenommenen Mechanismen müssten allerdings erst durch funktionelle Studien analysiert und bestätigt werden.

Bei Selektion der 10/10 gemachten Patienten für die Analyse der oben beschriebenen Ergebnisse zeigen sich keine relevanten Unterschiede.

Interaktion des HLA-DP-Permissivitätsstatus und dem CMV-Serostatus des Spenders und dessen Einfluss auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT bei Transplantationen, die für klassische HLA Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) kompatibel waren

Es war naheliegend, dass die beobachtete Interaktion zwischen HLA-DP-Kompatibilität und CMV-Serostatus auch im Hinblick auf den TCE-Algorithmus überprüft werden sollte. Der Umkehreffekt bei CMV-positivem Spender, abhängig vom HLA-DP-Kompatibilitätsstatus, konnte bei Einteilung nach den TCE-Modellen nicht mehr nachgewiesen werden. Jedoch wird anhand der Kurvenverläufe deutlich, dass bei CMV-seropositiven, non-permissiven Spender eine erhöhte TRM und NRM beobachtet werden kann.

Der oben beschriebene „inverse Effekt“ durch den CMV-Status des Spenders präsentiert sich bei Einteilung der HLA-DP-Kompatibilität nach den TCE-Modellen eher ungenauer, als es unter der Beobachtung der klassischen HLA-DP-Kompatibilität der Fall war.

4.7. Einfluss der HLA-DP-Expression auf den Therapieerfolg der allogenen Stammzelltransplantation

Petersdorf et al [65] beschrieb 2012 das Vorhandensein von Short Nucleotide Polymorphismen (SNP) des HLA-DP-Genabschnitts, die die Expressionsrate des HLA-DP-Moleküls regulieren. Rs9277534A steht hierbei für eine niedrige und rs9277534G für eine hohe HLA-DP-Expression. Unter Berücksichtigung des Matching Status für die klassischen HLA-Merkmale (HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ) und das Vorhandensein eines einzelnen HLA-DP-Mismatch, untersuchte die Studiengruppe von Peterdsorf den Einfluss der HLA-DP-Expression auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT bei Patienten ohne Lymphome als Grunderkrankung.

Sie beobachtete hierbei ein signifikant erhöhtes Risiko einer akuten GvHD, wenn der Spender ein rs9277534A HLA-DP (=niedrige Expression) trug und der Patient ein rs9277534G HLA-DP (hohe Expression) [65].

Um diese Beobachtung in unserer Kohorte zu reproduzieren, analysierten wir ebenfalls die 10/10 gematchten Transplantationen unserer Kohorte, bei denen einzelne HLA-DP-Mismatches vorlagen. In der Gruppe der Transplantationen bei denen der HLA-DP-inkompatible Spender zur niedrigen Expressionsgruppe gehörte (A), konnten wir feststellen, dass Patienten mit ebenfalls niedrig exprimiertem inkompatiblem HLA-DP-Allel, ein signifikantes Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit hochexprimierten HLA-DP-mismatch hatten. Gleiche Tendenz gilt für das krankheitsfreie Überleben. Eine niedrige Expression von HLA-DP bei Spendern und Empfängern ist also tendenziell mit einem besseren Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben assoziiert. Peterdsorf et al. gingen in ihrer Studie nur auf die aGvHD und NRM ein, weshalb bezüglich des Gesamtüberlebens und des krankheitsfreien Überlebens kein direkter Vergleich gezogen werden kann.

Betrachtet man nun die Inzidenz für eine akute GvHD, ist unser Ergebnis zwar nicht signifikant, aber auch hier gibt es einen klaren Trend, dass die Kombination aus Spender mit A (niedrigexprimiert) und Patienten mit G (hochexprimiert) eine erhöhte akute GVHD-Inzidenz aufweist, als eine Kombination aus HLA-DP-niedrigexprimierendem Spender und Patienten. Grund für die fehlende Signifikanz kann die geringe Kenntnis über den aGvHD Status der Patienten sein. Dennoch steht der Kurventrend im Einklang mit den Ergebnissen von E. Petersdorf.

Darüberhinaus sprechen die erhöhten TRM und NRM bei der Kombination aus A-Spender und G-Patient, im Vergleich zuder Kombination A-Spender und A-Patient, ebenfalls für die Hypothese von Petersdorf et al. Hierbei erreicht das Ergebnis der TRM nicht ganz das Signifikanzniveau, jedoch weist es auf eine eindeutige Tendenz hin. Die NRM jedoch, ist wie bei Petersdorf statistisch signifikant.

In der Kohorte von E. Peterdorf wurden die Analysen auf Patienten mit hämatologische Erkrankungen ohne Lymphome durchgeführt. Werden die Analysen auf ein ähnlichen Krankheitskollektiv, wie das von Petersdorf eingeschränkt, so sind die Ergebnisse bezüglich der NRM zwar tendenziell noch wie in der Kohorte mit Lymphomen aber nicht mehr signifikant. Vermutlich ist dies auf die geringeren Fallzahlen durch das Auslassen der Lymphome zurückzuführen, denn die Tendenzen der Kurven sind eindeutig. Interessanterweise zeigt sich eine vermehrte chronische GvHD-Inzidenz und eine verminderte Rezidivinzidenz bei der Kombination aus Spender-A und Patient-A, was der Hypothese von Peterdorf et al. widersprechen

würde. Eine Untersuchung dieser Aspekte in einer größeren Kohorte wäre sicherlich sinnvoll.

In einer weiteren Analyse wurde die Transplantationen mit HLA-DP-hochexprimierten, -inkompatiblen Spendern (Spender-G) betrachtet.

Entgegen der Ergebnisse von Petersdorf die eine erhöhte aGvHD-Inzidenz bei der Kombination aus Spender-A und Patient-G im Vergleich zu allen anderen Kombination (G+A, G+G, A+A) beschrieb, konnte in unserer Kohorte eine signifikant erhöhte aGvHD-Inzidenz bei der Kombination aus Spender-G und Patient-A vermerkt werden. Widersprüchlicherweise zeigte sich im Kurvenverlauf eine erhöhte chronische GvHD-Inzidenz bei der Kombination aus Spender-G und Empfänger-G im Vergleich zu der Kombination aus Spender-G und Empfänger-A. Auch die TRM und NRM waren eindeutig höher, wenn Spender und Empfänger beide HLA-DP hochexprimiert waren. Jedoch konnte auch dies nur im Kurvenverlauf gezeigt und nicht signifikant belegt werden. Die Rezidivinzidenz zeigte sich ebenfalls höher bei der Kombination aus Spender-G und Patient-A als bei der Kombination aus Spender-G und Patient-G. Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben zeigten hier keinen Vorteil der einen gegenüber der anderen Gruppe. Die Widersprüchlichkeit dieses Ergebnisses könnte aufgrund der niedrigen Fallzahlen entstanden sein. Außerdem spielen die fehlenden Daten des GvHD-Status vieler Patienten aus dieser Kohorte sicherlich auch einen Einfluss auf die demonstrierten Ergebnisse.

Schließt man nun die Patienten aus, die unter Lymphomen litten, sinkt der p-Wert unter die Signifikanzgrenze, dennoch mit weiterhin verbleibendem eindeutigem Kurvenverlauf, ähnlich wie dies bei der Analyse von niedrig exprimierenden Spendern der Fall war.

4.8. Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigte sich bei 10/10 kompatiblen hämatopoetischen Stammzelltransplantationen ein verlängertes krankheitsfreies Überleben der HLA-DP inkompatiblen gegenüber der kompatiblen Transplantationen. Bei der Überprüfung des Permissivitätsalgorithmus nach Fleischhauer (TCE3/4) konnte ein verlängertes Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben der GvH non-permissiven

Transplantationen gegenüber den HvG non-permissiven und permissiven Transplantationen beobachtet werden. Diese Ergebnisse waren bei Patienten der Altersgruppe 35-55 Jahre am ausgeprägtesten. Bei der Analyse der Interaktion zwischen CMV-Serostatus und HLA-DP-Kompatibilität zeigte sich ein Vorteil bezüglich der Rezidivinzidenz der CMV-seropositiven, HLA-DP-kompatiblen Spendern gegenüber den CMV seronegativen, HLA-DP kompatibel Spendern. In der Analyse des Einflusses der Expressionsstärke der inkompatiblen HLA-DP-Merkmale des Patienten und des Spenders (nach Petersdorf) zeigten sich folgende Ergebnisse: Spender (A=niedrigexprimiert) / Patienten(A): verlängertes Gesamtüberleben, Spender (A)/Patient (G=hochexprimiert): erhöhte redivfreie Mortalität Spender(G)/Patient (A) höhere Inzidenz einer akute GvHD.

Aus den genannten Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen schließen: Die isolierte Betrachtung des HLA-DP-Kompatibilitätsstatus auf den Therapieerfolg weist einen geringeren Effekt auf, als es durch die Einteilung der Permissivitätsmodelle der Fall ist. Hierbei sollten jeweils die Spender gewählt werden, die ein GVH non-permissives HLA-DP-Mismatch aufweisen. Vorzugsweise sollten bei Auswahl dieser Kriterien die Patienten im Alter zwischen 35 und 55 Jahre sein. Fügt man jedoch den Aspekt des CMV Serostatus zur HLA-DP-Analyse hinzu lässt sich vermuten, dass unter den **CMV-serpositiven** Spendern die **HLA-DP-kompatiblen** bevorzugt werden sollten und dass **CMV-seronegative, HLA-DP-kompatible** Spender vermieden werden sollten. Des Weiteren sollten mit Einbeziehung der Expressionstärke im Falle eines singulären HLA-DP-Mismatch, jeweils gleiche Expressionstärken zwischen Spender und Empfänger gewählt werden, in sofern als dass Spender mit hochexprimiertem HLA-DP mismatch nur bei ebenfalls hochexprimierten Patienten gewählt werden sollen und das Spender mit niedrigexprimiertem HLA-DP-Mismatch nur bei ebenfalls niedrigexprimierten Patienten gewählt werden sollen. Um diese Theorien zu bestätigen sollten jedoch noch weitere Studien diesbezüglich durchgeführt werden, die zum Beispiel bezüglich des CMV Serostatus auch funktionelle Tests beinhalten.

5. Zusammenfassung

In den letzten 10 Jahren stieg die Zahl der allogenen, hämatopoetischen Stammzelltransplantationen (HSCT) kontinuierlich an. Zu verdanken ist dies den vielen erfolgreichen Studien in diesem Bereich, welche die Bedingungen und die Ergebnisse einer Stammzelltransplantation verbesserten und diese auch für ältere Patienten möglich machten. Trotzdem sind die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: Graft versus host disease, GvHD), das Rezidiv der Grunderkrankung sowie die Infektionen die wichtigsten Komplikationen einer HSCT, die das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben beeinflussen. Eine Kompatibilität der klassischen HLA-Merkmale (HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ; =10/10 match) ist der wichtigste Parameter, der die GvHD-Inzidenz vermindert und das Gesamtüberleben verlängert. Die Rolle der Kompatibilität für das Humane Leukozyten Antigen (HLA)-DP-Molekül auf den Therapieerfolg einer allogenen HSCT ist jedoch noch nicht schlüssig geklärt. Neben dem klassischen Match/Mismatch-Modell sind in den vergangenen Jahren weitere Kompatibilitätsalgorithmen für das HLA-DP beschrieben worden, die zum einen die Permissivität einer Inkompatibilität oder die Expression des inkompatiblen Allels in Betracht ziehen.

Ziel dieser Arbeit war es, nicht nur die Rolle der „klassischen“ HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation einer großen deutschen Kohorte zu analysieren, sondern auch diese zusätzlichen Kompatibilitätsalgorithmen in unserer Kohorte zu überprüfen.

Da neben Geschlecht und Alter auch der Cytomegalievirus (CMV) Serostatus einer der wichtigsten Aspekte der Spenderauswahl ist, wurde zudem die Interaktion zwischen CMV-Serostatus und HLA-DP-Kompatibilität des Spenders auf ihren Einfluss auf den Therapieerfolg der allogenen HSCT untersucht.

Hierfür wurden mittels zweier verschiedener „Next Generation Sequencing“-Verfahren 1831 Transplantationspaare hochauflösend für HLA-DP typisiert.

Als statistische Endpunkte wurden jeweils Gesamtüberleben (OS), Rezidivinzidenz (RI), Inzidenz einer akuten sowie chronischen Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: Graft versus Host disease, GvHD) die transplantationsassoziierte Mortalität

(TRM), rezidivfreie Mortalität (NRM) und schließlich das krankheitsfreie Überleben (DFS) gewählt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf einen geringeren Einfluss der klassischen HLA-DP-Kompatibilität auf den Therapieerfolg hin, als dies bei Berücksichtigung der Permissivitätsmodelle eingeteilt nach der Reaktion der T-Zell Epitopen (TCE3/4) der Fall ist. Hierbei ergibt sich ein Vorteil für Transplantationen mit einem Spender mit GvH-non-permissiven HLA-DP-Mismatch. Darüber hinaus postulieren unsere Ergebnisse, dass für geringere Rezdivereignisse unter den **CMV-seropositiven** Spendern, diejenigen bevorzugt werden sollten, die **HLA-DP-kompatibel** sind und dass **CMV-seronegative, HLA-DP-kompatible** Spender, vermieden werden sollten. Des Weiteren lassen unsere Analysen bezüglich der Expressionsstärke der inkompatiblen HLA-DP Merkmale den Schluss zu, dass bei HLA-DP inkompatiblen Transplantationen das inkompatible HLA-DP-Merkmal bei Spender und Empfänger gleichermaßen entweder hoch- oder niedrigexprimiert sein sollte.

Da unsere Arbeit eine multizentrische Studie war und da der Erfolg der Transplantation von vielen weiteren Faktoren abhängig ist, sollen unsere Ergebnisse in weiteren unabhängigen Kohorten analysiert und bestätigt werden, bevor sie unter Umständen eine klinische Anwendung finden. Die Testung einer Bestätigungskohorte mit Transplantationen aus dem Jahre 2010-2014 ist bereits in Planung.

Literaturverzeichnis

- [1] Antón LC, Snyder HL, Bennink JR, Vinitsky A, Orłowski M, Porgador A, Yewdell JW: Dissociation of proteasomal degradation of viral proteins from generation of MHC class I-associated antigenic biosynthesized peptides. *J Immunol* 160: 4859-4868 (1998)
- [2] Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, Barrett J, Blaise D, Lowski R, Horowitz M: Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 1628-1633 (2009)
- [3] Bacigalupo A, Sormani MP, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Bregante S, Raiola AM, di Grazia C, Dominiotto A, Tedone E, Piaggio G, Podesta M, Bruno B, Oneto R, Lombardi A, Frassoni F, Rolla D, Rollandi G, Viscoli C, Ferro C, Garbarino L, Van Lint MT: Reducing transplant-related mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 89: 1238-1247 (2004)
- [4] Bakke O, Dobberstein B: MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63: 707-716 (1990)
- [5] Barrett AJ, Battiwalla M: Relapse after allogeneic stem cell transplantation: *Expert Rev Hematol*. 3: 429-441 (2010)
- [6] Beelen DW, Mytilineos J: Deutsches Register für Stammzelltransplantation: DRST Jahresbericht: URL: <http://www.drst.de/download/jb2015.pdf> Zugriffsdatum: 27.04.2017
- [7] Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers ME, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Appelbaum FR: Transplantation of bone marrow as compared with peripheral blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 344: 175-181 (2001)
- [8] Bergholtz BO, Thorsby E: Macrophage-dependent response of immune human T lymphocytes to PPD in vitro. Influence of HLA-D histocompatibility. *Scand J Immunol* 6: 779-786 (1977)

- [9] Bettens F, Passweg J, Schanz U, Chalandon Y, Heim D, Gŷngšr T, Stussi G, Nicoloso G, Baldomero H, Gratwohl A, Tiercy JM: Impact of HLA-DPB1 Haplotypes on Outcome of 10/10 Matched Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Transplants Depends on MHC-Linked Microsatellite Polymorphisms. *Biol Blood Marrow Transplant*. 18 608-616 (2012)
- [10] Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: The foreign antigen binding site and T cell recognition regionsof class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518 (1987)
- [11] Busch R, Cloutier I, S kaly RP, HŠmmerling GJ: Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 15: 418-428 (1996)
- [12] Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, Leblond V, Ifrah N, Jouet J-P, Loberiza F, Ringden O, Barrett AJ, Horowitz MM, Soci  G: Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Soci t  Fran aise de Greffe de Mo lle et Th rapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 106: 1495–1500 (2005)
- [13] Carlens S, Ringd n O, Remberger M, L nnqvist B, H gglund H, Klaesson S, Mattsson J, Svahn BM, Winiarski J, Ljungman P, Aschan J: Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant* 22: 755–761 (1998)
- [14] Crivello P, Zito L, Sizzano F, Zino E, Maiers M, Mulder A, Toffalori C, Naldini L, Ciceri F, Vago L, Fleischhauer K: The Impact of Amino Acid Variability on Alloreactivity defines a Functional Distance Predictive of Permissive HLA-DPB1 Mismatches in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 21: 233-241 (2015)
- [15] Crocchiolo R, Zino E, Vago L, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, Sacchi N, Sormani MP, Marcon J, Lamparelli T, Fanin R, Garbarino L, Miotti V, Bandini G, Bosi A, Ciceri F, Bacigalupo A, Fleischhauer K; Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo, Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE) e Terapia Cellulare; Italian Bone Marrow Donor Registry: Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a

- significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 114: 1437-1444 (2009)
- [16] Cunningham BA: Structure and significance of beta2-microglobulin. *Fed Proc* 35: 1171-1176 (1976)
- [17] De Elvira CR: Med-AB forms manual: A guide to the completion of the EBMT HSCT Med-AB forms. URL: <http://www.ebmt.org/Contents/Data-Management/Registrystructure/MED-ABdatacollectionforms/Documents/MED-ABFormsManual.pdf> Zugriffsdatum: 01.02.2017.
- [18] Doherty PC, Zinkernagel RM: T-cell-mediated immunopathology in viral infections. *Transplant Rev* 19: 89-120 (1974)
- [19] Dvorak CC, Cowan MJ: Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency disease. *Bone Marrow Transplant* 41: 119-126 (2008)
- [20] Eapen M, Rocha V: Principles and analysis of hematopoietic stem cell transplantation outcomes: the physician's perspective.: *Lifetime Data Anal* 14: 379-388 (2008)
- [21] Einsele H, Bertz H, Beyer J, Kiehl MG, Runde V, Kolb HJ, Holler E, Beck R, Schwerdfeger R, Schumacher U, Hebart H, Martin H, Kienast J, Ullmann AJ, Maschmeyer G, Krueger W, Link H, Schmidt CA, Oettle H, Klingebiel T, Arbeitsgemeinschaft Infektionen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: [Epidemiology and interventional treatment strategies of infectious complications after allogeneic stem-cell transplantation]. *Dtsch Med Wochenschr* 126: 1278-1284 (2001)
- [22] Elmaagacli AH, Steckel NK, Koldehoff M, Hegerfeldt Y, Trenscher R, Ditschkowski M, Christoph S, Gromke T, Kordelas L, Ottinger HD, Ross RS, Horn PA, Schnittger S, Beelen DW: Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 118: 1402-1412 (2011)
- [23] European Group for Blood and Marrow Transplantation: EBMT Promise datenbank: URL: <https://www.ebmt.org/Contents/Data->

Management/Registrystructure/DatamanagementsystemProMise/Pages/Data-management-system-ProMise.aspx Zugriffsdatum: Mai 2013

- [24] Fine JP, Gray RJ: A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *JASA* 94: 496–509 (1999)
- [25] Fleischhauer K, Fernandez-Vi-a MA, Wang T, Haagenson M, Battiwalla M, Baxter-Lowe LA, Ciceri F, Dehn J, Gajewski J, Hale GA, Heemskerk MB, Marino SR, McCarthy PL, Miklos D, Oudshoorn M, Pollack MS, Reddy V, Senitzer D, Shaw BE, Waller EK, Lee SJ, Spellman SR: Risk associations between HLA-DPB1 T-cell epitope matching and outcome of unrelated hematopoietic cell transplantation are independent of HLA-DPA1. *Bone Marrow Transplantation* 49: 1176-1183 (2014)
- [26] Fleischhauer K, Locatelli F, Zecca M, Orofino MG, Giardini C, De Stefano P, Pession A, Iannone AM, Carcassi C, Zino E, La Nasa G: Graft rejection after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia is associated with nonpermissive HLA-DPB1 disparity in host-versus-graft direction *Blood* 107: 2984-2992 (2006)
- [27] Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon J-D, Dubois V, Horowitz MM, Madrigal JA, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, Spellman S, Velardi A, Zino E, Petersdorf EW: Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 13: 366-374 (2012)
- [29] Fuerst D, Mueller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K, Mytilineos J: High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood* 122: 3220-3229 (2013)
- [30] Fürst D, Niederwieser D, Bunjes D, Wagner E, Gramatzki M, Wulf G, Mÿller CR, Neuchel C, Tsamadou C, Schrezenmeier H, Mytilineos J: Increased age-associated mortality Risk in HLA-mismatched hematopoietic Stem Cell Transplantation: *Haematologica* 102: 796-803 (2017)

- [31] Gallardo D, Brunet S, Torres A, Alonso-Nieto M, Vallejo C, Jimenez A, Gonzalez M, Sanz G, Serrano D, Espigado I, Osorio S, Carreras E, Marti'n C, Sanz-Rodr'guez C, Sierra J, Zuazu J, Gonz'lez-Escribano MF, Gonz'lez JR, Rom'ñ J, De Oteyza JP, De La C'mara R: HLA-DPB1 mismatch in HLA-A-B-DRB1 identical sibling donor stem cell transplantation and acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 77, 1107-1110 (2004)
- [32] Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van Rood JJ: Y-antigen killing by T cells of women is restricted by HLA. *Nature* 266: 544-545 (1977)
- [33] Gratwohl A, Baldomero H, Sureda A: The EBMT Handbook - Haematopoietic Stem Cell Transplantation. URL: <http://ebmtonline.forumservice.net/> Zugriffsdatum: 25.04.2017
- [34] Gratwohl A, Baldomero H: Trends of hematopoietic stem cell transplantation in the third millennium. *Curr Opin Hematol* 16: 420-426 (2009)
- [35] Gratwohl A, Stern M, Brand R, Apperley J, Baldomero H, de Witte T, Dini G, Rocha V, Passweg J, Sureda A, Tichelli A, Niederwieser D, European Group for Blood and Marrow Transplantation and the European Leukemia Net: Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Cancer* 115: 4715-4726 (2009)
- [36] Gray B: cmprsk: Subdistribution Analysis of Competing Risks ((2013)), r package version 2.2-6
- [37] Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, Appelbaum F, Chauncey TR, Clift RA, Petersdorf EW, Radich J, Sanders JE, Storb RF, Sullivan KM, Anasetti C: Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 338: 962-968 (1998)
- [38] Harding CV, Geuze HJ: Antigen processing and intracellular traffic of antigens and MHC molecules. *Curr Opin Cell Biol* 5: 596-605 (1993)
- [39] HLA Nomenclature: URL: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html> Zugriffsdatum 30.04.2017
- [40] Hołowiecki J: Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol Arch Med Wewn* 118: 658-663 (2008)

- [41] Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdžn O, Rozman C, Speck B: Graft-versusleukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555-562 (1990)
- [42] Jan K, Akie S: The HLA-System. *N Engl J Med* 343: 702-709 (2000)
- [43] Jenq RR, van den Brink MR: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 213-221 (2010)
- [44] Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Kato S, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y:HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. *Blood* 113, 2851-2858 (2009)
- [45] Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, Hegland J, Kamani N, Kernan NA, King R, Ratanatharathorn V, Weisdorf D, Confer DL: Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 98: 2043-2051 (2001)
- [46] Labopin SM, Iacobelli S: Statistical guidelines for EBMT: URL: http://portal.ebmt.org/sites/clint2/clint/Documents/StatGuidelines_oct2003.pdf Zugriffsdatum: Februar 2017
- [47] Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C: Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis.: *Blood* 102: 4255-4260 (2003)
- [48] Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, Gebuhrer L, Dubois V, Jollet I, Bois M, Perrier P, Masson D, Moine A, Absi L, Reviron D, Lepage V, Tamouza R, Toubert A, Marry E, Chir Z, Jouet JP, Blaise D, Charron D, Raffoux C: HLA Association with Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome: The Number of Mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 Is Strongly Associated with Overall Survival. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13: 965-974 (2007)

- [49] Loiseau P, Esperou H, Busson M, Sghiri R, Tamouza R, Hilarius M, Raffoux C, Devergie A, Ribaud P, Socie G, Gluckman E, Charron D: DPB1 disparities contribute to severe GVHD and reduced patient survival after unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 30: 497-502 (2002)
- [50] Ludajic K, Balavarca Y, Bickešller H, Pohlreich D, Kouba M, Dobrovolna M, Vrana M, Rosenmayr A, Fischer GF, Fae I, Kalhs P, Greinix HT: Impact of HLA-DPB1 allelic and single amino acid mismatches on HSCT. *Br J Haematol.* 142: 436-443 (2008)
- [51] Madden DR: The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 13: 587-622 (1995)
- [52] Marsh SGE: The Organization of HLA Genes Within the HLA Complex. In: Marsh SGE, Parham P, Barber L (Hrsg.): *The HLA Factsbook*. Bd. 1, 1. Aufl., Academic Press, Waltham, S. 7-13 (1999)
- [53] McGlave PB, Shu XO, Wen W, Anasetti C, Nademanee A, Champlin R, Antin JH, Kernan NA, King R, Weisdorf DJ: Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: 9 years' experience of the national marrow donor program. *Blood* 95: 2219-2225 (2000)
- [54] Monaco JJ: A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol Today* 13: 173-179 (1992)
- [55] Müller CR, Mytilineos J, Ottinger H, Arnold R, Bader P, Beelen D, Bornhäuser M, Dreger P, Eiermann T, Einsele H, Faé I, Fischer G, Füssel M, Holler E, Holzberger G, Horn PA, Kröger N, Lindemann M, Seidl C, Spriewald B, Süsal C, Blasczyk R, Finke J: Deutsche Arbeitsgemeinschaft fu_r Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V.: Deutscher Konsensus 2013 zur immungenetischen Spenderauswahl fu_r die allogene Stammzelltransplantation: URL: <https://www.dagkbt.de/files/downloads/KonsensusSpenderauswahl2013.pdf> Zugriffsdatum: 26.04.2017
- [56] Mytilineos J, Deufel A, Opelz G.: Clinical relevance of HLA-DPB locus matching for cadaver kidney retransplants: a report of the Collaborative Transplant Study. *Transplantation* 63:1351-1354 (1997)

- [57] Nagler A: HLA-DP1 matching are we there yet? *Blood* 124: 2476-2347 (2014)
- [58] Neefjes J, Jongasma MLM, Paul P, Bakke O: Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11: 823-836 (2011)
- [59] Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, Petersdorf E, Hegenbart U, Sandmaier BM, Maloney DG, Storer B, Lange T, Chauncey T, Deininger M, Pönisch W, Anasetti C, Woolfrey A, Little MT, Blume KG, McSweeney PA, Storb RF: Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood* 101: 1620–1629 (2003)
- [60] Oehler VG, Radich JP, Storer B, Blume KG, Chauncey T, Clift R, Snyder DS, Forman SJ, Flowers MED, Martin P, Guthrie KA, Negrin RS, Appelbaum FR, Bensinger W: Randomized trial of allogeneic related bone marrow transplantation versus peripheral blood stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 85–92 (2005)
- [61] Olsson R, Remberger M, Schaffer M, Berggren DM, Svahn B-M, Mattsson J, Ringden O: Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 48: 537-543 (2013)
- [63] Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Duarte RF, Dufour C, Gennery A, Kroger N, Kuball J, Lanza F, Montoto S, Nagler A, Snowden JA, Styczynski J, Mohty M: Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: The 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant* 52: 811-817 (2017)
- [64] Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Smith A, Mickelson E, Hansen JA: The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 112: 988-994 (2001)

- [65] Petersdorf EW, Malkki M, O'hUigin C, Ph.D., Carrington M, Gooley T, Haagenson MD, Horowitz MM, Spellman SR, Wang T, Stevenson P: High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* 373: 599-609 (2015)
- [66] Petersdorf EW, Malkki M: Human leukocyte antigen matching in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Semin Hematol.* 42: 76-84 (2005)
- [67] Petersdorf EW, Smith AG, Mickelson EM, Longton GM, Anasetti C, Choo SY, Martin PJ, Hansen JA: The role of HLA-DPB1 disparity in the development of acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 81: 1923-1932 (1993)
- [68] Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang HL, Aljurf M, Askar M, Dehn J, Fernandez Vi-a M, Gratwohl A, Gupta V, Hanna R, Horowitz MM, Hurley CK, Inamoto Y, Kassim AA, Nishihori T, Mueller C, Oudshoorn M, Petersdorf EW, Prasad V, Robinson J, Saber W, Schultz KR, Shaw B, Storek J, Wood WA, Woolfrey AE, Anasetti C: Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 124: 2596-2606 (2014)
- [69] Rabusin M, Andolina M, Maximova N, EBMT Paediatric, Autoimmune Disease Working Parties: Haematopoietic SCT in autoimmune diseases in children: rationale and new perspectives. *Bone Marrow Transplant* 41: S96-S99 (2008)
- [70] Rammensee HG, Falk K, Rätzschke O: Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11: 213-244 (1993)
- [71] Riese RJ, Wolf PR, Bršmme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA: Essential role for cathepsin S in MHC class II associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4: 357-366 (1996)
- [72] Ringdén O, Pavletic SZ, Anasetti C, Barrett AJ, Wang T, Wang D, Antin JH, Di Bartolomeo P, Bolwell BJ, Bredeson C, Cairo MS, Gale RP, Gupta V, Hahn T, Hale GA, Halter J, Jagasia M, Litzow MR, Locatelli F, Marks DI, McCarthy PL, Cowan MJ, Petersdorf EW, Russell JA, Schiller GJ, Schouten H, Spellman S, Verdonck LF, Wingard JR, Horowitz MM, Arora M: The graft-versus-leukemia effect using matched unrelated donors is not superior to HLA-identical siblings for hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 113: 3110-3118 (2009)

- [73] Robert Koch Institut: RKI-Ratgeber für Ärzte: Cytomegalie-Infektion URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html#doc4738494bodyText3 Zugriffsdatum: 29.04.2017
- [74] Shackelford DA, Kaufman JF, Korman AJ, Strominger JL: HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene cloning and function. *Immunol Rev* 66: 133-187 (1982)
- [75] Shaw BE, Arguello R, Garcia-Sepulveda CA, Madrigal JA: The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 150: 251-258 (2010)
- [76] Shaw BE, Marsh SG, Mayor NP, Russell NH, Madrigal JA: HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants. *Blood* 107: 1220-1226 (2006)
- [77] Shaw BE, Nolan A: Allogeneic Transplantation: When is a Mismatch Better than a Match? *Biol Blood Marrow Transplant* 19: 1-2 (2013)
- [78] Shaw BE, Potter MN, Mayor NP, Pay AL, Smith C, Goldman JM, Prentice HG, Marsh SG, Madrigal JA: The degree of matching at HLA-DPB1 predicts for acute graft-versus-host disease and disease relapse following haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 31, 1001-1008 (2003)
- [79] Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R: Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 91: 756-763 (1998)
- [80] Stern M, Passweg JR, Locasciulli A, Socié G, Schrezenmeier H, Békássy AN, Fuehrer M, Hows J, Korthof ET, McCann S, Tichelli A, Zoumbos NC, Marsh JCW, Bacigalupo A, Gratwohl A, Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation: Influence of donor/recipient sex matching on outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for aplastic anemia. *Transplantation* 82: 218-226 (2006)

- [81] Stevanovic S, van Bergen CA, van Luxemburg-Heijs SA, van der Zouwen B, Jordanova ES, Kruisselbrink AB, van de Meent M, Harskamp JC, Claas FH, Marijt EW, Zwaginga JJ, Halkes CJ, Jedema I, Griffioen M, Falkenburg JH: HLA class II upregulation during viral infection leads to HLA-DP-directed graft-versus-host disease after CD4+ donor lymphocyte infusion. *Blood* 122: 1963-1973 (2013)
- [82] Stiftung Knochenmark- & Stammzellspende Deutschland: Warum Knochenmarkstammzellenspenden?: URL: http://www.knochenmarkspende-deutschland.de/informationen_fuer_stammzellspender/warum_knochenmark_stammzellen_spenden.php Zugriffsdatum: 26.04.2017
- [83] Storb RF, Lucarelli G, McSweeney PA, Childs RW: Hematopoietic cell transplantation for benign hematological disorders and solid tumors: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 372-397 (2003)
- [84] Sureda A, Bader P, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Falkenburg JHF, Farge-Bancel D, Gennery A, Kršger N, Lanza F, Marsh JC, Nagler A, Peters C, Velardi A, Mohty M, Madrigal A: Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015: *Bone Marrow Transplant*. 50: 1037-1056 (2015)
- [86] Tanigaki N, Nakamuro K, Appella E, Poulik MD, Pressman D: Identity of the HL-A common portion fragment and human beta2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 55: 1234-1239 (1973)
- [87] Therneau TM, Grambsch PM: *Modelling Survival Data: Extending the Cox Model*: Springer: Bd. 1, 1. Aufl. (2000)
- [88] Therneau TM: *A Package for Survival Analysis in S*. (2016), R package version 2.37-7
- [89] Thomas ED, Lochte HJr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW: Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 38: 1709-1716 (1959)
- [90] Thomas ED, Lochte HLJr, Lu WC, Ferrebee JW: Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257: 491-496 (1957)
- [91] Thorsby E: A short history of hla. *Tissue Antigens* 74: 101-116 (2009)

- [92] Touzeau C, Gagne K, Šžbille V, Herry P, Chevallier P, Follža G, Devys A, Moreau P, Mohty M, Cesbron Gautier A: Investigation of the impact of HLA-DPB1 matching status in 10/10 HLA matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation: results of a French single center study. *Hum Immunol.* 73 :711-714 (2012)
- [93] Varney MD, Lester S, McCluskey J, Gao X, Tait BD: Matching for HLA DPA1 and DPB1 alleles in unrelated bone marrow transplantation. *Hum Immunol.* 60: 532-538 (1999)
- [94] Ventura C, Bisceglia H, Girerd-Chambaz Y, Burdin N, Chaux P: HLA-DR and HLA-DP Restricted Epitopes from Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Recognized by CD4+ T-Cell Clones from Chronically Infected Individuals. *J Clin Immunol* 32: 1305-1316 (2012)
- [95] Ventura C, Bisceglia H, Girerd-Chambaz Y, Burdin N, Chaux P: HLA-DR and HLA-DP restricted epitopes from human cytomegalovirus glycoprotein B recognized by CD4+ T-cell clones from chronically infected individuals. *J Clin Immunol.* 32: 1305-1316 (2012)
- [96] Wolff SN: Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29: 545–552 (2002)
- [97] Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ): URL: <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=sanger-sequenzierung>
Zugriffsdatum: 29.04.2017
- [98] Zhou B, Latouche A: Competing risks regression for Stratified and Clustered Data (2013), r package version 1.1
- [99] Zinkernagel RM: Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. *Biosci Rep* 17: 91-111 (1997)
- [100] Zino E, Frumento G, Markteli S, Sormani MP, Ficara F, Di Terlizzi S, Parodi AM, Sergeant R, Martinetti M, Bontadini A, Bonifazi F, Lisini D, Mazzi B, Rossini S, Servida P, Ciceri F, Bonini C, Lanino E, Bandini G, Locatelli F, Apperley J, Bacigalupo A, Ferrara GB, Bordignon C, Fleischhauer K: A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive

mismatches for hematologic stem cell transplantation: Blood 103: 1417-1424
(2004)

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.