

Universitätsklinikum Ulm
Institut für Transfusionsmedizin

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier

Einfluss von Genpolymorphismen des „MHC Class I Chain Related
Gene A“ (MICA) auf den Erfolg der nicht-verwandten
Blutstammzelltransplantation

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen
Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von
Sören Buschmann
Tübingen
2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schrezenmeier

Berichterstatter: apl. Prof. Dr. A. Schulz

Tag der Promotion: 23.06.2017

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung	1
1.1 Das humane Leukozytenantigen-System (HLA-System)	2
1.2 Das MHC class I chain related gene A (MICA)	4
1.3 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation	9
1.4 Ziel dieser Arbeit	12
2 Material und Methodik	13
2.1 Studiendesign	13
2.2 Statistische Methoden	17
2.3 Labormaterial	21
2.4 Labordiagnostik	27
3 Ergebnisse	37
3.1 Deskriptive Analyse	37
3.2 Analyse des Gesamtüberlebens und des DFS	40
3.3 Analyse der konkurrierenden Ereignisse aGvHD, Relapse und TRM	51
4 Diskussion	64
4.1 Einfluss der klinischen Risikofaktoren	64
4.2 Bedeutung der MICA-Allele	68
4.3 Limitationen	75
4.4 Schlussfolgerung	76
5 Zusammenfassung	77
6 Literaturverzeichnis	78
7 Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aGvHD	Acute graft-versus-host disease
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäuren
ATG	Antimyocytenglobuline
Bf	Properdinfaktor B
BM	engl.: bone marrow, Knochenmark
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C2	Komplementfaktor 2
C4	Komplementfaktor 4
CD	Cluster of differentiation
cGvHD	Chronic graft-versus-host disease
CIF	Cumulative incidence function
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CR	Competitive risk
CSX	Cyclosporin A
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DAP	death-associated protein
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
Df	degree of freedom
DFS	disease-free survival
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRST	Deutsches Register für Stammzelltransplantationen
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
fwP	Vorwärtsprimer
G	Guanin
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor

GvHD	Graft-versus-host disease
GvL	Graft-versus-leukemia
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPLC	High-performance liquid chromatography
HR	Hazardrate
HSC	Hematopoietic stem cells
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
HSP	engl.: heat shock protein; Hitzeschockprotein
HSV	Herpes-simplex-Virus
HvG	Host versus graft
Kb	Kilobasen
KIR	Killer cell immunglobulin-like receptor
KM	Knochenmark
Mb	Megabasen
MDS/MPN	Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie
MHC	engl.: Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC	MHC class I chain related
MICA	MHC class I chain related gene A
MICB	MHC class I chain related gene B
MMF	Mycophenolatmofetil
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MTX	Methotrexat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nM	nanomol
OS	engl.: overall survival, Gesamtüberleben
PBSC	Peripheral blood stem cell
PCR	Polymerase chain reaction
revP	Rückwärtsprimer
RIC	reduced intensity conditioning
RR	Relatives Risiko
SCID	engl.: severe combined immunodeficiency syndrome, schwerer kombinierter Immundefekt
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
β2m	Beta2-Mikroglobulin
STR	Short tandem repeat
T	Thymin

TAP	Transporter-assoziierte Proteine
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-cell receptor
T-Lymphozyt	Dem Thymus entstammender Lymphozyt
TNF	Tumornekrosefaktor
TRM	engl.: transplant-related mortality; transplantationsassoziierte Mortalität
Tx	Transplantation
ULBP	engl.: UL-16 binding protein

1 Einleitung

Fast 60 Jahre sind vergangen, seit erstmalig über die damals neuartige und radikale Therapieform der allogenen Stammzelltransplantation berichtet wurde (Thomas et Lochte 1957). Die allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (engl.: hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) ist heute ein Standardverfahren bei der Behandlung von schweren erblichen oder erworbenen, malignen und nichtmalignen hämatologischen Erkrankungen wie der Leukämie, lymphoproliferativen Erkrankungen, schweren angeborenen Immundefekten (engl.: severe combined immunodeficiency, SCID) und Hämoglobinopathien (Copelan 2006, Roifman et al. 2010). In den letzten 20 Jahren hat sich dank intensiver Forschung die Überlebensrate bei HSCT zwar kontinuierlich verbessert (Serna et al. 2003, Pasquini et Wang 2013). Bei ca. 420.000 nicht-verwandten Stammzelltransplantationen weltweit (Niederwieser et al. 2013, WBMT: Stand 12/2012), versterben jedoch weiterhin 30-60 % der Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation (Schaffer 2006, Barton-Burke et al. 2008, Pasquini et Wang 2013, Hahn et al. 2013). Neben infektiösen Ursachen ist insbesondere die Transplantatabstoßung und die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl. Graft-versus-host disease, GvHD), hervorgerufen durch Differenzen im Humanen Leukozyten Antigen-Komplex (HLA-Komplex) zwischen Spender und Empfänger, verantwortlich für ein Therapieversagen (Ferrara et Deeg 1991, Barton-Burke et al. 2008). Um eine möglichst genaue Übereinstimmung der transplantationsrelevanten HLA-Allele zu ermöglichen, müssen sich potenzielle Stammzellspender nach Durchführung einer HLA-Typisierung in Knochenmarkspenderkarteien registrieren.

In den letzten Jahren ist ein kontinuierlicher Anstieg von Spendern auf ca. 25 Mio. weltweit (Zentrales Knochenmarkspenderregister Deutschland, Stand 19.07.2015) zu verzeichnen, so dass heute für einen Patienten oft mehr als nur ein HLA-kompatibler Spender zur Verfügung steht. Obwohl durch die mittlerweile standardmäßig durchgeführte hochauflösende HLA-Typisierung in den meisten Fällen ein in den Major-Antigenen übereinstimmender Spender gefunden werden kann, kommt es weiterhin zu schwerwiegenden Komplikationen. Es gilt daher, zusätzliche prädiktive Faktoren zu erforschen, um in Zukunft eine noch exaktere Übereinstimmung zu erreichen und somit das Risiko einer allogenen Stammzelltransplantation weiter zu reduzieren. Die Erforschung eines dem HLA-Komplex verwandten Gens, des Major Histocompatibility Complex Class I chain related gene A (MICA), ist hierbei sehr vielversprechend.

1.1 Das humane Leukozytenantigen-System (HLA-System)

Der 1980 entdeckte Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: main histocompatibility complex, MHC) bezeichnet ein Gensystem, das für eine Anzahl an speziellen Proteinen codiert, die als Antigene auf der Zelloberfläche exprimiert werden und bei Transplantationen zu Histoinkompatibilität (Gewebeunverträglichkeit) führen. Da sie beim Menschen erstmals auf der Oberfläche von Leukozyten entdeckt wurden, werden sie als Humanes Leukozytenantigen-System (engl.: human leucocyte antigen, HLA-Komplex) bezeichnet.

1.1.1 Genetik und Aufbau des humanen MHC

Der HLA-Komplex (s. Abbildung 1) ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert (6p21.1-6p21.3) und umfasst ca. 3500 Kilobasenpaare (Shankarkumar 2004) an Desoxyribonukleinsäure (DNA) und 421 Genorte, von denen 252 als exprimierte Gene und 139 als Pseudogene klassifiziert sind (Horton et al. 2004). Es handelt sich um den Bereich mit der höchsten Gendichte und der höchsten Diversität im menschlichen Genom (Waßmuth 2005). Er lässt sich topographisch in drei Abschnitte unterteilen (Klasse I-III). Auf der telomer gelegenen Seite des Komplexes liegt die Region der HLA Klasse-I-Gene (s. Abbildung 1). Sie codiert für sechs exprimierte HLA Klasse-I-Gene sowie für 10 Pseudogene. Zu den sechs exprimierten Genen gehören die hochpolymorphen sogenannten klassischen oder Ia Moleküle (Strominger 1989) HLA-A, HLA-B und HLA-C. Der hohe Grad an Polymorphismus gewährleistet eine große Diversität an HLA-Molekülen. Die im Gegensatz hierzu als nicht-klassische oder Ib bezeichneten Gene HLA-E, HLA-F und HLA-G (Bahram et Spiess 1996), sind weitaus weniger polymorph. In der sich über 2 Megabasen (Mb) erstreckenden Region der HLA-Klasse I Gene liegen außerdem die Genloci der in dieser Arbeit untersuchten MIC-Familie (engl.: MHC class I chain related), die 1994 erstmals beschrieben wurde (Bahram et al. 1994). An die Region der HLA-Klasse I-Gene schließt sich zentromerwärts die als Klasse III bezeichnete Region an. In diesen Bereich gehören außer den Genen für die Komplementfaktoren C2, C4 und Properdinfaktor B (Bf) unter anderem auch die Gene für den Tumornekrosefaktor α (TNF- α), TNF- β und das Hitzeschockprotein 70 (HSP-70) (Bahram et Spiess 1996). Auf der dem Zentromer zugewandten Seite des Komplexes liegt die HLA-Klasse II-Region, welche sich über 1 Mb erstreckt und für Gene der intrazellulären Antigenprozessierung und den Transportprozessierter Antigene codiert (Bahram et Spiess 1996).

Da der Chromosomensatz beim Menschen diploid vorliegt, besitzt jedes Individuum zwei Allele eines jeden HLA-Genorts. Diese können homozygot oder heterozygot vorliegen. Die Expression der HLA-Moleküle erfolgt in kodominanter Weise, d.h. bei einem heterozygoten Individuum sind beide Allele im Phänotyp vertreten. Da es im Bereich des HLA-Komplexes selten zu DNA-Rekombinationen kommt (Martin et al. 1995), wird er normalerweise als Einheit vererbt und kann so über viele Generationen bestehen bleiben. (Waßmuth 2005).

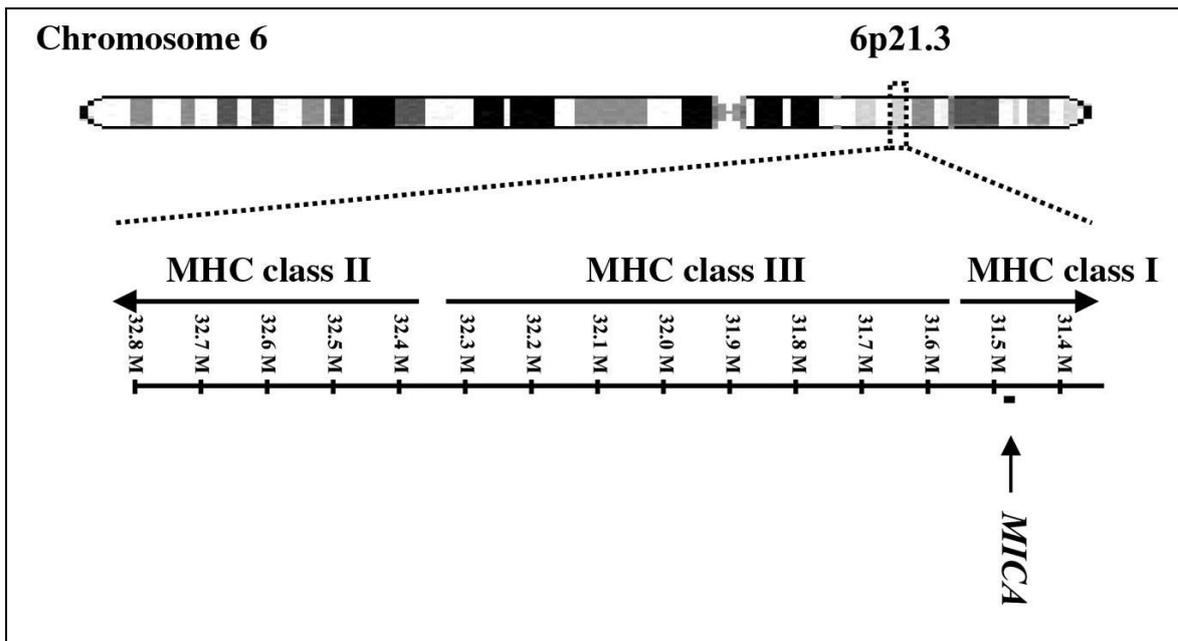


Abbildung 1 Die genetische Organisation des HLA-Komplexes (engl.: main histocompatibility complex, MHC) auf dem kurzen Arm des Chromosom 6. Banden entsprechen exprimierten Bereichen, MICA = MHC class I chain related gene A (Quelle: Kirsten et al. 2009, mit freundlicher Genehmigung des Verlages BioMed Central)

1.1.2 Die Funktion der klassischen HLA-Moleküle

Das klassische HLA-System stellt einen Teil des adaptiven Immunsystems dar. Dieses zeichnet sich durch Antigen-spezifität und das immunologische Gedächtnis aus. Bei der zellulären, antigenspezifischen Immunantwort ist die Präsentation des Antigens auf der Zelloberfläche zur Erkennung durch die T-Lymphozyten des Immunsystems notwendig. Diese Funktion übernehmen HLA-Antigene als antigenpräsentierende Moleküle, die nach intrazellulärer Prozessierung allogene wie auch autologe Proteinantigene auf der Zelloberfläche exprimieren und so zugänglich für die spezifische zelluläre Immunabwehr machen (Zinkernagel et al. 1974). Jedes HLA-Molekül besitzt hierzu eine für ein bestimmtes Peptid spezifische Antigenbindungsstelle. Die erforderliche Diversität spezifischer Moleküle wird zum Großteil durch hohen genetischen Polymorphismus erreicht. Gleichzeitig können T-Lymphozyten nicht nur das präsentierte Antigen, sondern auch zwischen „eigenen“ oder „fremden“ HLA-Molekülen unterscheiden (Garcia et al.

1998). Eine weitere Aufgabe der HLA-Moleküle besteht somit in der Vermittlung von Selbst und Nicht-Selbst bei der Auseinandersetzung des Immunsystems mit Antigenen allogener (körperfremder) oder autologer (körpereigener) Herkunft (Zinkernagel et al. 1974). Die Expression von HLA Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche ist außerdem ein positiver Indikator für die Gesundheit der Zelle (Bauer et al. 1999). Ist eine Zelle nicht mehr in der Lage, eine adäquate Menge an MHC-Klasse-I-Molekülen zu exprimieren, deutet dies z.B. auf eine Infektion durch Viren hin und kann vom Immunsystem dadurch als solche erkannt und die geschädigte Zelle eliminiert werden (Kärre et al. 1986, Ljunggren 1990). HLA-Klasse-Ia-Moleküle kommen in unterschiedlicher Quantität auf nahezu allen kernhaltigen Zellen vor (Shankarkumar 2004). HLA-Klasse-II-Moleküle werden v.a. auf professionell Antigen-präsentierenden Zellen (B-Lymphozyten, aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und Dendritischen Zellen) exprimiert (Shankarkumar 2004).

1.2 Das MHC class I chain related gene A (MICA)

1.2.1 Genetik und Aufbau des MICA-Gens

1994 wurde von Bahram et al. eine neue Familie polymorpher Gene im humanen MHC beschrieben, die entfernte Ähnlichkeit zu den HLA-Klasse I –Sequenzen aufweisen. Man nennt diese Genfamilie daher MIC (MHC class I chain related). Lokalisiert ist sie auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 innerhalb der Region der HLA-Klasse-I-Gene zentromerwärts nahe von HLA-B und telomerwärts des TNF-Lokus der MHC-Klasse-III-Gene (s. Abbildung 1). Die MIC-Familie besteht aus den zwei funktionalen Genen, MICA und MICB und den 5 Pseudogenen MICC, MICD, MICE, MICEF, MICG (Bahram 2000, Collins 2004). Das MICA-Gen liegt 40 Kilobasen (Kb) zentromerwärts von HLA-B auf Position 6p21.33 (Frigoul et Lefranc 2005) (s. Abbildung 1). Es ist aus 6 Exons aufgebaut (s. Abbildung 2) und erstreckt sich über 11722 bp (Basenpaare) (Fodil et al. 1999). Es besitzt weniger als 40 % Übereinstimmung mit anderen HLA Klasse I-Genen, welche untereinander eine Übereinstimmung von mind. 70 % haben (Bahram et al. 1994, Zwirner 1999). MICB befindet sich wiederum 70 kb weiter zentromerwärts von MICA und ist eng verwandt mit diesem. Die Übereinstimmung ihrer kodierenden Anteile beträgt 90 % (Bahram et Spiess 1996). Die Expression von MICA erfolgt analog zu den HLA-Molekülen in kodominanter Weise (Molinero et al. 2002). Das humane MICA-Gen ist mit derzeit 100 bekannten Allelen hochpolymorph, wohingegen nur 40 Allele des MICB bekannt sind (Robinson et al. 2015).

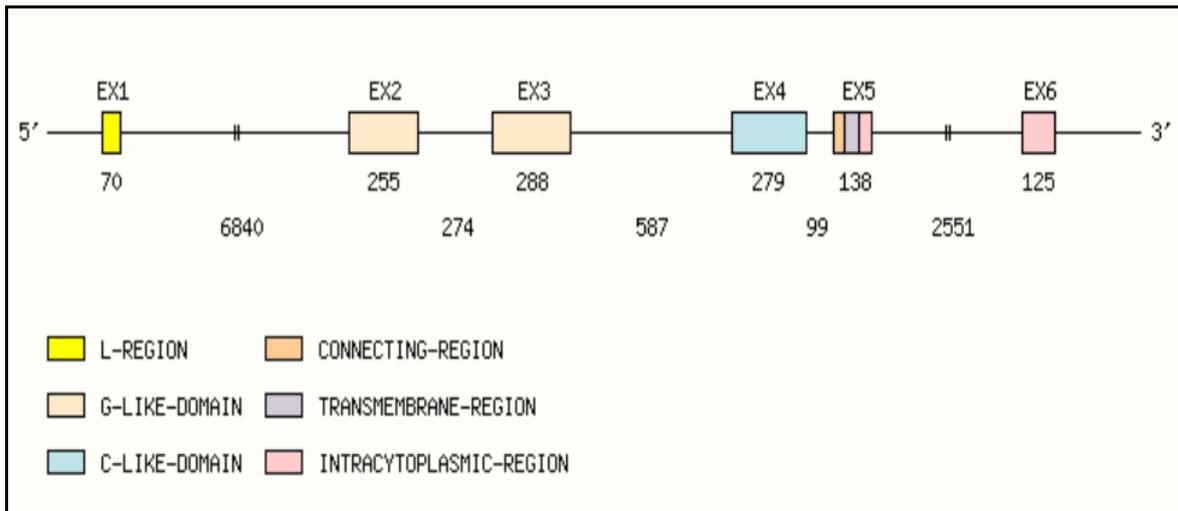


Abbildung 2 Organisation des MICA-Gens. Exons und dazwischenliegende Introns. EX1-EX6 = Exons. Die Regionen bezeichnen die jeweilige Position des codierten Genprodukts im exprimierten MICA-Molekül. L, G und C bezeichnen die drei extrazellulären Domänen, Exon 5 und 6 codieren für die transmembran- bzw. intrazytoplasmatische Region (Quelle: Frigoul et Lefranc 2005 S. 100, mit freundlicher Genehmigung von Marie-Paule Lefranc, IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, <http://www.imgt.org>)

1.2.2 Aufbau des MICA Moleküls

Beim Produkt des MICA-Gens, dem MICA-Molekül, handelt es sich um ein membrangebundenes Glykoprotein (Fodil et al. 1999), das in seiner Struktur jener der HLA-Klasse-I-Moleküle ähnelt, mit drei extrazellulären Domänen ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), einer Transmembran-Domäne und einem zytoplasmatischen Teil. Jede Domäne wird von einem der 6 Exone kodiert (Bird L 2008) (s. Abbildung 3 u. 4). Im Bereich der alpha2-Domäne des Proteins besteht eine offensichtliche Unordnung der Peptide (Fodil et al. 1996), was zur Ausbildung einer flexiblen Schlinge führt, welche sich bei Interaktion mit seinem Rezeptor verändern kann (Gambelunghe et Falorni 2005).

Insgesamt hat das Polypeptid eine Länge von 383-389 Aminosäuren und eine relative molekulare Masse von 43kDa (Bahram et Spiess 1996, Gambelunghe et Falorni 2005). Durch eine Guanin-Insertion in der Transmembran-Domäne kommt es bei einigen Allelen, den sogenannten MICA 5.1-Allelen zu einem Frameshift, was im exprimierten Molekül einen abgeschnittenen zytoplasmatischen Schwanz verursacht. Diese Mutation führt zu veränderter biologischer Funktion dieser Moleküle (Ota et al. 1997, Suemizu et al. 2002, Ashiru et al. 2013). Außerdem gibt es Polymorphismen, bei denen an Position 129 der Aminosäuresequenz Methionin durch Valin ersetzt ist. Dies führt offenbar zu unterschiedlicher Bindungsaffinität zum NKG2D-Rezeptor (Steinle et al. 2001, Isernhagen 2014).

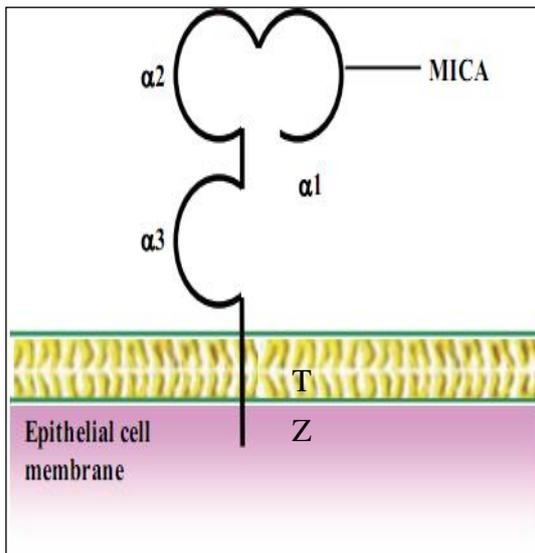


Abbildung 3 Aufbau des MICA-Moleküls (MICA = MHC class I chain related gene A) Externe Domänen $\alpha 1$ - $\alpha 3$, T = Transmembran-Domäne, Z = Zytoplasmatischer Teil (Quelle: Li et al. 2005 S. 254, mit freundlicher Genehmigung des Verlages Nature Publishing Group)

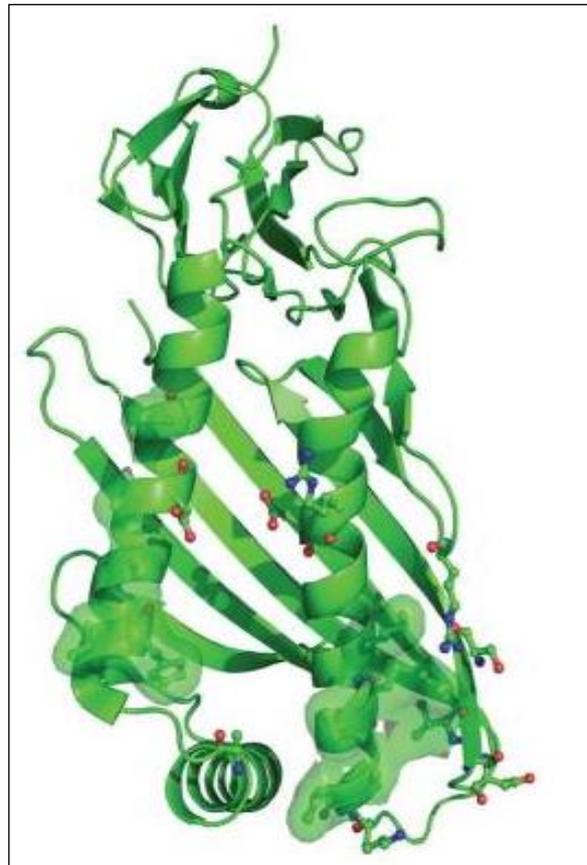


Abbildung 4 MHC class I chain related gene A (MICA): Molekulare Struktur (Quelle: Joyce et Sun 2011 S. 11, CC BY 3.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

1.2.3 Expression von MICA

MICA ist im Gegensatz zu den klassischen HLA-Molekülen nicht an der Antigenpräsentation beteiligt (Groh et al. 1996, Collins 2004). Es wird nicht wie klassische HLA-Klasse-I-Moleküle ubiquitär auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, sondern wurde unter physiologischen Bedingungen auf Epithelzellen, v.a. gastrointestinalen Epithelzellen (Groh et al. 1996, Groh et al. 1998), Fibroblasten und auf Hassal-Körperchen im humanen Thymus gefunden (Hüe et al. 2003). Bei Keratinozyten und Monozyten lag es nicht auf der Oberfläche exprimiert vor, war aber im Zelllysat nachweisbar (Zwirner 1998). Nicht exprimiert werden MICA und MICB auf zirkulierenden Lymphozyten $CD4^+$ -, $CD8^+$ - oder $CD19^+$ -Zellen (B-Lymphozyten) (Zwirner 1998, Collins 2004, Bird L 2008). Die Expression von MICA und MICB wird, ähnlich jener der Gene des HSP70 (engl: heat shock protein, HSP70) reguliert (Groh 1996). In Situationen, in denen einer Zelle z.B. durch Infektion, Hitze oder maligne Entartung Stress widerfährt, werden Liganden wie MICA, MICB und das HSP 70 in einigen Geweben verstärkt exprimiert. (Gambelunghe et Falorni 2005).

1.2.4 MICA als Ligand für den NKG2D-Rezeptor

MICA agiert als Ligand für den NKG2D-Rezeptor (engl.: Natural killer group 2, member D). Dieser als Homodimer vorliegende Transmembran-Rezeptor ist stark aktivierend und wird von allen Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, $CD8^+\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und $CD4^+CD28-\alpha\beta$ -T-Lymphozyten exprimiert (Bauer et al. 1999). NKG2D ist Mitglied der NKG2-Familie der HLA-Klasse-I C-Typ, Lektin-Rezeptoren (Gambelunghe et Falorni 2005) und wird beim Menschen auf dem Chromosom 12 codiert (Glienke et al. 1998). Er ist mit DAP 10 (death-associated protein) assoziiert, einem Transmembran-Adapter-Protein, das einen Teil der Signaltransduktion im NKG2D-Rezeptor-Komplex darstellt (Bauer et al. 1999, Wu et al. 1999). Ausser MICA stellen UL-16 bindende Proteine, die sogenannten ULBPs (engl.: UL-16 binding protein) Liganden für den NKG2D-Rezeptor dar (Baragaño Raneros 2014).

Die Bindung von MICA an den NKG2D-Rezeptor erfolgt gleichzeitig an den NKG2D- und den $V\delta 1$ TCR –Rezeptor (engl: t-cell receptor, TCR) (Li et al. 2001 et 2005) (s. Abbildung 5 u. 6). MICA-Moleküle sind im Gegensatz zu HLA-Klasse-I-Molekülen nicht mit Beta2-Mikroglobulin ($\beta 2m$) assoziiert und sind unabhängig von Transporter-assoziierten Proteinen (TAP) (Groh et al. 1996). Allele mit Methionin an Position 129 (MICA*001, *007) besitzen eine 10-bis 50-fach stärkere Bindungsaffinität zum NKG2D-Rezeptor als Allele mit Valin in dieser Position (MICA*004, *008, *016) (Steinle et al. 2001). Der ausgeprägte Polymorphismus im MICA-Gen von derzeit 100 bekannten Allelen (Robinson et al. 2015) führt also zu unterschiedlicher Bindungsaffinität zum korrespondierenden NKG2D-Rezeptor, was möglicherweise der Steuerung des Aktivierungsgrades NKD2D-exprimierender Zellen dient (Steinle et al. 2001).

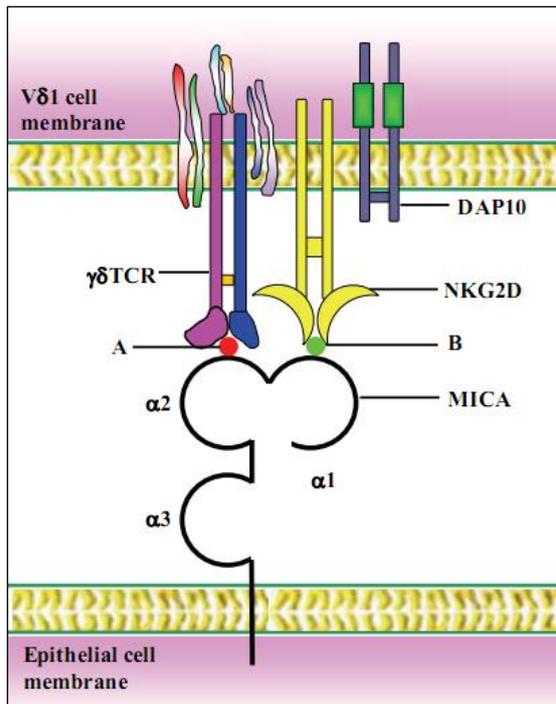


Abbildung 5 V δ 1TCR und NKG2D binden simultan an MICA und führen zur Aktivierung der Rezeptor-Trägerzelle. A und B repräsentieren mögliche Bindungsstellen zwischen MICA und den Rezeptoren. Externe Domänen α 1- α 3, MICA = MHC class I chain related gene 2, TCR = T-Zell-Rezeptor, DAP10 = death-associated protein (Quelle: Li et al. 2005 S. 254, mit freundlicher Genehmigung des Verlages Nature Publishing Group)

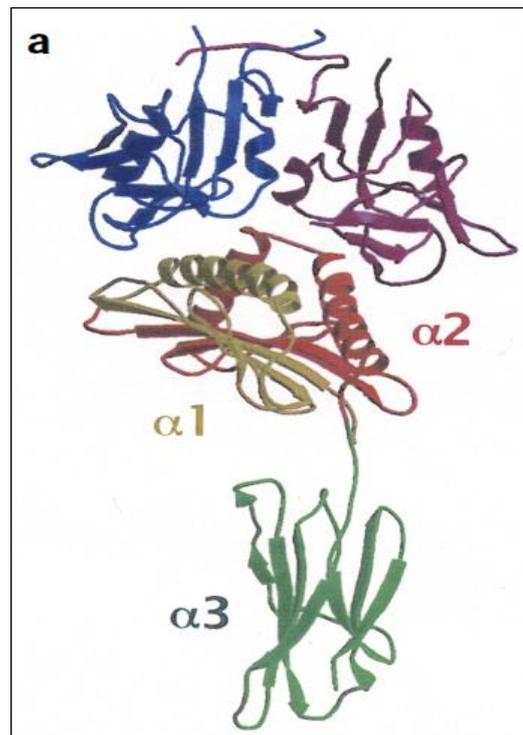


Abbildung 6 Struktur des NKG2D-Rezeptors im Komplex mit MICA. Seitenansicht. MICA-Domänen α 1 (gelb), α 2 (rot), α 3 (grün). NKG2D-Heterodimer (blau und lila) (Li et al. 2001 S. 445, mit freundlicher Genehmigung des Verlages Nature Publishing Group)

1.2.5 NKG2D-Zelleffektor-Funktion

Durch Bindung von MICA an den NKG2D-Rezeptor wird dessen Trägerzelle aktiviert (v.a. NK-Zellen u. T-Zellen) (Bahram et Spies 1996, Groh et al. 1996). Hierdurch kommt es zu Zytokinsekretion, Zellproliferation von immunkompetenten Zellen und insgesamt zu gesteigerter Zytotoxizität gegen MICA-tragende Zellen (Gambelunghe et Falorni 2005). MICA und MICB werden z.B. häufig von epithelialen Tumoren wie denen der Lunge, der Brust, der Nieren, des Ovars, der Prostata und des Kolonkarzinoms exprimiert. (Zwirner 1998, Bauer et al. 1999). Durch die vermehrte Expression von MICA können also maligne transformierte oder infizierte, MICA-exprimierende Zellen von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und einigen T-Lymphozyten besser erkannt und eliminiert werden. Somit dient die stressinduzierte Expression von MICA und MICB als Indikator für beschädigte Zellen, insbesondere von Epithelzellen. Auf Nieren- und Pankreastransplantaten, bei denen es nach der Transplantation (Tx) zur Abstoßungsreaktion kam, konnten MIC-Proteine auf der Zelloberfläche und Antikörper gegen MIC im Serum nachgewiesen werden (Collins 2004, Zou et Stastny 2011). Bestimmte Tumorzellen exprimieren MIC-Proteine, die sich

im Serum lösen und die NKG2D-Rezeptoren von T-Lymphozyten blockieren, was diese wiederum an der Tumorlyse hindert (Collins 2004). Das ebenfalls stress-induzierte HSP 70 (Hitzeschockprotein) kooperiert mit MICA, indem es die Aktivität von NK-Zellen gegen MICA-exprimierende Zellen steigert. Die Zusammenarbeit dieser zwei stressinduzierbaren immunologischen Signalgeber führt zu verbesserter Zytotoxizität von NK-Zellen gegen Tumorzellen (Elsner et al. 2010).

1.3 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation

In Deutschland regelt das Zentrale Knochenmarkspenderregister (ZKRD), das eng mit den Spenderdateien und den Sucheinheiten der Knochenmarktransplantationszentren zusammenarbeitet, die Vermittlung freiwilliger Spender aus dem In- und Ausland. Bundesweit sind aktuell 6 Mio. und weltweit ca. 25 Mio. potenzielle Spender erfasst (ZKRD, Spenderzahlen: Stand 19.07.2015). Die Wahrscheinlichkeit, einen HLA-kompatiblen Spender für eine HSCT zu finden, hängt unter anderem von der Häufigkeit der HLA-Allelkombination des Empfängers in der Allgemeinbevölkerung ab (Waßmuth 2005). Die häufigsten HLA-Merkmale kommen in Deutschland mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:300 vor (ZKRD Pressemitteilung 2011). Da HLA-Differenzen bei HSCT mit erhöhter Mortalität einhergehen (Loiseau et al. 2007, Lee et al. 2007, Robin et al. 2013), wird heute gemäß des Deutschen Konsensus zur immungenetischen Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation möglichst eine hochauflösende HLA-Typisierung und Matching auf Allelebene angestrebt, was einer Übereinstimmung der HLA-Testresultate auf vierstelligem Niveau (nach neuer HLA-Nomenklatur der WHO zwei Felder) aller HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 Genloci (10/10) entspricht (Müller et al. 2013, Robinson et al. 2015). Für über die Hälfte der deutschen Patienten ohne passenden Familienspender kann nach ca. 6 Wochen ein gewebeverträglicher, nicht-verwandter Spender gefunden werden (ZKRD, Spendersuche 2013: Stand: 19.07.2015). Zur Transplantation eignen sich autologe, d.h. körpereigene, zuvor gewonnene hämatopoetische Stammzellen (HSCs), oder die Transplantation allogener, also körperfremder HSCs eines Spenders. Die Stammzellen werden entweder dem Knochenmark entnommen (engl.: bone marrow, BM), oder nach Stimulation mittels Wachstumsfaktor G-CSF (engl.: granulocyte-colony stimulating factor) aus dem peripheren Blut (engl.: peripheral blood stem cells, PBSC) des Spenders extrahiert. Einige Tage vor der Transplantation wird im Zuge der Konditionierungsbehandlung das Knochenmark des Patienten durch eine Hochdosischemotherapie oder kombinierte Chemo-

und Strahlentherapie komplett eliminiert (myeloablative Konditionierung, MA), oder durch intensitätsreduzierte Konditionierung nur teilweise eradiziert (engl.: reduced intensity conditioning, RIC). Im Anschluss wird das Blutstammzelltransplantat infundiert, welches das hämatopoetische System des Empfängers ersetzen soll.

1.3.1 Komplikationen der HSCT

Bei der allogenen HSCT bestehen Gewebsantigendifferenzen von non-HLA-Merkmalen oder Differenzen nicht getesteter HLA-Antigene zwischen Spenderzellen und dem Empfänger. T-Lymphozyten des Spenders detektieren die Expression fremder HLA-Antigene auf Zellen des Empfängers und lösen eine Immunantwort gegen den Wirt aus. Diese Reaktion wird als Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: graft-versus-host disease, GvHD) bezeichnet (Waßmuth 2005). Das Ausmaß der Alloreaktivität hängt wesentlich von der HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger ab (Kernan et al. 1993, El Kassar et al. 2001, Copelan 2006, Hansen et al. 2008, Fürst et al. 2013) weshalb eine höchstmögliche Übereinstimmung angestrebt wird. Zur Verringerung der hohen Mortalität, die mit der GvHD assoziiert ist, wird nach Durchführung der HSCT eine medikamentöse GvHD-Prophylaxe verabreicht.

Trotz Optimierung der immunsuppressiven Therapie nach Transplantation in den letzten Jahren, kommt es bei 30-60 % der Patienten (Ferrara et Deeg 1991, Schaffer 2006, Barton-Burke et al. 2008) zur Ausbildung einer GvHD mit potenziell letalem Ausgang (Ferrara et Deeg 1991, Waßmuth 2005, Schaffer 2006). Insgesamt versterben ca. 15 % der Patienten an den Folgen der GvHD (Pasquini et Wang 2013). Unterschieden wird zwischen der akuten GvHD (aGvHD), die per definitionem innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auftritt, und der chronischen GvHD (cGvHD), die später als 100 Tage nach Transplantation auftritt. Die cGvHD ist der häufigste Grund für spätes transplantationsassoziiertes Versterben (engl.: transplant-related mortality, TRM) (Lee et al. 2002). Am häufigsten sind von der GvHD die Gewebe des oberen und unteren Gastrointestinaltrakts, der Haut und der Leberzellen betroffen (Deeg et Antin 2006).

Die Einteilung der aGvHD erfolgt nach Ausprägung und Anzahl der befallenen Organe in vier Schweregrade und wird im Kapitel Material und Methodik 2.2.1 ausführlich beschrieben. Zur Einteilung der chronischen GvHD (cGvHD) kommen die Seattle-Kriterien zur Anwendung (Shulman et al. 1980). Das Auftreten der GvHD kann zwar durch verschiedene Verfahren, wie die GvHD-Prophylaxe oder die T-Zell-Depletion der Spender T-Lymphozyten aus dem Transplantat, verringert werden, jedoch steigt dadurch die Rezidivrate (engl.: Relapse) an. Verursacht wird dies durch die Verringerung des

therapeutisch wichtigen Graft-versus-Leukämie-Effekts (GvL-Effekt) (Horowitz et al. 1990, Kolb et al. 1995, Lee et al. 2002, Kim et al. 2007, Perz 2012) von Spenderzellen gegen neoplastische Patientenzellen. Es besteht ein reziproker Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Relapse und der Inzidenz der GvHD, der auf den GvL-Effekt zurückzuführen ist (Carlens et al. 1999, Copelan 2006). Heute versucht man durch reduzierte Konditionierungsschemata (engl.: reduced intensity conditioning, RIC) eine optimale Balance zwischen beiden Effekten zu erreichen (Mohty et al. 2003). Neben der GvHD und dem Relapse der Grunderkrankung sind weitere Komplikationen der HSCT opportunistische Infektionen, Schäden durch die Toxizität des Konditionierungsschemas, sekundäre Malignome, transplantationsbedingtes Versterben, Mucositis und venenokklusive Erkrankungen (Gratwohl et al. 2005, Daikeler et al. 2012). Bei den Infektionen handelt es sich meist um bakterielle Infektionen, welche durch die, auf die Konditionierungsbehandlung folgende, panzytopen Phase begünstigt werden. Ebenso kann es zur Reaktivierung persistierender Viren (z.B. Herpes-simplex-Virus (HSV), Cytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV)) kommen (De Pagter et al. 2008, Wu et Liu 2012). Am vulnerabelsten für Infektionen ist die panzytopen Phase und hierbei insbesondere die Neutropenie 1-3 Wochen nach Tx (Gratwohl et al. 2005). Durch RIC konnte diese Phase entscheidend verkürzt und somit das Infektionsrisiko verringert werden. Isolierungsmaßnahmen sowie moderne Behandlungsmethoden und Antibiotika senken die Mortalität und Morbidität durch Infektion weiter. Eine eher seltene Komplikation ist mit < 5 % das Transplantatversagen, bei dem die transplantierten Stammzellen ihre Funktion nicht erfolgreich aufnehmen können (Roberts et De la Fuente 2008).

1.3.2 Überleben nach HSCT

Von 1980 bis 2001 konnte die Mortalität der aGvHD von 10 % auf 7 % gesenkt werden, die der Infektionen von 6 % auf 1 %. Im gleichen Zeitraum stieg die Mortalität durch Relapse von 6 % auf 11 % (Gratwohl et al. 2005). Die insgesamt beobachtete Senkung der Mortalität ist also in erster Linie auf die niedrigere Sterblichkeit durch Infektionen zurückzuführen. Aktuell liegt das Gesamtüberleben ein Jahr nach Tx bei ca. 60 % (Barton-Burke et al. 2008, Pasquini et Wang 2013, Hahn et al. 2013). Das Gesamtüberleben variiert hierbei stark in Abhängigkeit der Art der Grunderkrankung und des Stadiums der Erkrankung zum Zeitpunkt der Tx. Es liegt bei der allogenen HSCT bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), Myelodysplastischem Syndrom/Myeloproliferativer

Neoplasie (MDS/MPN) oder akuter lymphatischer Leukämie (ALL) zwischen 15 und 55 % (Pasquini et Wang 2013).

1.4 Ziel dieser Arbeit

Das Outcome (engl.: Ausgang, Endergebnis) bei der unverwandten HSCT ist bisher weiterhin dem der verwandten HSCT unterlegen. Der Grund hierfür könnten unzureichende Auswahlkriterien zur Histokompatibilität (Gewebeverträglichkeit) bei der Spenderauswahl sein. Die Identifizierung neuer, transplantationsrelevanter Gewebsantigene könnte die gezielte Spenderauswahl v.a. bei der nicht-verwandten HSCT weiter optimieren und ihre Ergebnisse weiter verbessern. Die Ergebnisse gewinnen vor allem an Bedeutung, da die Zahl der spendewilligen nicht verwandten Spender, die weltweit registriert sind, in den letzten Jahren stark ansteigt und aktuell bei 25 Millionen liegt (ZKRD, Spenderzahlen: Stand 19.07.2015). Aufgrund dieser Entwicklung steht bei unverwandten Transplantationen zunehmend mehr als nur ein HLA-kompatibler Spender zur Verfügung, was das Einbeziehen weiterer Parameter zur Optimierung der Spenderauswahl ermöglicht. Es gilt, diese Parameter mit signifikantem Einfluss auf das Outcome der unverwandten HSCT zu identifizieren und ihren prognostischen Wert zu analysieren. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der MICA-Übereinstimmung sowie der MICA-Polymorphismen auf den Verlauf der nicht-verwandten HSCT zu untersuchen und die Frage zu beantworten, ob die genannten Parameter für die Beurteilung der Histokompatibilität bei der Spenderauswahl herangezogen werden sollten. Folgende Fragestellungen werden insbesondere behandelt:

1. Kann ein besseres Outcome bei der HSCT erreicht werden, wenn die Spender-Patienten-Paare nicht nur 10/10 HLA-gematcht werden, sondern zusätzlich auch MICA-gematcht (to match (engl.): übereinstimmen)?
2. Hat das Vorkommen bestimmter MICA-Allele Einfluss auf das Outcome von HSCTs?

2 Material und Methodik

2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive, nicht-kontrollierte Patientenstudie, in der die Bedeutung der Kompatibilität von MICA-Allelen bei der allogenen Blutstammzelltransplantation auf den weiteren Krankheitsverlauf untersucht wird. Hierzu wurde eine Kohorte mit 114 Patienten ausgesucht, die zwischen 1997 und 2002 eine allogene HSCT erhalten hatten. Dem Antrag zur Durchführung der Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Ulm stattgegeben (Mytilineos et Fürst: Ethikantrag Nr. 263/09, 2007). Die Patienten- und Spender-DNA (engl.: deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure) und die klinischen Daten über den Krankheitsverlauf nach Transplantation entstammen der bereits früher durchgeführten Carreras-Studie, einer durch die Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. unterstützte Studie zur Erforschung der „Immunologischen Bedeutung von HLA-Allel-Differenzen für die allogene Blutstammzelltransplantation“ (Projektnummer D.1859). Viele der Studienteilnehmer waren zum Zeitpunkt dieser Studie bereits verstorben. Es musste daher auf konserviertes Genmaterial zurückgegriffen werden. Die DNA-Asservate der Patienten stammten aus Blutproben, die vor der Blutstammzelltransplantation im Rahmen der Spendersuche entnommen worden waren. Die DNA-Proben der Spender waren zum Zeitpunkt der Bestätigungstypisierung im Labor unserer Sucheinheit aus Blutproben extrahiert und tiefgefroren gelagert worden. Das Einverständnis zur Histokompatibilitätstestung wurde im Rahmen der Sucheinleitung eingeholt, das Einverständnis zur Analyse der klinischen Daten erfolgte im Rahmen der Nachsorge bei Registrierung im europäischen Register der European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) bzw. im Deutschen Register für Stammzelltransplantationen (DRST).

2.1.1 Auswahl des Studienkollektivs

Alle Spender und Empfänger wurden hinsichtlich des MICA-Gens auf Allel-Ebene genotypisiert. Die Zuordnung geschah anhand der Polymorphismen in Exon 2-5. Um Interferenzen durch HLA-Mismatching zu vermeiden, wurden ausschließlich komplett HLA-gematchte (10/10) Patienten-Spender-Paare in die Studie eingeschlossen, d.h. dass sie in HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1 kompatibel waren. Da zu der Zeit, als die HSCTs durchgeführt wurden, die hochauflösende Genotypisierung noch nicht routinemäßig durchgeführt wurde, war es erforderlich, für diese Studie retrospektiv nur

diejenigen Patienten auszusuchen, bei denen bereits eine hochauflösende HLA-Genotypisierung vorlag. Eingeschlossen werden konnten außerdem nur Probanden, von denen quantitativ sowie qualitativ ausreichendes Genmaterial für die MICA-Genotypisierung zur Verfügung stand.

Zusammengefasst wurden folgende Einschlusskriterien für die Studie festgelegt:

- keine Verwandtschaft zwischen Blutstammzellspender und Empfänger
- Alter des Patienten > 18 Jahre
- Vorhandensein von genügend Material des DNA-Asservats
- Vollständiges HLA-Match (10/10) zwischen Spender und Empfänger

Es konnten 114 Patienten und ihre zugehörigen, komplett HLA-kompatiblen Spender identifiziert und in die Studie eingeschlossen werden. Das Gesamtkollektiv setzte sich aus 70 männlichen (61,4 %) und 44 weiblichen (38,6 %) Patienten mit einem medianen Alter von 41,5 Jahren und einer Altersspanne von 18 bis 62 Jahren zusammen. Die 9 Zentren, an denen die HSCTs durchgeführt wurden waren Berlin, Erlangen, Hannover, Heidelberg, München, Mainz, Regensburg, Ulm und Wiesbaden. Indikation für die HSCT war jeweils das Vorhandensein einer der folgenden hämatologischen Erkrankungen: Akute lymphatische Leukämie (ALL, 22 Patienten, 19,3 %), Akute myeloische Leukämie (AML, 37 Patienten, 32,5 %), Chronische myeloische Leukämie (CML, 32 Patienten, 28,1 %), Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie (MDS/MPN, 9 Patienten, 7,9 %). Unter „andere“ Erkrankungen (14 Patienten, 12,3 %) wurden alle anderen im Kollektiv vorkommenden Erkrankungen zusammengefasst, deren Anteil insgesamt < 5 % betrug (Chronisch lymphatische Leukämie, nicht näher spezifiziertes Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphome, Multiples Myelom/Plasmozytom). Die vier häufigsten Erkrankungen wurden nach ihrem Schweregrad in Stadien eingeteilt. Die Einteilung erfolgte nach klinischen Parametern in drei Stadien (s. Tabelle 1). Heute liegen bessere, international vergleichbare Klassifizierungsschemata zur Stadieneinteilung vor, wie z.B. das IPSS (engl.: International Prognostic Scoring System) (Greenberg et al. 1997). Dieses konnte jedoch nicht mehr nachträglich auf die vorliegenden Daten angewendet werden, da die erforderlichen Informationen zur Klassifizierung nicht erhoben worden waren.

Tabelle 1 Klinische Einteilung der Krankheitsstadien. AML = Akute myeloische Leukämie, CML = Chronische myeloische Leukämie, MDS/MPN = Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie, KM = Knochenmark.

Krankheitsstadium	AML und ALL	MDS/MPN	CML
Frühes Stadium (I) 41,2 % (n = 47)	in erster kompletter Remission	In erster kompletter Remission	CML in erster chronischer Phase
Mittleres Stadium (II) 30,7 % (n = 35)	in zweiter kompletter Remission oder erstem Relapse	In zweiter kompletter Remission oder erstem Relapse	in zweiter chronischer Phase oder akzelerierter Phase
Fortgeschrittenes Stadium (III) 13,2 % (n = 15)	in zweitem oder höherem Relapse oder primär refraktärer Erkrankung	Primär refraktäre Erkrankung, weit fortgeschrittene Erkrankung	in Blastenkrise
Stadium unbekannt 14,9 % (n = 17)	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten

In 70 Fällen (61,4 %) wurde ein geschlechtsidentischer Spender verwendet. Durch den Ausschluss von Patienten < 18 Jahre ergab sich das in Abbildung 7 dargestellte, klassifizierte Verteilungsmuster des Alters. Spendermaterial wurde entweder aus peripheren Blutstammzellen (engl.: peripheral blood stem cell, PBSCs, 57,9 %, n = 66) oder aus Knochenmark (KM, 42,1 %, n = 48) gewonnen. Zur Gewinnung peripherer Stammzellen wurden die Spender zuvor mit G-CSF (engl.: granulocyte colony-stimulating factor) behandelt. Vor Transplantation erhielten die Patienten entweder eine myeloablative (78,1 %, n = 89), oder eine intensitätsreduzierte (RIC = engl.: reduced-intensity-conditioning, 21,9 %, n = 25) Konditionierungsbehandlung. Die myeloablative Konditionierung bestand aus einer Ganzkörperbestrahlung, meist kombiniert mit einer Cyclophosphamid-Hochdosischemotherapie. Die RIC basierte auf einer Chemotherapie (überwiegend Fludarabin), zum Teil kombiniert mit Melphalan. Nach Transplantation erfolgte eine GvHD-Prophylaxe, wobei die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CSA), Methotrexat (MTX), Antithymocytenglobuline (ATG), Mycophenolatmofetil (MMF) oder Steroide verwendet wurden. Unterteilt wurden die Schemata nach ihrer immunsuppressiven Intensität in zwei Gruppen. 94 der Patienten (= 82,5 %) erhielten eine Standard-GvHD-Prophylaxe, die zumeist aus der Kombination von CSA+MTX bestand.

Eine niedrig dosierte GvHD-Prophylaxe erhielten 20 Patienten (17,5 %). Sie beinhaltete nur eines der stark wirksamen Immunsuppressiva (meist CSA), kombiniert mit einem oder mehreren schwächeren Immunsuppressiva. Am häufigsten kamen die Kombinationen CSA+MTX und CSA+MTX+ATG zur Anwendung. Eine Übersicht zu den demographischen Daten findet sich im Ergebnisteil im Kapitel „Charakterisierung des Patientenkollektivs“.

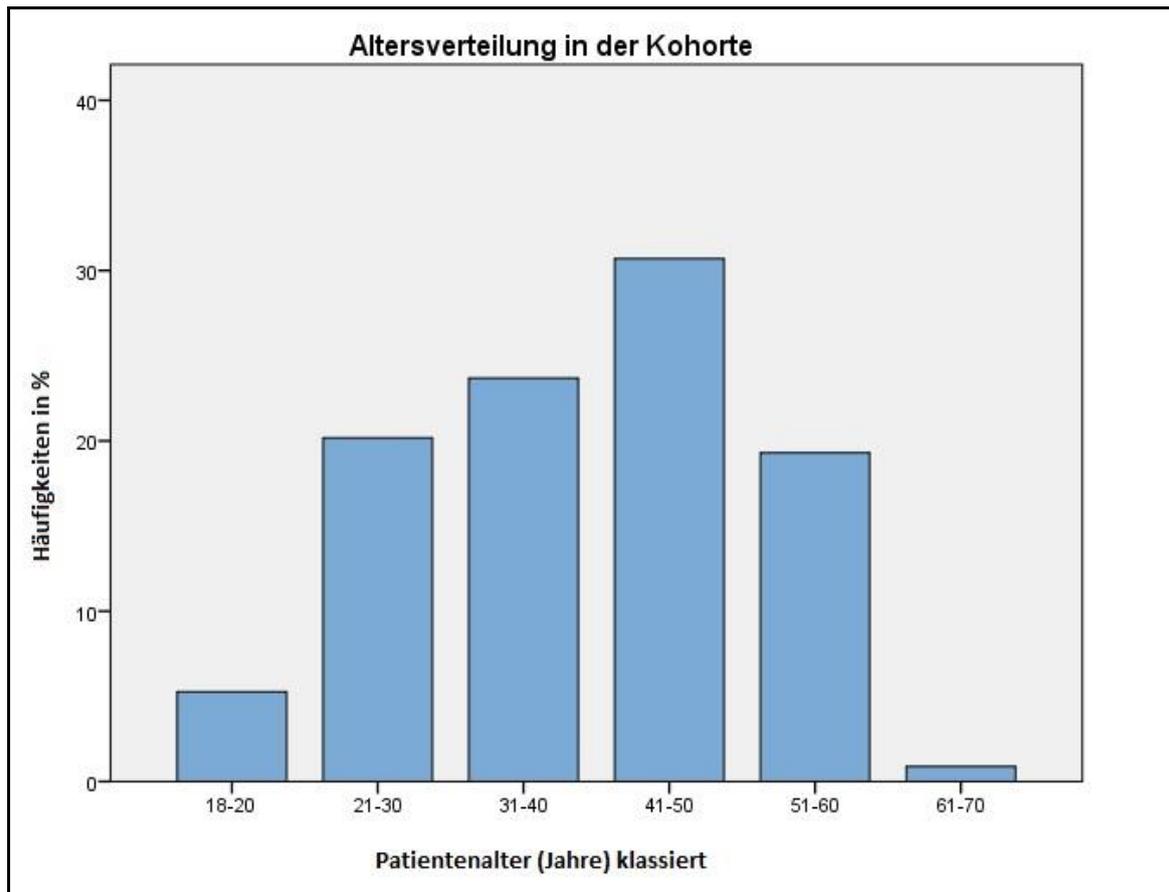


Abbildung 7 Altersgruppen in der Patientenkohorte (n = 114) zum Zeitpunkt der Stammzelltransplantationen, die zwischen 1997 und 2002 an den Zentren Berlin, Erlangen, Hannover, Heidelberg, München, Mainz, Regensburg, Ulm und Wiesbaden durchgeführt wurden. 18-20 Jahre (n = 6), 21-30 Jahre (n = 23), 31-40 Jahre (n = 27), 41-50 Jahre (n = 35), 51-60 Jahre (n = 22), 61-70 Jahre (n = 1).

2.2 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der Daten diente die Software SPSS Statistics für Windows®, Versionen 17 und 20 ® (IBM, New York, USA), Microsoft® Office Excel 2003 SP3 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) sowie das frei verfügbare Statistikprogramm R (The R Foundation for Statistical Computing, GNU project, Wien, Österreich).

Zum Vergleich der Allelhäufigkeiten eignete sich die Anwendung des Chi-Quadrat-Tests hier aufgrund der zu niedrigen Anzahl an Fällen in den einzelnen Gruppen nicht. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde nach der Methode des exakten Tests nach Guo und Thompson berechnet (Guo et Thompson 1992).

Die univariate Analyse des Gesamtüberlebens (engl.: overall survival, OS) und des krankheitsfreien Überlebens (engl.: disease free survival, DFS) erfolgte anhand von Kaplan-Meier-Kurven (Kaplan et Meier 1958). Bei der Kaplan-Meier-Methode werden Personen, die aus der Studie ausscheiden, ohne dass ein Endpunkt eingetreten ist, zensiert. Somit gehen diese Personen der Studie nicht komplett verloren, sondern können bis zum Tag der Zensur mitgerechnet werden. Mit Hilfe des Logrank-Tests (Bland et Altmann 2004) wurden die entstandenen Überlebenszeitenkurven verglichen. Hierbei wird der gesamte Beobachtungszeitraum beachtet und die Signifikanz der Unterschiede als p-Wert dargestellt. Statistische Signifikanz bestand zum Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$. Zum Vergleich verschiedener Ausprägungsgrade innerhalb eines Merkmals wurde das Cox-Regressionsmodell (Ziegler et al. 2007), basierend auf dem Konzept der Hazardrate (HR), angewendet.

In die multivariate Analyse wurden alle Kovariaten mit möglichem Einfluss auf die Endpunkte eingeschlossen (Geschlecht des Patienten, Geschlechtskompatibilität, Diagnose, Konditionierungsschema (myeloablativ oder RIC), Stammzellquelle (BM oder PBSC), Krankheitsstadium (ordinal), Alter des Patienten bei Transplantation, GvHD-Prophylaxe (Methotrexat plus Cyclosporin A oder Andere). Dann wurde unter Hinzunahme der zu untersuchenden Variable getestet, ob ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Variable und der Zielgröße besteht. Hierzu bietet sich die Cox Regressions-Analyse an, da sich hiermit der Einfluss verschiedener Kovariablen auf die Überlebenszeit untersuchen lässt. Durch das parallele Betrachten der Einflussfaktoren werden Verzerrungen durch Störfaktoren vermindert. Es wurde hier die Cox-Regression mit der schrittweisen Rückwärts-Prozedur nach der Wald-Methode angewendet (Einschluss oder

Elimination von Kovariaten basierend auf der Signifikanz des Wald-Tests). Durch schrittweisen Ausschluss von Kovariaten mit zu geringer Signifikanz ($p > 0,1$) konnte das beste Modell ausgewählt werden. Aus den Regressionskoeffizienten lassen sich die Hazard-Raten als Maß für die Stärke des Zusammenhangs berechnen. Voraussetzung zur Durchführung der Cox-Regression ist der proportionale Verlauf der Hazardraten der zu vergleichenden Kovariaten im Zeitverlauf. Die Proportionalitätsprüfung wurde anhand der Kaplan-Meier-Kurven durchgeführt. Die mittlere Überlebenszeit war geprägt von einer hohen Variabilität, es wurde daher beim Vergleich der Überlebenszeiten immer der mediane Wert verwendet.

Zur Berechnung kumulativer Inzidenzen konkurrierender Ereignisse ist die Kaplan-Meier-Methode ungeeignet, da sie die Unabhängigkeit der Ereignisse voraussetzt. Zur univariaten Beurteilung und zum Vergleich der konkurrierenden Endpunkte aGVHD, Relapse und TRM dienten die mit Hilfe des R-Statistik Programms und des cmprsk Package (Gray 2007) erstellten kumulativen Inzidenzen. Für die multivariate Analyse der sekundären Endpunkte kam die Methode der multivariaten Regressionsanalyse in Anwesenheit kompetitiver Risiken nach Fine und Gray (1999) sowie Klein und Anderson (2005) zur Anwendung (Scrucca et al. 2007, Scrucca et al. 2010). Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz innerhalb der Analyse diente der Gray's Test (Gray 1988). Die Termine zur Nachuntersuchung waren nicht festgelegt. Die Nachbeobachtungszeit war der Zeitraum zwischen dem Transplantationsdatum und dem Eintreten eines Endpunktes, oder wenn keiner der Endpunktes eintrat, bis zum Tag der letzten Nachuntersuchung.

2.2.1 Studienendpunkte

Als primäre Endpunkte wurde das Gesamtüberleben (engl.: overall survival, OS) definiert, das den Zeitraum vom Tag der Transplantation bis zum Zeitpunkt des Versterbens gleich welcher Ursache erfasst, sowie das krankheitsfreie Überleben (DFS, engl.: disease free survival), das definiert ist als der Zeitraum vom Tag der Transplantation bis zum Auftreten eines Rezidivs oder bis zum Eintreten des Todes bzw. dem Studienende. Sekundäre Endpunkte waren das Auftreten der akuten Graft-versus-Host Krankheit (engl.: acute graft-versus-host disease, aGvHD), das Erleiden eines Krankheitsrückfalls (engl.: Relapse, Rel) und die Transplantationsassoziierte Mortalität (TRM). TRM ist definiert als das Versterben während einer kompletten Remission innerhalb des ersten Jahres nach Tx. Die aGvHD ist definiert als das Auftreten der aGvHD < 100 Tage nach Transplantation. Sie wird nach Ausprägung und Anzahl der befallenen Organe in vier Schweregrade eingeteilt. Zunächst

erfolgt eine Einteilung des Schweregrades für jedes einzelne Zielorgan (Przepiorka et al. 1995).

Hierbei wird die Haut nach Prozentsatz der betroffenen Körperfläche (KOF) eingeteilt:

- Stadium 1 - Makulopapulöses Exanthem < 25 % der KOF
- Stadium 2 - Makulopapulöses Exanthem oder Erythem 25 - 50 % der KOF
- Stadium 3 - Generalisiertes Erythem oder makulöses, papulöses, oder vesikuläres Exanthem mit bullöser Ausprägung oder Hautabschuppung von > 50 % der KOF
- Stadium 4 - Generalisierte exfoliative Dermatitis oder bullöses Exanthem

Die Beteiligung der Leber wird nach der Serumkonzentration des Bilirubin beurteilt:

- Stadium 1 - Bilirubin 2 bis 3 mg/dL
- Stadium 2 - Bilirubin 3 bis 6 mg/dL
- Stadium 3 - Bilirubin 6 bis 15 mg/dL
- Stadium 4 - Bilirubin > 15 mg/dL

Die Beteiligung des Gastrointestinaltrakts wird nach der Stuhlmenge beurteilt:

- Stadium 1 - Diarrhö 500 bis 1000 mL/Tag
- Stadium 2 - Diarrhö 1000 bis 1500 mL/Tag
- Stadium 3 - Diarrhö 1500 bis 2000 mL/Tag
- Stadium 4 - Diarrhö > 2000 mL/Tag oder Schmerzen oder Ileus

Nach Schweregradbeurteilung der einzelnen Organe erfolgt dann die Einstufung in den klinischen Gesamtschweregrad der aGvHD. Dieses sogenannte Grading erfolgt nach der Glucksberg - Skala in vier Stadien (Glucksberg et al. 1974).

- Grad I: Haut Stadium 1 oder 2, keine Beteiligung von Leber oder GIT
- Grad II: Beteiligung von Leber oder GIT bis Stadium 1, Stadium 1 - 3 der Haut
- Grad III: bis Stadium 4 der Leber, bis Stadium 3 der Haut oder des GIT
- Grad IV: Stadium 4 in einem der drei Zielorgane

Die sekundären Studienendpunkte aGvHD, Relapse und TRM konkurrieren in ihrem Auftreten nach Transplantation. Kompetitive Risiken waren für die aGvHD das Fortschreiten der Erkrankung aufgrund jeglicher anderer Ursachen, für TRM wurde ein Rückfall als kompetitives Risiko betrachtet und für einen Rückfall wurde Tod durch eine andere Ursache als kompetitives Risiko definiert (s. Tabelle 2).

Tabelle 2 Übersicht über primäre und sekundäre Studienendpunkte und ihre jeweiligen konkurrierenden Ereignisse. OS = Gesamtüberleben (engl.: Overall survival), DFS = Krankheitsfreies Überleben (engl.: disease free survival), aGvHD = akute Graft-versus-Host-Krankheit (engl.: acute Graft-versus-Host disease)

Endpunkte	Definition	Kompetitive Risiken
Gesamtüberleben (OS)	Zeit bis zum Versterben gleich welcher Ursache. Bei Überleben bis zum Ende der Beobachtungszeit gilt als Status "überlebt"	Keine
DFS	Zeit bis zum Relapse, Tod ohne Krankheitsrückfall oder bis zum Ende der Beobachtungszeit	Keine
aGvHD	Auftreten der GvHD < 100 d nach Tx	Auftreten eines Relapse und Tod durch jede andere Ursache
Krankheitsrückfall (Relapse)	Auftreten eines Relapse	Tod durch andere Ursachen als Relapse
TRM	Versterben während Remission/ Tod nicht durch Relapse bedingt, < 365 d nach Tx	Relapse bzw. Tod durch jede andere Ursache

2.2.2 Risikofaktoren

Die bei der Studie beobachteten Vorgänge sind komplex und es liegen multiple Faktoren zugrunde, die potenziell die definierten Zielgrößen beeinflussen. In den Analysen wurden folgende Risikofaktoren beachtet: Geschlecht des Patienten, Geschlechtskompatibilität, Diagnose (ALL, AML, CML, MDS/MPN, Andere), Konditionierungsschema (myeloablativ oder RIC), Stammzellquelle (BM oder PBSC), Krankheitsstadium (ordinal), Alter des Patienten bei Transplantation, GvHD-Prophylaxe (Standard oder niedrig dosiert).

2.3 Labormaterial

In Tabelle 3 werden alle verwendeten Materialien mit ihrer genauen Bezeichnung und ihrem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Labormaterialien.

Abkürzung	Exakte Bezeichnung	Hersteller
8-Kanalpipette	Eppendorf Research® (variabel) 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Abzugshaube	mc6 Elektromodul	Waldner Holding GmbH und Co.KG, Wangen, Deutschland
Agarose Biozym	Agarose Biozym LE	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Becherglas	Becherglas 800ml, Duran Retrace Code 01252001	Schott AG, Mainz, Deutschland
BigDye® Puffer	BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
BigDye® Terminator	BigDye® Terminator v1.1	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Boratpuffer	Borsäure 900nM, EDTA 25nM, Titriplex III und Tris(hydroxymethyl)aminoethan 900nM	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CleansSeq-beads	Agencourt CleanSeq	Beckman Coulter, Brea, USA
Dest. Wasser	LiChrosolv® Wasser (Aqua destilliert)	Merck KGaA, Darmstadt,

		Deutschland
DNA Isolierung	Chemagic Magnetic Separation Module I (MSM I)	Chemagen Biopolymer- Technologie AG, Baesweiler, Deutschland
Drucker	Digital Graphic Printer UP-D897 von Sony	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Druckerpapier	Druckerpapier für Thermodrucker UPP-110S	Sony, Deutschland
Elektrophorese- kammer	Gel-Elektrophoresekammer: Prod.No 501	Universitätsklinikum Heidelberg, Institut für Immunologie, Deutschland
Erlenmayer- Kolben	Erlenmayer-Kolben 500ml, Duran Retrace Code 00788967	Schott AG, Mainz, Deutschland
Ethanol	96 %iges Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid 0,07 %	Inno-Train Diagnostik GmbH, Kronberg, Deutschland
ExoSap-It®	ExoSap-It® For PCR Product Clean-up	USB Corporation, Cleveland, USA. Bestellnr.: 78250
Gefrierschrank	Sanyo VIP MDF-U53V	Sanyo House, Watford/Herts, UK
HPLC-Wasser	HPLC-Wasser (HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatogra- phie, engl.: high performance liquid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

	chromatography)	
Kapillar-Sequenzier-automat	3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Klebefolie für PCR-Platte	Klebefolie für 96-well Platten, Cat# AB-0558, Adhesive PCR Film,	Thermo Scientific, ABgene, Epsom, UK
Kühl-und Gefrierschränke	Modelle Premium, Comfort und Profi-Line	Fa. Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Magnetplatte für Sequenzierautomaten	Direct Inject Plate	GEC biotech, Holland
Mastermix	Ammoniumsulfat, Tris Puffer, Magnesiumchlorid, Glycerin, dNTP's und Cresol-Red Markerfarbstoff	Hersteller: DRK BSD
Multistepper	Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR Ex 2-4 fwd	PCR-I1-fwd (Konz.: 100,0 µM) 5'-TCC TCG TTC TTG TCC CTT TGC-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
PCR Ex 2-4 rev	PCR-E5-rev (Konz.: 100,0 µM) 5'-CAG CTG ATG TTT TCT TCT TAC AAC-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland

PCR Ex 5 fwd	PCR-E4-fwd gen (Konz.: 100,0 µM) 5'-ACC TGC TAC ATG GAA CAC AGC-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
PCR Ex 5 rev	PCR-I5-rev (Konz.: 100,0 µM) 5'-CCC ATT CCC TTC CCA AAT TCC-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
PCR Primer-Mix	Konz.: 100,0 µM	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
PCR-Platte 96	ABgene PCR-Plates Thermo-Fast®96, non skirted	Abgene Limited, Epsom, UK
Pipetten	Eppendorf Reference® (variabel) 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	0,5-10µl Plastibrand® Filter Tips	Brand GmbH+Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl Safe Seal-Tips® Premium	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Pipettierroboter	Multiprobe II, Liquid Handler	Perkin Elmer, Waltham, USA
Präzisionswaage	Scout Pro 2000g	Ohaus Waagen Vertriebs GmbH, Giessen, Deutschland
Reaktionsgefäß	1,5 ml-Reaktionsgefäß, Prod. No 0030125.150	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Seq E2 fwd	E2-fwd-seq (Konz.: 100,0 µM) 5'-ATT TCC TGC CCC AGG AAG GTT GG-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
Seq E2 rev	E2-rev-seq (Konz.: 100,0 µM) 5'-GTG CCG GCT CAC CTC CCC TGC T-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
Seq E3 fwd	E3-fwd-seq (Konz.: 100,0 µM) 5'-TTC GGG AAT GGA GAA GTC ACT GC-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
Seq E3 rev	E3-rev-seq (Konz.: 100,0 µM) 5'-CAA CTC TAG CAG AAT TGG AGG GAG-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
Seq E4 fwd	E4-fwd-seq (Konz.: 100,0 µM) 5'-AAG AGA AAC AGC CCT GTT CCT CTC C-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
Seq E4 rev	E4-rev-seq (Konz.: 100,0 µM) 5'-TCC CTG CTG TCC CTA CCC TG-3'	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
Auswertungs- software für Sequenzierung	Sequence Pilot software	JSI medical systems GmbH, Freiburg, Deutschland
Sequenzier- platte	ABI PRISM™ 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode Part.No.4306737	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Skalpell	Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan

Spannungsversorger für Gel-Elektrophorese	Pharmacia Biotech EPS 300	Pharmacia Biotech AG, Uppsala, Schweden
Stripes	Domed Cap Strips, Cat.# SP-0216	Thermo Scientific, ABgene, Epsom, UK
Taq-Polymerase	Taq DNA Polymerase, 5units/ μ l Mat.Nr.1005476	Qiagen, Hilden, Deutschland
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Thermocycler	PTC-200, MJ Research Ltd.	Watertown, MA, USA
Thermocycler	peqSTAR	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermometer	Standard Glasthermometer Best.nr.E737.1	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Tischzentrifuge (für 1,5ml Eppendorf-Tubes):	Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transilluminator	Fluoreszenz-Imager + PC (zur Geldokumentation): AlphaImager AlphaImmotech	Biozym scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3SR Plus	Heraeus Holding GmbH, Hanau,

		Deutschland
--	--	-------------

2.4 Labordiagnostik

2.4.1 DNA

Die DNA-Proben waren mittels eines kommerziellen Kits der Firma Chemagen extrahiert worden und standen in tiefgefrorener Form zur Verfügung.

2.4.2 PCR-SSP

Bei der PCR-SSP (engl.: Polymerase chain reaction; SSP = sequence-specific priming) erfolgt eine enzymatische in-vitro-Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzabschnitte durch zyklisch durchgeführte DNA-Strangseparation und anschließender Primeranlagerung mit nachfolgender Neusynthese des jeweils komplementären Strangs. Die Festlegung des ausgewählten DNA-Sequenzabschnitts erfolgt durch den Einsatz flankierender Oligonukleotide (Primer).

2.4.2.1 Arbeitsschritte

Pro Ansatz wurden die DNA-Proben von 8 Spender-und Empfängerpaare (= 16 Proben) vervielfältigt. Für eine DNA-Probe wurden folgende Mengen an Reagenzien verwendet:

18 µl Mastermix

0,2 µl (10 units) Taq-Polymerase

2 µl PCR Primer Mix (Endverdünnung: 9009 nmol)

2 µl DNA

Die entsprechende Menge für 18 Proben wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gemischt:

324 µl Mastermix

3,6 µl (180 units) Taq-Polymerase

36 µl Primer-Mix

Zur Amplifikation des Exons 2-4 bestand der PCR Primer-Mix aus folgenden Komponenten:

180 µl HPLC-Wasser

10 µl PCR-II-fwd (5'-TCC TCG TTC TTG TCC CTT TGC-3')

10 µl PCR-E5-rev (5'-CAG CTG ATG TTT TCT TCT TAC AAC-3')

In der Endverdünnung ergab sich für die Primer je eine Konzentration von 5000 nmol.

Vom entstandenen Gemisch wurden je 20 µl pro Well auf PCR-Platten pipettiert, welche vorher eindeutig und mit wasserfestem Stift beschriftet wurden. Nun wurden pro Well 2 µl DNA eines Probanden zugefügt. Mit den bereits enthaltenen 20 µl ergab sich ein Reaktionsvolumen von 22,2 µl pro Well. Nach Zugabe der DNA musste besonders zügig gearbeitet werden, um das Einsetzen unkontrolliert ablaufender Reaktionen zu vermeiden, die zur Verfälschung der Ergebnisse hätten führen können. Der Probensatz wurde in der Zentrifuge abzentrifugiert (500 U/min) und anschliessend im Thermocycler mit folgendem Programm bearbeitet:

1. 96°C: 2 min
 2. 94°C: 10 sek
 3. 65°C: 1 min
 4. 94°C: 10 sek
 5. 61°C: 50 sek
 6. 72°C: 30 sek
 7. 72°C: 10 min
 8. 4°C: Unendlichschleife
- } 10 Zyklen
- } 30 Zyklen

Nach Strangseparation durch Temperaturerhöhung auf 94-96°C erfolgte bei Abkühlung auf 61 °C die Anlagerung der Primer an komplementäre Sequenzen auf der Matrizen-DNA. Die anschließende Neusynthese des komplementären Strangs bei 72°C wurde mittels der thermostabilen Taq-Polymerase durchgeführt. Durch den exponentiellen Amplifikationsverlauf werden theoretisch 2^n Kopien der Matrizen-DNA nach n Zyklen synthetisiert. Tatsächlich jedoch unterliegt die Amplifikationseffizienz einem Plateaueffekt und es wird die theoretisch erwartete Molekülzahl nicht erreicht. Nach Ablauf des Programms im Thermocycler wurde das PCR-Amplifikat bei 4 °C gelagert.

Im Anschluss wurde die PCR für das Exon 5 nach dem beschriebenen Schema wiederholt. Hierbei wurde der PCR Primer-Mix aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

180 µl HPLC-Wasser

10 µl PCR-E4-fwd gen (5'-ACC TGC TAC ATG GAA CAC AGC-3')

10 µl PCR-I5-rev (5'-CCC ATT CCC TTC CCA AAT TCC-3')

2.4.3 Gelelektrophorese

Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese diente der Überprüfung der Qualität des PCR-Amplifikats vor der Weiterverarbeitung. DNA ist bei neutralem pH-Wert ein negativ geladenes Molekül. Zwar sind zwei der drei sauren OH-Gruppen der Phosphate mit den jeweils benachbarten Desoxyribosen verestert, die dritte jedoch gibt bei neutralem pH-Wert ein Proton ab, was die negative Ladung bewirkt. Diese physikalische Eigenschaft der DNA macht man sich bei der Gelelektrophorese zunutze.

2.4.3.1 Herstellung des Boratpuffers

Mit einer Präzisionswaage wurden zunächst 544,6g Tris(hydroxymethyl)aminoethan, 278,0g Borsäure und 46,52g EDTA abgewogen. Diese Substanzen wurden dann in 5000ml destilliertes Wasser eingerührt, bis sie vollständig gelöst vorlagen. Zur Verdünnung des hergestellten Puffers um den Faktor 10, wurden je 100ml Boratpuffer mit 1000ml destilliertem Wasser verdünnt.

2.4.3.2 Herstellung des 2 %-igen Agarose Gels

Zunächst wurde ein Becherglas (Volumen: 800ml) mit 300ml Boratpuffer befüllt. Hinzu kamen zuvor abgewogene 6g Agarose. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und zwischendurch geschwenkt, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Anschließend wurde das Becherglas unter fließend kaltem Wasser bis auf 60° Celsius abgekühlt. Für die folgenden Schritte war das Tragen geeigneter Schutzkleidung notwendig, da es sich bei Ethidiumbromid (EtBr) um einen potenziell kanzerogenen Arbeitsstoff der Kanzerogenitäts-Kategorie 3B handelt. Es wurde daher unter einer Abzugshaube weitergearbeitet. Es wurden dann 6 Tropfen 0,07 %iges EtBr in die Agaroselösung gegeben und durch Schwenken eine gute Durchmischung erreicht. Nun wurde das Gemisch in eine spezielle Form mit darin enthaltenen Gelkämmen gegossen. Innerhalb von ca. 30 Minuten verfestigte sich das Gel und man konnte die Gelkämme entfernen, deren Abdruck dann die später zu befüllenden Gelkammern ergab. Das Agarosegel konnte nun vorsichtig, da es sehr leicht reisst, in eine Laufkammer gegeben werden, die dann mit Boratpuffer befüllt wurde.

2.4.3.3 Elektrophoretische Auftrennung

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurden von jedem Well der PCR-Platte 8 µl des PCR-Amplifikates entnommen und mit einer 8-Kanalpipette auf eine frische PCR-Platte pipettiert. Pro Well wurden nun per Multistepper 4 µl Loading Buffer hinzugefügt.

Bei den folgenden Arbeitsschritten war wegen Kanzerogenität streng auf das Tragen von Handschuhen zu achten. Das vorbereitete Agarose-Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und einige Zentimeter mit ionischem Puffer bedeckt. Nun wurde der Inhalt der Wells (je 12 μ l) in die vorhandenen Vertiefungen im Gel pipettiert, die Wanne anschliessend mit einem Deckel verschlossen und die Elektroden angeschlossen. Bei einer Spannung von ca. 150 Volt wandern die negativ geladenen Moleküle (Anionen) zur Anode. Da die kleinsten und daher mobilsten Moleküle am schnellsten wandern, kommt es zu einer Auftrennung des Gemischs in Abhängigkeit von der Länge der DNA-Stränge. Die Elektrophorese wird erst beendet, wenn die kleinsten Moleküle das Ende des Gels erreichen. Das garantiert die bestmögliche Auftrennung des Amplifikats. Anschliessend wurde das verwendete Gel vom unverbrauchten Gel mit einem Skalpell abgeschnitten, aus der Wanne genommen und im Transilluminator mit UV-Licht betrachtet. Die Visualisierung der DNA-Moleküle unter UV-Licht entsteht hierbei durch den Fluoreszenzfarbstoff EtBr, der zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert und unter ultraviolettem Licht sichtbar wird. Hierdurch ließ sich nachweisen, ob die vorangegangene PCR erfolgreich gewesen war.

2.4.4 Denaturieren

Die restlichen 12 μ l/Well des PCR-Amplifikats wurden nun durch zweiminütige Erhitzung auf 90 °C im Thermocycler denaturiert, wodurch die DNA-Doppelhelix aufgebrochen wird.

2.4.5 ExoSap-It®

Der nach dem verwendeten Enzymgemisch benannte Arbeitsschritt ExoSap-It dient der Aufreinigung des PCR-Amplifikats. Dabei werden Nebenprodukte wie überschüssige Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und Reste von Primern entfernt, die sonst bei der Weiterverarbeitung v.a. bei der DNA-Sequenzierung mit Hilfe von Fluoreszenz Dye Terminator stören würden. ExoSap-It ist ein Gemisch aus zwei hydrolytischen Enzymen (Exonuklease I und alkalischer Phosphatase) in Pufferlösung. Es wird bei -20°C aufbewahrt, da die Enzyme hitzelabil sind und bei Raumtemperatur langsam ihre Aktivität verlieren würden. Die Exonuklease I baut übriggebliebene einsträngige Primer und andere einsträngige DNA-Nebenprodukte der PCR ab. Die alkalische Phosphatase hydrolisiert unverbrauchte dNTPs des PCR-Amplifikats.

2.4.5.1 Arbeitsschritte

Von der ExoSap-It Enzymmischung wurden 3 µl/Well direkt ins PCR-Amplifikat gegeben. Da die Enzyme des ExoSap-It in der bei der PCR verwendeten Pufferlösung aktiv sind, musste die Pufferlösung nicht gewechselt werden. Für die Reaktion wurde das Gemisch im Thermocycler unter Ablauf des folgenden Programmes aufgereinigt:

1. Aufreinigung bei 37°C: 15 min
 2. Inaktivierung des ExoSap-It bei 80°C: 15 min
 3. Kühlung bei 4°C
- Ein 15-minütige Erhitzen auf 80 °C am Ende des Programmes sorgte für die Inaktivierung der im ExoSap-it enthaltenen Enzyme.

2.4.6 Cycle Sequenzierung

Die Cycle Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der enzymatischen Kettenabbruchverlängerung von PCR-Produkten mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und wurde 1977 von Sanger et al. entwickelt. Sie dient der Vorbereitung auf die Sequenzierung, bei der mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) die Sequenz der DNA entschlüsselt wird. Als Matrize für die thermostabile DNA-Polymerase dient das spezifisch generierte PCR-Produkt, welches durch Denaturierung bei 96 °C als Einzelstrang vorliegt. Als Startmolekül dient der typspezifisch hergestellte Sequenzierprimer mit einer OH-Gruppe am 3'Ende. Der Sequenzierprimer lagert sich komplementär an (= Annealing) und das thermostabile Enzym beginnt von der Hydroxylgruppe ausgehend die Kettenverlängerung zum Doppelstrang durch Einbau von dNTPs. Dem Enzym wird ein definiertes Gemisch aus dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs für die Elongation angeboten. Dabei wird die Kettenverlängerung immer dann abgebrochen, wenn zufällig ein ddNTP eingebaut wird, da diesem eine OH-Gruppe fehlt. Es entsteht ein Gemisch aus Doppelstrang-DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge, die eine Kopie der Matrize darstellen und mit einem der farblich verschieden markierten ddNTPs Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin enden. Aufgrund der hohen Anzahl an Cycle-Wiederholungen existieren DNA-Fragmente jeder Länge, d.h. sie besitzen der Größe nach geordnet jeweils eine Base mehr, wobei die letzte Base jeweils die fluoreszenzmarkierte ist (s. Abbildung 8). Die entstandenen DNA-Fragmente liegen nicht der Größe nach geordnet, sondern als Gemisch vor. Sie werden in einem späteren Arbeitsschritt im Kapillar-Sequenzier-Automaten elektrophoretisch aufgetrennt und dann mit Hilfe eines Lasers detektiert.

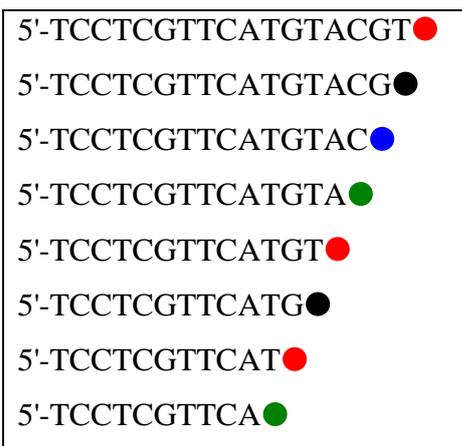


Abbildung 8 Enzymatische Kettenabbruchverlängerung. T = Thymin (rot), C = Cytosin (blau), A = Adenin (grün), G = Guanin (schwarz)

2.4.6.1 Arbeitsschritte

Da der Kapillar-Sequenzier-Automat mit 96-Well Sequenzierplatten arbeitet, wurden bereits die vorbereitenden Läufe im Thermocycler in diesen Sequenzierplatten durchgeführt. In einer Reaktionsplatte kann die DNA von 16 Probanden gleichzeitig bearbeitet werden. Für jeden Proband wurde das Exon 2, 3 und 4 getrennt und, aufgrund der Länge der DNA, mit jeweils einem Vorwärtsprimer (fwP) und einem Rückwärtsprimer (revP) untersucht. Dadurch entstanden pro Proband 6 Gemische mit jeweils unterschiedlichem Primer (s. Tabelle 4). Es wurden 6 Eppendorf-Gefäße verwendet. Jedes Eppendorf-Gefäß wurde entsprechend mit jeweils 27 µl BigDye® Terminator Puffer, 9 µl BigDye® Terminator und 108 µl Primer befüllt.

Tabelle 4 Sequenzierprimer: E = Exon, fwd = vorwärts, rev = rückwärts, A = Adenin, T = Thymin, C = Cytosin, G = Guanin

E2-fwd-seq	5'-ATT TCC TGC CCC AGG AAG GTT GG-3'
E2-rev-seq	5'-GTG CCG GCT CAC CTC CCC TGC T-3'
E3-fwd-seq	5'-TTC GGG AAT GGA GAA GTC ACT GC-3'
E3-rev-seq	5'-CAA CTC TAG CAG AAT TGG AGG GAG-3'
E4-fwd-seq	5'-AAG AGA AAC AGC CCT GTT CCT CTC C-3'
E4-rev-seq	5'-TCC CTG CTG TCC CTA CCC TG-3'

Die Reaktionsplatte wurde mit wasserfestem Stift nach folgendem Verteilungsmuster eindeutig beschriftet (s. Tabelle 5).

Tabelle 5 Verteilungsmuster von Reaktionsgemisch auf der Reaktionsplatte mit Barcode: fwP = Vorwärtsprimer; revP = Rückwärtsprimer; fett gedruckte Zahlen bezeichnen das Ex = Exon; Zahlen in der Tabelle stehen für DNA-Proben 1 – 16. Spalten 1 und 7 enthalten den Exon 2fwP, Spalten 2 und 8 den Exon 2 revP, Spalten 3 und 9 den Exon 3 fwP, Spalten 4 und 10 den Exon 3 revP, Spalten 5 und 11 den Exon 4 fwP, Spalten 6 und 12 den Exon 4 revP.

Ex2 fwP	Ex2 revP	Ex3 fwP	Ex3 revP	Ex4 fwP	Ex4 revP	Ex2 fwP	Ex2 revP	Ex3 fwP	Ex3 revP	Ex4 fwP	Ex4 revP
1	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9
2	2	2	2	2	2	10	10	10	10	10	10
3	3	3	3	3	3	11	11	11	11	11	11
4	4	4	4	4	4	12	12	12	12	12	12
5	5	5	5	5	5	13	13	13	13	13	13
6	6	6	6	6	6	14	14	14	14	14	14
7	7	7	7	7	7	15	15	15	15	15	15
8	8	8	8	8	8	16	16	16	16	16	16

Der Mastermix wurde dann per Pipette mit je 8 µl pro Well auf der Reaktionsplatte verteilt. Anschliessend wurde pro Well 2 µl DNA (PCR-Amplifikat) hinzugegeben. Dies geschah mit einer 8-Kanal-Pipette nach dem in Tabelle 5 beschriebenen Muster. Die Wells wurden dann verschlossen. Um ein blasenfreies Reaktionsgemisch zu erhalten, wurde die Reaktionsplatte vor der Weiterverarbeitung bei 500 U/min abzentrifugiert. Im Anschluss wurde die Reaktionsplatte in den Thermocycler gegeben und mit folgendem Programm weiterverarbeitet:

1. 96°C: 1 min
 2. 96°C: 0:10 min
 3. 50°C: 0:05 min
 4. 60°C: 2:00 min
 5. Kühlung bei 4°C
- } 25 Zyklen

2.4.7 Clean-Seq

Dieser Arbeitsschritt dient der Aufreinigung des bei der Cycle-Sequenzierung entstandenen Produktes. Dabei werden die fluoreszenzmarkierten doppelsträngigen DNA-Fragmente mit Hilfe magnetischer Beads gebunden und überflüssige Moleküle sowie Reste von Primern und überschüssigem BigDye-Terminator entfernt, die in der Kapillarelektrophorese stören würden.

2.4.7.1 Arbeitsschritte

Zur Vorbereitung des Aufreinigungsprozesses wurde die Agencourt CleanSEQ-Lösung, welche die magnetischen Beads enthielt, auf Zimmertemperatur gebracht und gründlich gevortext. Es musste eine homogene Lösung ohne Bodensatz entstehen. Die für eine Reaktionsplatte entsprechende Menge wurde auf 4 Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und im Pipettierroboter auf die vorgesehene Position gestellt. 96 %iges Ethanol wurde mit HPLC-Wasser (engl.: High-performance liquid chromatography) auf 85 % verdünnt und ins vorgesehene Reservoir am Pipettierroboter gefüllt. In ein zweites Reservoir am Pipettierroboter wurde HPLC gefüllt. Die bei der Cycle-Sequenzierung verwendete Reaktionsplatte mit Barcode und dem darin enthaltenen Reaktionsprodukt der Cycle-Sequenzierung wurde in den Pipettierroboter gegeben, der dann auf die 96 Wells jeweils 10 µl CleanSEQ-Lösung pipettierte und im Anschluss 42 µl 85 %-iges Ethanol.

Bei diesem Schritt binden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente an die magnetischen Beads der CleanSeq-Lösung. Nun wurde die Reaktionsplatte kurz dem Pipettierroboter entnommen, mit selbsthaftender Klebefolie zugeklebt und 1 min gevortext. Hierdurch wurde sichergestellt, dass keine Ablagerungen entstanden, welche die folgende Auftrennung durch ein magnetisches Feld gestört hätte. Anschliessend wurde die Folie wieder entfernt und die Sequenzier-Platte im Pipettierroboter auf die Magnetplatte gestellt. Hier wurden die Platten 3 Minuten lang inkubiert, um die Beads durch das magnetische Feld aus der Lösung an die Gefäßwand zu binden. Dann lief das Programm im Sequenzierroboter weiter. Die in den Wells enthaltene Lösung wurde abgesaugt und verworfen. Um eine hohe Qualität an Reinheit zu erreichen, wurde 2x mit 85 %-igem Ethanol nachgespült und wieder abgesaugt. Nur die der Gefäßwand anhaftenden Magnet-Beads mit den DNA-Fragmenten blieben übrig. Dieser Rückstand wurde dann für 10 min an der Luft getrocknet.

Nun sollten die ringförmig der Gefäßwand anhaftenden Partikel wieder in Lösung gebracht werden. Das geeignete Lösungsmittel ist Wasser, da die negativ geladene DNA im als Dipol vorliegenden Wasser eine Hydrathülle bildet, und daher in diesem Medium sehr gut löslich ist. Es wurden im Pipettierroboter 80 µl HPLC-Wasser pro Well hinzugegeben und die Sequenzierplatte vom Magneten genommen. Um eine vollständige Lösung der Moleküle im Wasser zu erreichen, wurde die Sequenzierplatte 1 min gevortext und danach 15 min stehengelassen.

Im Kapillarsequenzierer wurden dann die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Als Trennmedium dienten mit Polymer befüllte

Kapillaren. Die Fragmente wanderten entsprechend ihrer Größe geordnet nacheinander an einem Laser vorbei. Durch den langwelligen 50mW Argon-Laserstrahl angeregt, emittieren die fluoreszenzmarkierten ddNTPs Licht einer jeweils bestimmten Wellenlänge: ddGTP: 540nm, ddATP: 570 nm, ddTTP: 600 nm, ddCTP: 630 nm, welches dann durch ein optisches System registriert werden konnte (s. Abbildung 9). Die hierbei gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Sequence Pilot Software (JSI medical systems GmbH, Freiburg, Deutschland) in Form eines Chromatogrammes sichtbar gemacht, und die Basenabfolge konnte entschlüsselt werden.

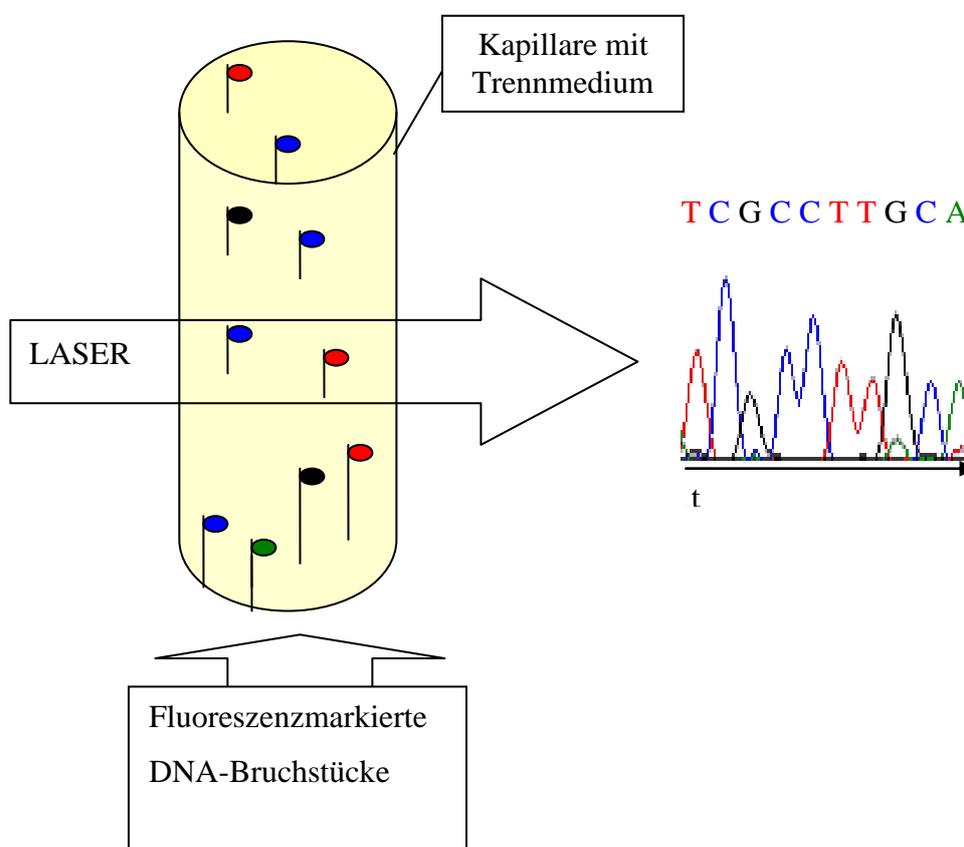


Abbildung 9 Elektrophoretische Auftrennung im Sequenzierautomaten (links) und durch die Sequence Pilot Software sichtbar gemachtes Chromatogramm (rechts), von dem sich die Basenfolge ablesen lässt. DNA = Desoxyribonukleinsäure, T = Thymin (rot), C = Cytosin (blau), A = Adenin (grün), G = Guanin (schwarz) t = Zeit.

2.4.8 Bestimmung des Exon 5

Da nicht alle Allele anhand der Exone 2-4 eindeutig zugeordnet werden konnten, wurde in einem anschließenden Arbeitsschritt analog zur PCR des Exon 2-4, wie bereits erwähnt, zusätzlich das Exon 5 bestimmt. Da die zusätzlich gewonnene Sequenz des Exon 5 nicht nachträglich in die Sequence Pilot Software eingespielt werden konnte, wurde eigens hierzu in Excel ein spezielles Software-Tool entwickelt. Mit Hilfe dieses Programmes

gelang die eindeutige Zuordnung der restlichen Allele. Das hier angewandte Verfahren zur sequenz-basierten Typisierung anhand der Exone 2-5 wurde von unserer Abteilung entwickelt und stellt ein sicheres Verfahren zur akkuraten Sequenzierung dar (Fürst et al. 2011).

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Analyse

3.1.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

In der nachfolgenden Tabelle 6 ist eine Übersicht über die Charakteristika des Patientenkollektivs abgebildet.

Tabelle 6 Charakterisierung des Patientenkollektivs. M = männlich, F = weiblich, ALL = Akute lymphatische Leukämie, AML = Akute myeloische Leukämie, CML = Chronische myeloische Leukämie, MDS/MPN = Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie, Tx = Transplantation. Unter „Andere“ Diagnose sind zusammengefasst: Lymphome, Multiples Myelom/Plasmozytom, Aplastische Anämie und chronisch lymphatische Leukämie; aGvHD = acute graft-versus-host disease (engl.)

Charakteristikum	Anzahl
Patienten	114
Geschlecht	
Männlich	70 (61,4 %)
Weiblich	44 (38,6 %)
Alter bei Tx	41,5 (median) (Spannweite: 18-62 Jahre)
Patient-Spender-Übereinstimmung	
M-M	50 (43,9 %)
M-F	20 (17,5 %)
F-M	24 (21,1 %)
F-F	20 (17,5 %)
Diagnose	
AML	37 (32,5 %)
ALL	22 (19,3 %)
CML	32 (28,1 %)
MDS/MPN	9 (7,9 %)
Andere	14 (12,3 %)
Krankheitsstadium bei Tx	
Früh	47 (41,2 %)
Intermediär	35 (30,7 %)
Fortgeschritten	15 (13,2 %)
Unbekannt	17 (14,9 %)

Stammzellquelle	
Knochenmark	48 (42,1 %)
Periphere Blutstammzellen	66 (57,9 %)
Konditionierungsverfahren	
Myeloablativ	89 (78,1 %)
Reduzierte Intensität	25 (21,9 %)
GvHD-Prophylaxe	
Standard	94 (82,5 %)
Niedrig dosiert	20 (17,5 %)
Todesart	
Relapse/Fortschreiten	25 (21,9 %)
Sekundäre maligne Erkrankung	1 (0,9 %)
Transplantationsbedingt	34 (29,8 %)
Unbekannt	54 (47,4 %)

3.1.2 MICA-Typisierungsergebnisse

Die Genotypisierung des hier verwendeten Kollektivs, bestehend aus 114 Transplantationspaaren (je 114 Stammzellspender und 114 Patienten), ergab die in Tabelle 7 dargestellte Verteilung der verschiedenen MICA-Genotypen, sortiert nach der Häufigkeit in absteigender Reihenfolge. Ein Allel konnte heterozygot oder homozygot vorliegen. 16 verschiedene Allele wurden im untersuchten Kollektiv gefunden. MICA*008 und MICA*002 waren die einzigen Allele, die auch homozygot vorkamen. Bei je 37 der Patienten und 37 Spendern lag MICA*008 homozygot vor. In der Spendergruppe lag außerdem das MICA*002-Allel einmal homozygot vor. Das MICA*008-Allel war mit einer Allelfrequenz von 55,3 % das am häufigsten vorkommende Allel. Es war bei 89 Patienten (78,1 %) vorhanden.

Die Allelhäufigkeiten wurden zum Vergleich einem europäisch-amerikanischen Vergleichskollektiv (Gao et al. 2006) gegenübergestellt. Die Anwendung des Chi-Quadrat-Tests eignete sich hier aufgrund der zu niedrigen Anzahl an Fällen in den einzelnen Gruppen nicht. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde nach der Methode des exakten Tests nach Guo und Thompson berechnet (Guo et Thompson 1992). Der p-Wert (= 0,064) ergab keine statistisch signifikante Abweichung zum Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

(Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$). Die Kohorte befindet sich somit im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 7 Allelverteilung von MICA in der Kohorte. n = number, MICA = MHC class I chain related gene A, Europäisch-amerikanische Vergleichspopulation (Gao et al. 2006), Werte wurden gerundet.

Allelhäufigkeiten						
	Patienten (n = 114)		Spender (n = 114)		Vergleichspopulation (n = 1245)	
MICA*	Allele (n = 228)	%	Allele (n = 228)	%	Allele (n = 2490)	%
008	126	55,3	127	55,7	1079	43,3
002	17	7,5	20	8,8	355	14,3
010	15	6,6	15	6,6	144	5,8
007	13	5,7	11	4,8	126	5,1
009	12	5,3	10	4,4	211	8,5
004	11	4,8	11	4,8	186	7,5
017	9	3,9	8	3,5	28	1,1
023	6	2,6	6	2,6	0	0
016	5	2,2	5	2,2	57	2,3
018	4	1,8	5	2,2	97	3,9
012	4	1,8	4	1,8	48	1,9
011	3	1,3	3	1,3	72	2,9
180	1	0,4	0	0	0	0
019	1	0,4	1	0,4	30	1,2
001	1	0,4	1	0,4	27	1,1
006	0	0	1	0,4	8	0,3
021	0	0	0	0	7	0,3
015	0	0	0	0	5	0,2
030	0	0	0	0	4	0,2
024	0	0	0	0	3	0,1

3.1.2.1 MICA-Übereinstimmung

Bei 12 Transplantationspaaren (= 10,5 %) lag ein MICA-Mismatch vor. Bei allen Paaren handelte es sich um ein inkomplettes Mismatch, d.h. dass Patienten-Spenderpaare im MICA-Genotyp jeweils in einem Allel übereinstimmten und sich im anderen unterschieden. Ob bestimmte Allele häufiger in Mismatching involviert sind als andere, kann aufgrund der geringen Anzahl an Mismatches im untersuchten Kollektiv nicht beantwortet werden. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die Mismatches in der Kohorte.

Tabelle 8 Allele der MICA-Mismatche. MI = mismatch inkomplett. MICA = MHC class I chain related gene A. Differenzen sind fettgedruckt.

Patient-Allel 1	Patient-Allel 2	Spender-Allel 1	Spender-Allel 2	Mismatch
MICA*	MICA*	MICA*	MICA*	
008	008	008	018	MI
008	009	008	006	MI
008	023	008	016	MI
017	007	002	007	MI
010	016	002	010	MI
008	018	008	008	MI
002	008	023	008	MI
008	018	023	008	MI
023	008	008	018	MI
002	007	002	002	MI
007	017	002	017	MI
002	009	002	008	MI

3.2 Analyse des Gesamtüberlebens und des DFS

3.2.1 Univariate Analyse des OS und DFS nach Kaplan-Meier

Das Gesamtüberleben (OS) war der Zeitraum vom Zeitpunkt der Transplantation bis zum Tod des Patienten (unabhängig von der Ursache), bzw. bei Überleben bis zum Zeitpunkt des letzten Nachuntersuchungstermins. Die Transplantationen waren im Zeitraum zwischen Juni 1997 bis Juli 2002 durchgeführt worden, der letzte Nachuntersuchungstermin war der 13.06.2008. Am Ende der Nachbeobachtungszeit lebten noch 31,4 % der Patienten. Die mediane Überlebenszeit lag, berechnet nach Kaplan-Meier, bei 347 Tagen, das mediane krankheitsfreie Überleben lag bei 281 Tagen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug 42,5 %. Die mediane Nachbeobachtungszeit wurde nach der Methode von Schemper und Smith (1996) berechnet und betrug 2580 Tage. Die primären Endpunkte OS und DFS wurden in Abhängigkeit der Übereinstimmung der MICA-Allele untersucht. Außerdem wurde der Einfluss des heterozygoten und des homozygoten Vorhandenseins des am häufigsten vorkommenden Allels, des MICA*008-Allels, auf das OS und das DFS untersucht. Ebenso wurde das Vorliegen des MICA-129-Polymorphismus, welcher zu einer stärkeren Bindung zwischen MICA und seinem Rezeptor führt, untersucht. Wie bereits im Kapitel „Statistische Methoden“ beschrieben, werden bei der Kaplan-Meier-Methode Personen, die aus der Studie ausscheiden ohne dass ein Endpunkt eingetreten ist, zensiert. Zensierte Personen werden in den Diagrammen durch einen kurzen senkrechten Strich abgebildet.

3.2.1.1 OS und DFS in Abhängigkeit der MICA-Allel-Übereinstimmung

Mit Hilfe des Kaplan-Meier-Schätzers wurden Diagramme des OS MICA-gematchter und MICA-gemismatchter Spender-Empfänger-Paare erstellt. Das 5-Jahresüberleben lag in der Gruppe der Mismatche bei 33,3 % und in der Gruppe der Gematchten bei 43,6 %. Über den gesamten Beobachtungszeitraum ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf OS ($p = 0,598$) und DFS ($0,745$) (s. Abbildung 10 u. 11).

Die Überlebensraten nach 1, 3 und 5 Jahren, sowie am Ende des Beobachtungszeitraums sind in Tabelle 9 für das OS und in Tabelle 10 für das DFS am Ende dieses Kapitels zusammengefasst.

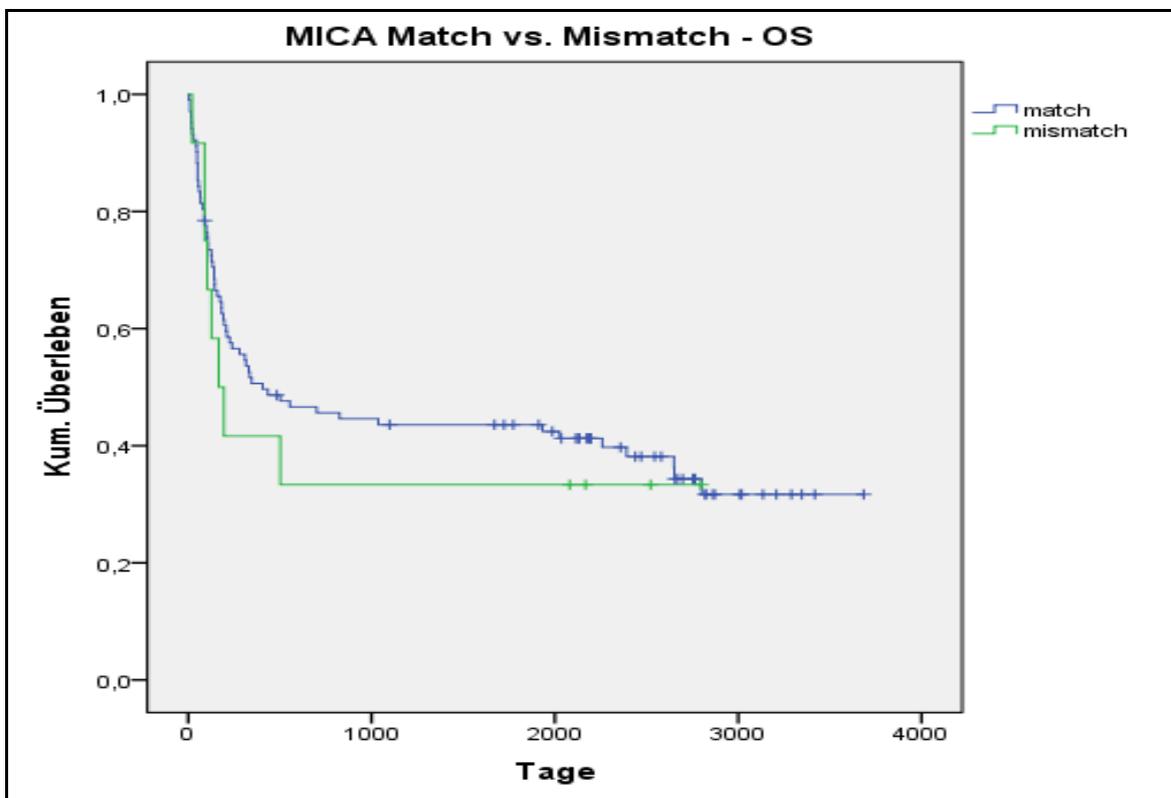


Abbildung 10 Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben (engl.: overall survival, OS) der „MICA-Gematchten“ mit $n = 102$ (blaue Kurve) versus der Gruppe der „MICA-Gemismatchten“ mit $n = 12$ (grüne Kurve), p -Wert = $0,598$; match (engl.): übereinstimmend, mismatch (engl.): nicht übereinstimmend.

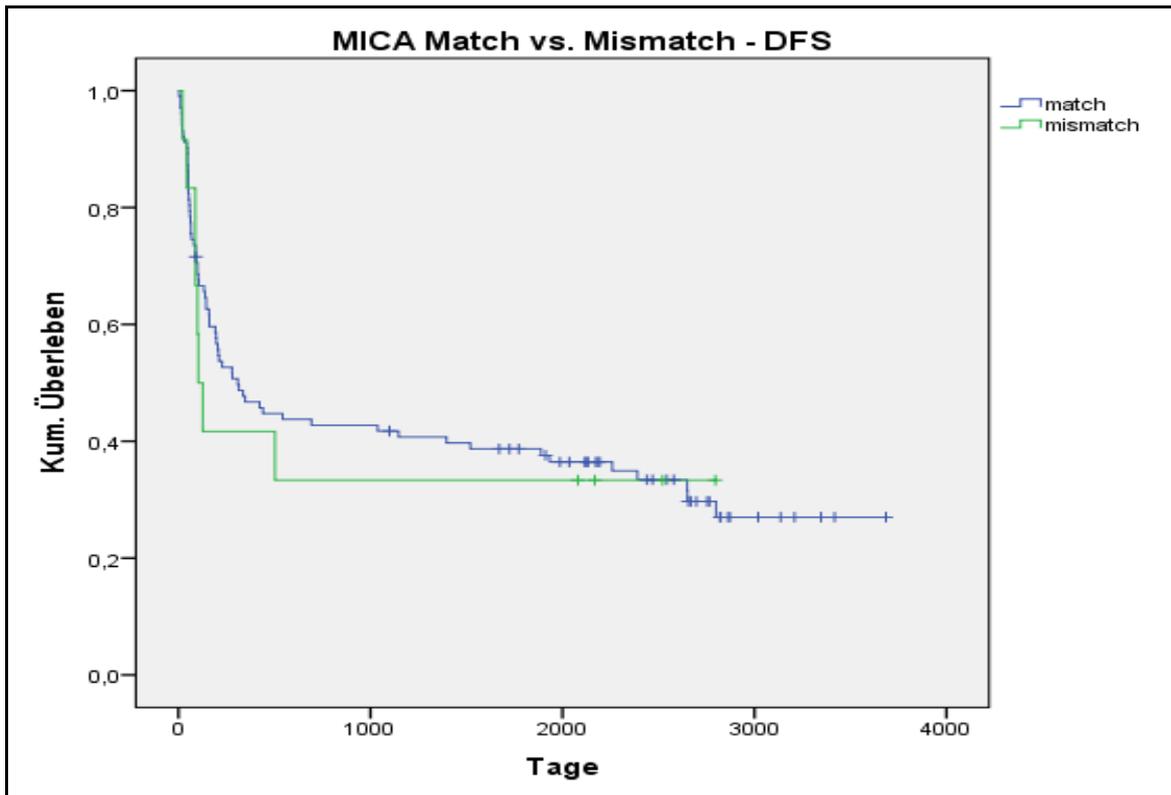


Abbildung 11 Kaplan-Meier-Kurve: Krankheitsfreies Überleben (engl.: disease free survival, DFS) der „MICA-gematchten“ mit n = 102 (blaue Kurve) versus der Gruppe der „MICA-gemismatchten“ mit n = 12 (grüne Kurve), p-Wert = 0,745; match (engl.): übereinstimmend, mismatch (engl.): nicht übereinstimmend.

3.2.1.2 OS und DFS in Abhängigkeit des MICA*008-Allels

Untersucht wurden heterozygote sowie homozygote Träger des MICA*008-Allels im Hinblick auf das Gesamtüberleben und das DFS. Die Allelfrequenz des MICA*008 in der Patientenkohorte betrug 55,3 %. 89 von 114 Patienten (78,1 %) waren MICA*008-Allel-Träger. Bei 37 von ihnen (32,5 %) lag das Allel homozygot vor, bei 52 Patienten (45,6 %) war der Genotyp heterozygot. Das Vorhandensein mindestens eines MICA*008-Allels (MICA*008-Gruppe) zeigte in dieser Analyse keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben oder auf das DFS (s. Abbildungen 12 und 13). Der Vergleich der Gruppen homozygoter MICA*008-Träger (MICA*008 hom-Gruppe) zur Restgruppe mit einem oder keinem MICA*008-Allel ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in Hinblick auf das OS und das DFS (s. Abbildungen 14 u. 15).

Die Überlebensraten nach 1, 3 und 5 Jahren, sowie am Ende des Beobachtungszeitraums sind in Tabelle 9 für das OS und in Tabelle 10 für das DFS am Ende dieses Kapitels zusammengefasst.

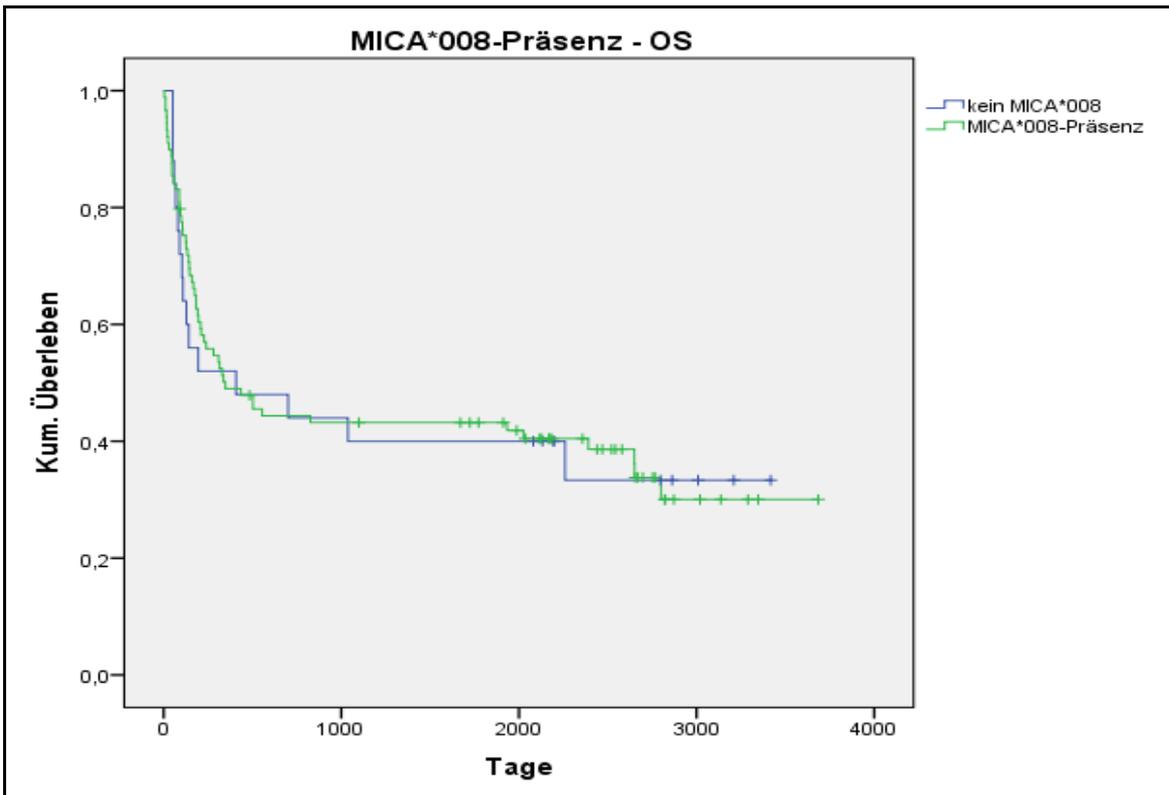


Abbildung 12 Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben (engl.: overall survival, OS) der Gruppe der MICA*008-Allelträger (heterozygot oder homozygot) mit $n = 89$ (grüne Kurve) versus der Restgruppe ohne MICA*008-Allel mit $n = 25$ (blaue Kurve), p -Wert = 0,918.

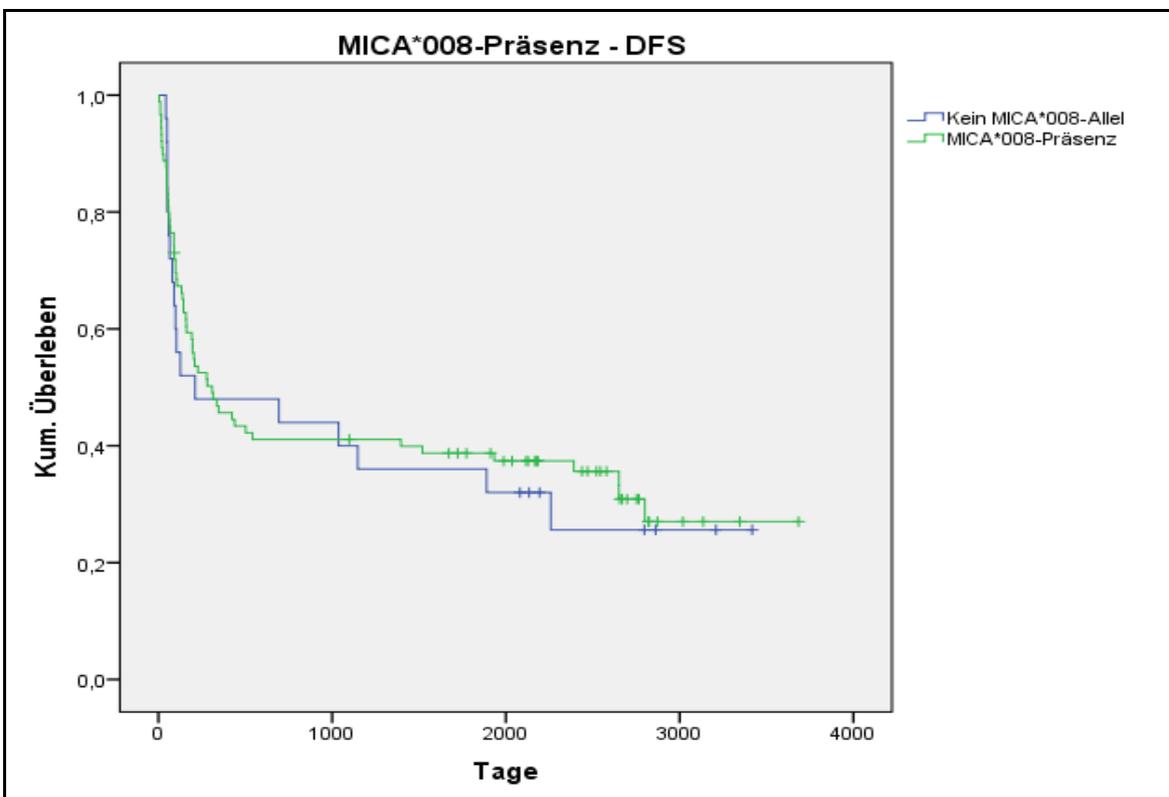


Abbildung 13 Kaplan-Meier-Kurve: Krankheitsfreies Überleben (engl.: disease free survival, DFS) der Gruppe der MICA*008-Allelträger (heterozygot oder homozygot) mit $n = 89$ (grüne Kurve) versus der Restgruppe ohne MICA*008-Allel mit $n = 25$ (blaue Kurve), p -Wert = 0,691.

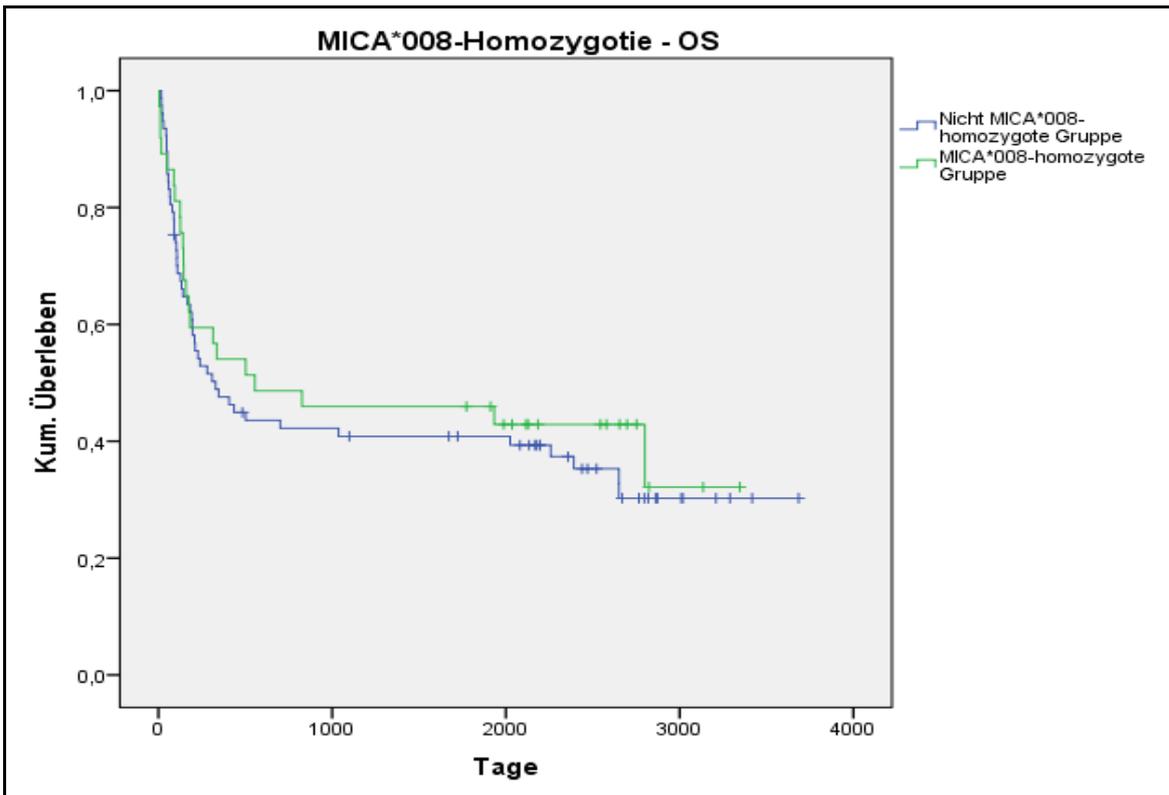


Abbildung 14 Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben (engl.: overall survival, OS) der Gruppe mit homozygotem MICA*008-Allel mit $n = 37$ (grüne Kurve) versus der Restgruppe mit keinem oder nur einem MICA*008-Allel mit $n = 77$ (blaue Kurve), p -Wert = 0,548.

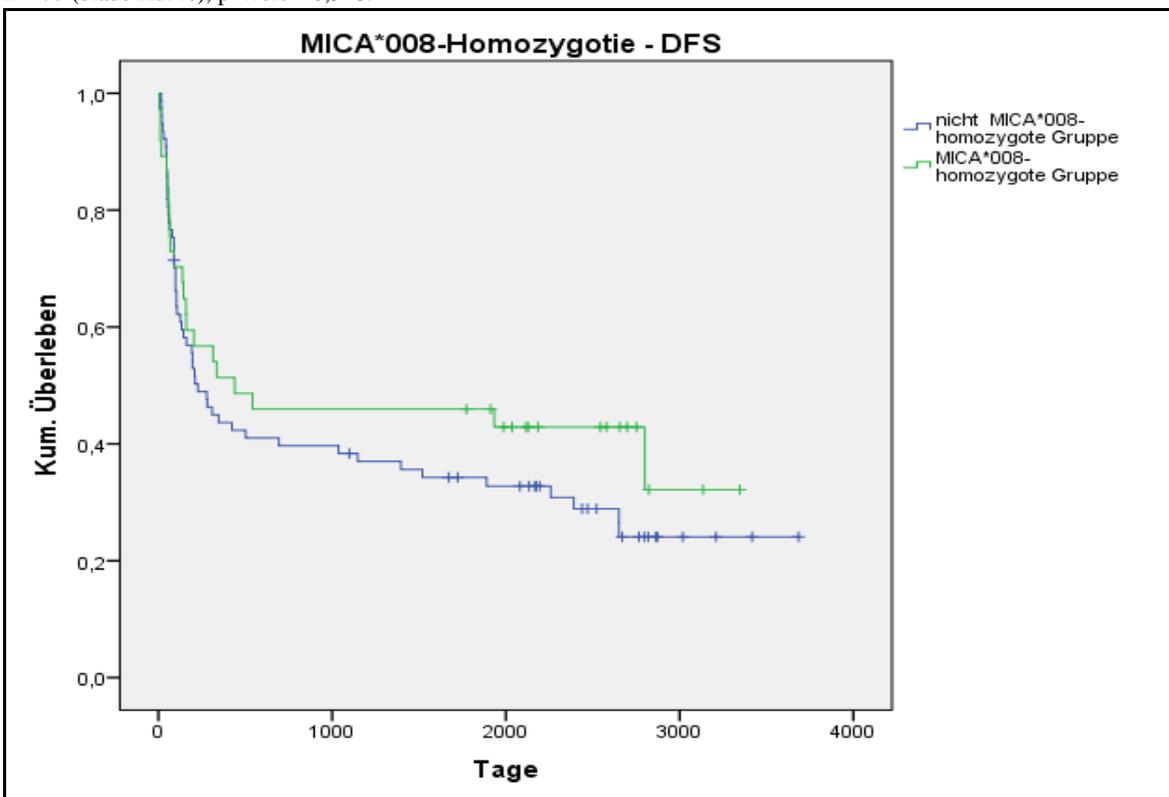


Abbildung 15 Kaplan-Meier-Kurve: Krankheitsfreies Überleben (engl.: disease free survival, DFS) der Gruppe mit homozygotem MICA*008-Allel mit $n = 37$ (grüne Kurve) versus der Restgruppe mit keinem oder nur einem MICA*008-Allel mit $n = 77$ (blaue Kurve), p -Wert = 0,288.

3.2.1.4 Einfluss des MICA-129-Polymorphismus auf OS und DFS

Allele mit Methionin an Position 129 (MICA*001, *007: 129Met-Gruppe) besitzen eine 10- bis 50-fach stärkere Bindungsaffinität zum NKG2D-Rezeptor als Allele mit Valin in dieser Position (MICA*004, *008, *016: 129Val-Gruppe) (Steinle et al. 2001, Pollock et al. 2013). Diese beiden Gruppen wurden daher untersucht, um einen möglichen Einfluss auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben festzustellen. Es gab einen Trend zu schlechterem Überleben und kürzerem krankheitsfreiem Überleben bei stärkerer Bindungsaffinität. In der 129Met -Gruppe lag das mediane Überleben bei 141 Tagen, in der Val129-Gruppe bei 503 Tagen (s. Abbildung 16 und 17).

Die Überlebensraten nach 1, 3 und 5 Jahren, sowie am Ende des Beobachtungszeitraums sind in Tabelle 9 für das OS und in Tabelle 10 für das DFS zusammengefasst.

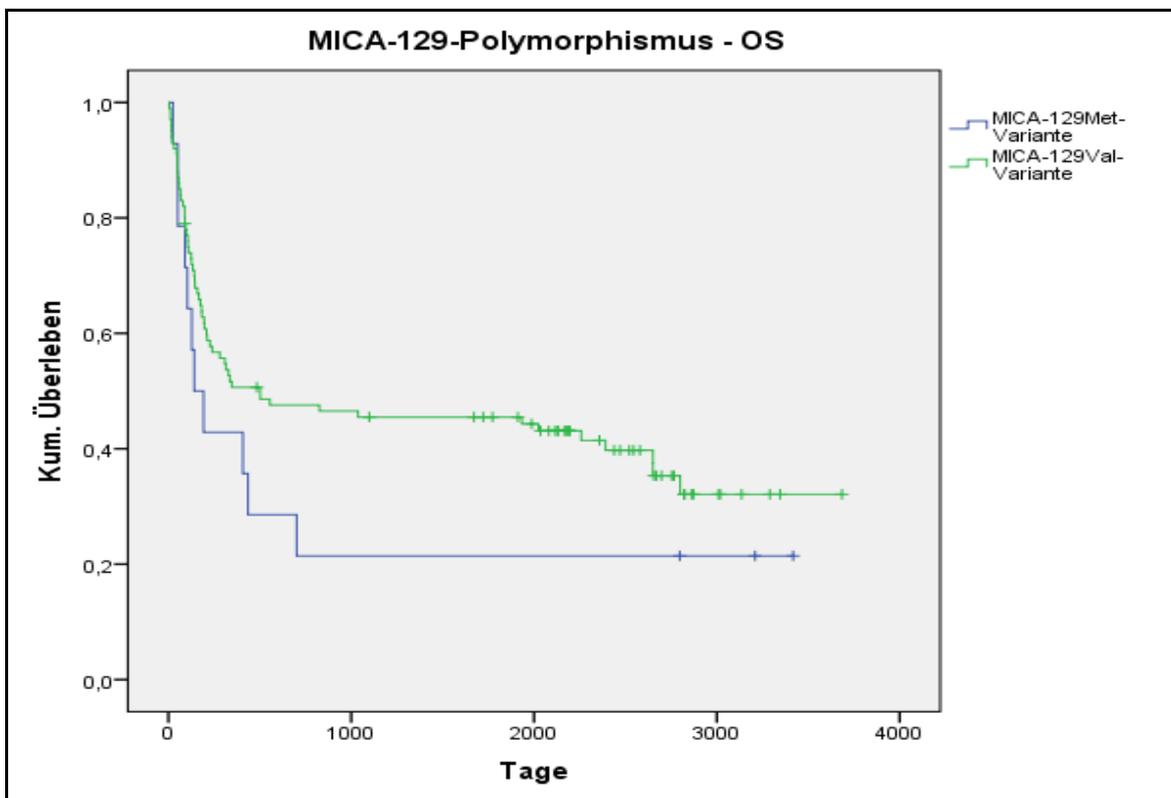


Abbildung 16 Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben (engl.: overall survival, OS) der Gruppe mit stärkerer MICA-NKG2D-Bindungsaffinität (MICA*001, *007) mit n = 14 (blaue Kurve) versus der Restgruppe mit n = 100 (grüne Kurve), p-Wert = 0,213.

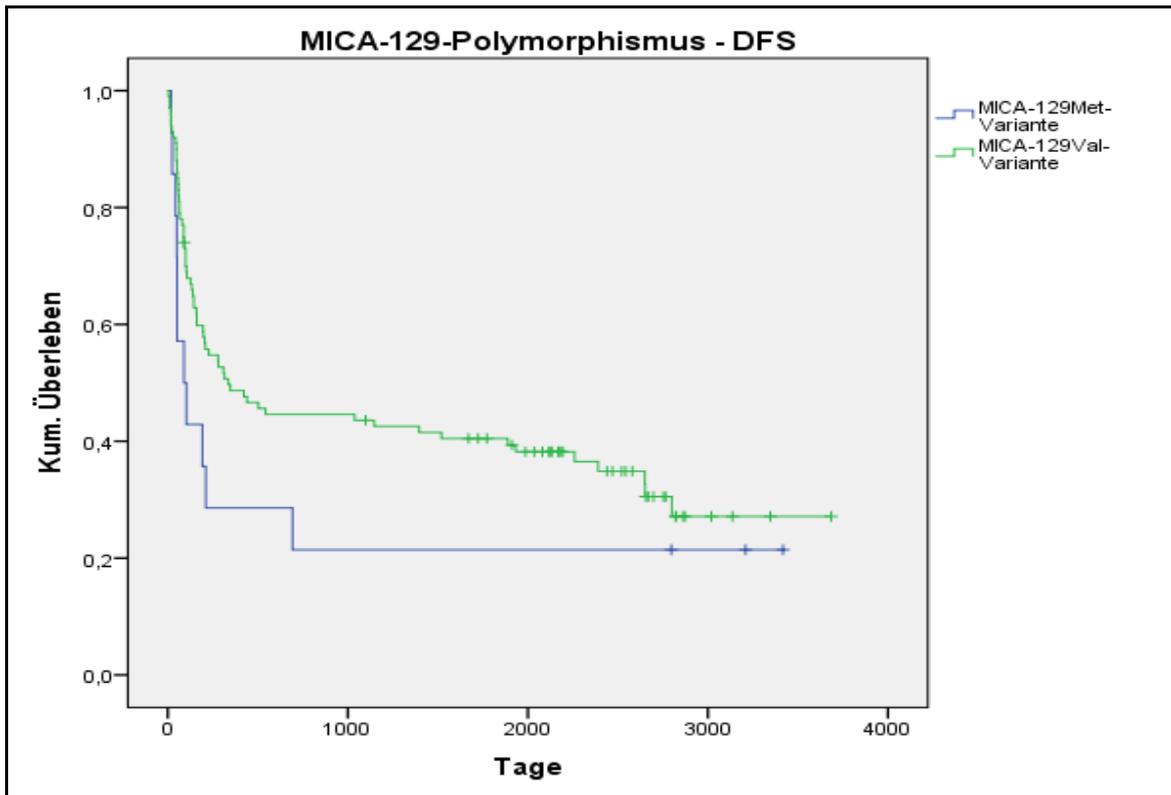


Abbildung 17 Kaplan-Meier-Kurve: Krankheitsfreies Überleben (engl.: disease free survival, DFS) der Gruppe mit stärkerer MICA-NKG2D-Bindungsaffinität mit n = 14 (blaue Kurve) versus der Restgruppe mit n = 100 (grüne Kurve), p-Wert = 0,154.

Tabelle 9 Überlebensraten des Gesamtüberlebens nach 1, 3, und 5 Jahren sowie am Ende des Beobachtungszeitraums. OS (engl.: overall survival), 129Met=Polymorphismus an Position 129(Methionin), 129Val=Polymorphismus an Position 129(Valin)

Überlebensraten OS					
	1-Jahres-OS	3-Jahres-OS	5-Jahres-OS	Gesamt OS	p-Wert
	%	%	%	%	
MICA -Mismatch	41,7	33,3	33,3	33,3	0,598
MICA-Match	50,6	43,6	43,6	31,7	
MICA*008 vorhanden	49	43,2	43,2	30	0,918
MICA*008 Restgruppe	52	44	40	33,3	
MICA*008 homozygot vorhanden	54,1	45,9	45,9	32,2	0,548
MICA*008 homozygot Restgruppe	47,6	42,2	40,8	30,2	
MICA-129Met-Variante	42,9	21,4	21,4	21,4	0,213
MICA-129Val-Variante	50,6	46,5	45,5	32,1	

Tabelle 10 Überlebensraten des krankheitsfreien Überlebens nach 1, 3, und 5 Jahren sowie am Ende des Beobachtungszeitraums. DFS (engl.: disease free survival), 129Met=Polymorphismus an Position 129(Methionin), 129Val=Polymorphismus an Position 129(Valin)

Überlebensraten DFS					
	1-Jahres-DFS	3-Jahres-DFS	5-Jahres-DFS	Gesamt-DFS	p-Wert
	%	%	%	%	
MICA -Mismatch	41,7	33,3	33,3	33,3	0,745
MICA-Match	46,7	41,7	38,7	27	
MICA*008 vorhanden	45,6	41,1	38,7	27	0,691
MICA*008 Restgruppe	48	40	36	25,6	
MICA*008 homozygot vorhanden	51,4	45,9	45,9	32,2	0,288
MICA*008 homozygot Restgruppe	43,7	38,4	34,2	24,1	
MICA-129Met-Variante	28,6	21,4	21,4	21,4	0,154
MICA-129Val-Variante	48,7	43,6	40,5	27,1	

3.2.1.5 Einfluss der klinischen Risikofaktoren auf OS und DFS

Im Folgenden wurden die in der Literatur gängigen Risikofaktoren Geschlecht des Patienten, Geschlechtskompatibilität, Diagnose, Konditionierungsschema (myeloablativ oder RIC), Stammzellquelle (BM oder PBSC), Patientenalter (zum Zeitpunkt der Tx), GvHD-Prophylaxe (Methotrexat plus Cyclosporin A oder Andere) und Krankheitsstadium auf ihren Einfluss auf das OS und das DFS untersucht. Näher beschrieben werden diejenigen, die sich in den Analysen als statistisch signifikant erwiesen. Die Überlebensraten nach 1, 3 und 5 Jahren, sowie am Ende des Beobachtungszeitraums sind in Tabelle 11 für das OS und in Tabelle 12 für das DFS zusammengefasst.

3.2.1.5.1 Konditionierungsverfahren

Die myeloablative Konditionierung führte zu einem signifikant besseren medianen Überleben von 826 Tagen verglichen zur Gruppe, die mittels RIC vorbehandelt wurden (medianes Überleben = 145 Tage, s. Tabelle 11).

Die Analyse des DFS zeigte außerdem ein statistisch signifikant längeres krankheitsfreies Intervall von 440 Tagen bei myeloablativer Konditionierung gegenüber 133 Tagen in der RIC-Gruppe (s. Tabelle 12).

3.2.1.5.2 Stammzellquelle

Von 114 Patienten wurden 48 (= 42,1 %) mit Knochenmark transplantiert und 66 (= 57,9 %) mit peripheren Blustammzellen (PBSC). Die Verwendung von Knochenmark als Stammzellquelle führte zu einem signifikant besseren medianen Überleben von 2651

Tagen im Gegensatz zu 182 Tagen in der PBSC-Gruppe (s. Tabelle 11). Das DFS betrug 2650 Tage, in der PBSC-Gruppe lag der Wert bei 144 Tagen.

3.2.1.5.3 Krankheitsstadium

Das Gesamtüberleben sowie das krankheitsfreie Überleben wurden hochsignifikant davon beeinflusst, in welchem Krankheitsstadium die HSCT durchgeführt wurde. Während das Gesamtüberleben im Stadium 1 im Median bei 2650 Tagen lag, war es im Stadium 2 bereits auf 182 Tage gesunken und betrug im Stadium 3 noch 99 Tage. Ein Gruppenvergleich der Variablen mittels Log-Rank-Test bestätigte dies. Beim krankheitsfreien Überleben war ein ähnliches Ergebnis zu beobachten, hier lag im Stadium 1 das krankheitsfreie Intervall bei 1933 Tagen, im Stadium 2 bei 139 Tagen und im Stadium 3 bei 68 Tagen. Es wurden 17 Patienten von der Berechnung ausgeschlossen, da keine Daten zum Krankheitsstadium vorlagen.

Tabelle 11 Überlebensraten des Gesamtüberlebens nach 1, 3, und 5 Jahren sowie am Ende des Beobachtungszeitraums. OS (engl.: overall survival), RIC (engl.): reduced intensity conditioning, PBSC (engl.): peripheral blood stem cells

Überlebensraten OS					
	1-Jahres-OS %	3-Jahres-OS %	5-Jahres-OS %	Gesamt OS %	p-Wert
Myeloablative Konditionierung	54,7	48,9	48,9	36,3	0,016
RIC	32	20	20	15	
Knochenmark	64,1	62	62	49,5	<0,001
PBSC	39,4	28,8	28,8	18,4	
Krankheitsstadium I	68,1	57,2	57,2	37,9	<0,001
Krankheitsstadium 2	29,6	26,7	26,7	26,7	
Krankheitsstadium 3	13,3	13,3	13,3	0	

Tabelle 12 Überlebensraten des krankheitsfreien Überlebens nach 1, 3, und 5 Jahren sowie am Ende des Beobachtungszeitraums. DFS (engl.: disease free survival), RIC (engl.): reduced intensity conditioning, PBSC (engl.): peripheral blood stem cells

Überlebensraten DFS					
	1-Jahres-OS %	3-Jahres-OS %	5-Jahres-OS %	Gesamt OS %	p-Wert
Myeloablative Konditionierung	51,3	46,8	43,3	32,3	0,006
RIC	28	20	20	10,7	
Knochenmark	59,9	57,7	55,6	43,4	0,001
PBSC	36,4	28,8	25,6	15	
Krankheitsstadium I	63,8	55,3	53,2	32,6	0,001
Krankheitsstadium 2	23,9	23,9	23,9	23,9	
Krankheitsstadium 3	13,3	13,3	13,3	0	

3.2.2 Multivariate Analyse der Endpunkte OS und DFS nach der Cox-Regression

Die multivariate Analyse des OS und des DFS wurde mit dem Cox-Regressions-Modell berechnet. Hierzu wurden in einem ersten Schritt durch Anwendung der schrittweisen Rückwärts-Prozedur nicht signifikante Variablen ($p \geq 0,1$) ausgeschlossen. In einem zweiten Schritt wurden dann nach dem Einschluss-Prinzip die zu untersuchenden Variablen wieder hinzugefügt. Die Analyse wurde mit Hilfe der SPSS-Software erstellt. Neben den zu untersuchenden Variablen MICA-Kompatibilität, Einfluss der MICA*008-Allele und Einfluss des MICA-129-Polymorphismus wurden folgende Einflussfaktoren berücksichtigt: Geschlecht des Patienten, Geschlechtskompatibilität, Diagnose (stratifiziert), Konditionierungsschema (myeloablative oder RIC), Stammzellquelle (BM oder PBSC), Patientenalter (zum Zeitpunkt der Tx), GvHD-Prophylaxe (Methotrexat plus Cyclosporin A oder Andere), Krankheitsstadium (ordinal). Bei 17 Patienten fehlten Angaben zum Krankheitsstadium. Diese wurden daher von der Berechnung ausgeschlossen.

3.2.2.1 Analyse des OS

Die Verwendung von PBSC als Stammzellquelle führte zu einer hochsignifikant höheren Hazard Rate als die Verwendung von Knochenmark. Mit steigendem Krankheitsstadium stieg auch die Hazardrate. Für das Stadium II ergaben sich jedoch keine signifikanten Werte. Mit zunehmendem Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Tx nahm die Hazardrate pro Lebensjahr um 4,2 % zu. Das Patientenalter hatte in der univariaten Analyse keinen statistisch signifikanten Einfluss auf OS und DFS gezeigt. Bei der GvHD-Prophylaxe führte die Verwendung eines niedrig dosierten Schemas zu signifikant besserem Überleben.

Das Vorliegen eines MICA-Mismatches führte zu einer statistisch signifikanten, um den Faktor 2,53 höheren Hazardrate als bei Übereinstimmung der MICA-Allele ($HR = 2,53$; $95\%KI = 0,995 - 6,432$; $p = 0,051$). Das einfache oder das homozygote Vorliegen des MICA*008-Allels führte nicht zu einem signifikanten Unterschied im Überleben. Das Vorliegen des stärker bindenden Polymorphismus MICA-129Met zeigte eine Tendenz zu schlechterem Überleben, jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant. In Tabelle 13 sind die Daten dargestellt.

Tabelle 13 Ergebnisse der multivariaten statistischen Analyse des Gesamtüberlebens (OS) nach Cox. HR = Hazard Ratio (engl.), OS (engl.): overall survival, PBSC (engl.): peripheral blood stem cells, KM: Knochenmark, ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronische myeloische Leukämie, MDS/MPN = Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie, unter „Andere Erkrankung“ sind zusammengefasst: Lymphome, Multiples Myelom/Plasmozytom, Aplastische Anämie und chronisch lymphatische Leukämie/CLL; GvHD (engl.): Graft-versus-host disease, MICA-129Val: Allele mit Valin an Position 129 (MICA*004, *008, *016)., MICA129Met: Allele mit Methionin an Position 129 (MICA*001, *007).

Multivariate Analyse des OS					
Variable		Signifikanz	HR	95,0 % Konfidenzintervall für HR	
				Untere	Obere
MICA-Übereinstimmung	match	-	-	-	-
	mismatch	0,051	2,53	0,995	6,432
Stammzellquelle	KM	-	-	-	-
	PBSC	<0,001	4,413	2,378	8,189
Krankheitsstadium	1	0,043	-	-	-
	2	0,172	1,607	0,813	3,176
	3	0,012	2,96	1,268	6,908
Patientenalter	nominal	0,008	1,043	1,011	1,077
GvHD-Prophylaxe	low	-	-	-	-
	Standard	0,03	2,574	1,095	6,049
MICA-129- Polymorphismus	MICA-129Val	-	-	-	-
	MICA-129Met	0,317	1,593	0,64	3,965
MICA*008	nicht präsent	-	-	-	-
	präsent	0,529	1,331	0,546	3,247
MICA*008 homozygot	Restgruppe	-	-	-	-
	homozygot	0,989	1,005	0,501	2,015

3.2.2.2 Analyse des DFS

Im Trend waren die Ergebnisse ähnlich dem des OS. Bezüglich der Stammzellquelle zeigten PBSC ein deutlich schlechteres Outcome. Mit steigendem Krankheitsstadium kam es zu einem deutlich kürzeren krankheitsfreien Überleben. Das höhere Alter hatte den Effekt einer 4,5 %-igen Steigerung der Hazard Rate pro Lebensjahr zur Folge. Die GvHD-Prophylaxe hatte im Gegensatz zum Einfluß auf das OS keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das DFS.

Bei Vorliegen eines MICA-Mismatch war eine statistisch signifikante, 2,3-fache Steigerung der Hazard Rate beim DFS zu beobachten (HR = 2,305; 95 % KI = 0,927-5,735; $p = 0,072$). Das Vorliegen des MICA-129Met führt knapp zu einer Verdopplung der Hazardrate, jedoch nicht mit signifikanten Werten.

Das Vorliegen des MICA*008-Allels hatte keinen signifikanten Einfluss auf das DFS.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14 Ergebnisse der multivariaten statistischen Analyse des krankheitsfreien Überlebens (DFS) nach Cox. HR = Hazard Ratio (engl.), OS (engl.): overall survival, PBSC (engl.): peripheral blood stem cells, KM: Knochenmark, ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronische myeloische Leukämie, MDS/MPN = Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie, unter „Andere Erkrankung“ sind zusammengefasst: Lymphome, Multiples Myelom/Plasmozytom, Aplastische Anämie und chronisch lymphatische Leukämie/CLL; GvHD (engl.): Graft-versus-host disease, MICA-129Val: Allele mit Valin an Position 129 (MICA*004, *008, *016), MICA129Met: Allele mit Methionin an Position 129 (MICA*001, *007).

Multivariate Analyse des DFS					
Variable		Signifikanz	HR	95,0 % Konfidenzintervall für HR	
				Untere	Obere
MICA-Übereinstimmung	match	-	-	-	-
	mismatch	0,072	2,305	0,927	5,735
Stammzellquelle	KM	-	-	-	-
	PBSC	<0,001	3,724	2,069	6,702
Krankheitsstadium	1	0,136	-	-	-
	2	0,158	1,598	0,834	3,063
	3	0,053	2,42	0,988	5,927
Patientenalter	nominal	0,012	1,04	1,009	1,072
GvHD-Prophylaxe	low	-	-	-	-
	Standard	0,103	1,926	0,875	4,238
MICA-129- Polymorphismus	MICA-129Val	-	-	-	-
	MICA-129Met	0,16	1,924	0,771	4,801
MICA*008	nicht präsent	-	-	-	-
	präsent	0,48	1,363	0,577	3,221
MICA*008 homozygot	Restgruppe	-	-	-	-
	homozygot	0,924	0,967	0,483	1,936

3.3 Analyse der konkurrierenden Ereignisse aGvHD, Relapse und TRM

Bei den drei abhängigen Variablen aGvHD, Relapse und TRM handelt es sich um konkurrierende Ereignisse. Dies bedeutet, dass ihr Auftreten die Inzidenz des jeweiligen kompetitiven Risikos potentiell beeinflusst. Kompetitive Risiken waren für die aGvHD das Fortschreiten der Erkrankung aufgrund jeglicher anderen Ursachen, für TRM wurde ein Rückfall als kompetitives Risiko betrachtet und für einen Rückfall wurde Tod durch eine andere Ursache als kompetitives Risiko definiert.

3.3.1 Kumulative Inzidenzen

Untersucht wurde die Inzidenz dieser konkurrierenden Ereignisse jeweils in Abhängigkeit der Übereinstimmung der MICA-Allele, des Vorhandenseins des MICA*008-Allels und dessen homozygotem Vorliegen sowie in Abhängigkeit des MICA-129-Polymorphismus. Zu jedem konkurrierenden Ereignis wurden mit Hilfe der R-Statistik-Software die Kurven der kumulativen Inzidenzen erstellt. Zur Überprüfung der statistischen Relevanz der Ergebnisse wurde der Gray's Test angewendet (Gray 1988).

3.3.1.1 aGvHD

Die Inzidenz der akuten Graft-versus-Host-Erkrankung erreichte in der Gruppe der MICA-Gematchten nach 100 Tagen eine kumulative Inzidenz von 41,8 % und in der Gruppe der MICA-Mismatche 22,2 % ($p = 0,221$) (siehe Abbildung 18).

Im Vergleich der Inzidenz der aGvHD bei Patienten, die ein MICA*008-Allel besaßen (homozygot oder heterozygot) mit der Restgruppe, die kein MICA*008 Allel besaß, lag in der Gruppe der MICA*008-Allel-Träger die kumulative Inzidenz für aGvHD bei 48,8 % und somit hochsignifikant höher als in der Restgruppe, wo sie bei 12,0 % lag ($p = 0,001$) (s. Abbildung 19).

Der Vergleich der homozygoten Träger des MICA*008-Allels gegen die Restgruppe ergab ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede in der kumulativen Inzidenz der aGvHD ($p = 0,016$). Sie lag nach 100 Tagen bei den MICA*008-Homozygoten bei 57,6 % und in der Restgruppe bei 32,4 %. In Abbildung 20 werden die Daten veranschaulicht.

Das Vorliegen eines Allels mit hoher Bindungsaffinität zum NKG2D-Rezeptor (MICA*001 und MICA*007: 129Met-Gruppe) führte zu keinem signifikanten Unterschied der Inzidenz der aGvHD zur Gruppe mit schwächerer Bindungsaffinität ($p = 0,358$) (s. Abbildung 21).

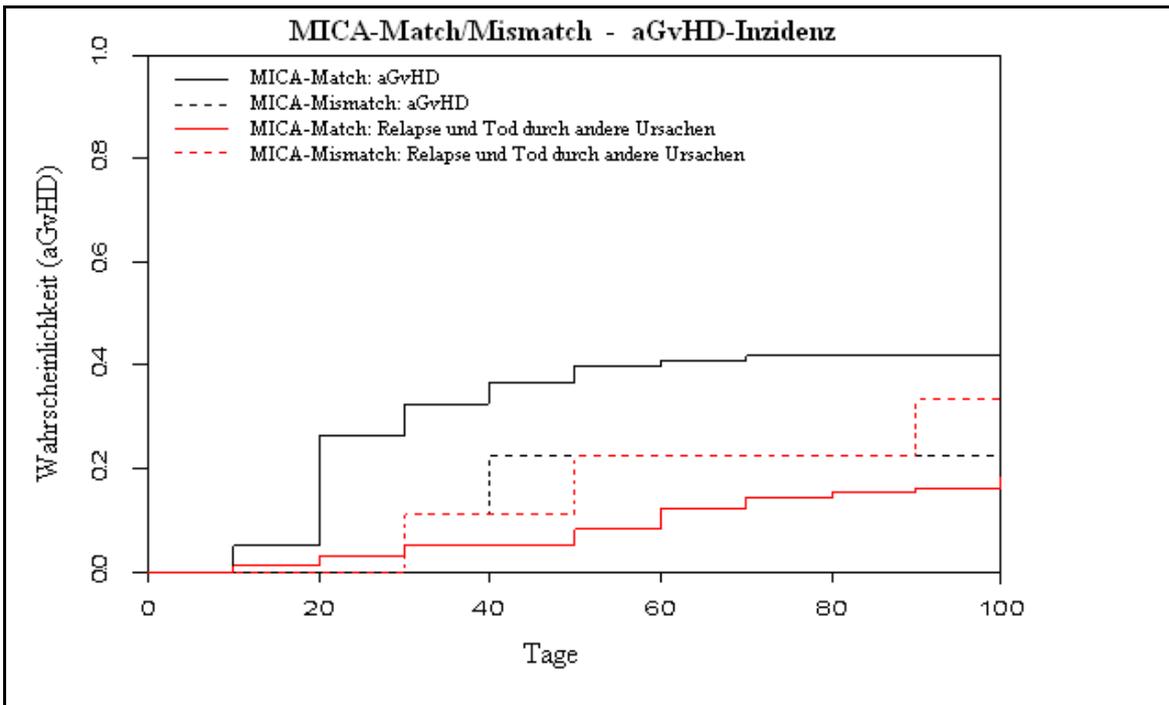


Abbildung 18 Kurve der Kumulativen Inzidenzen der akuten Graft-versus-host disease in den Gruppen MICA-Gematchte mit $n = 102$ (schwarze Kurve) versus der Gruppe der MICA-Gemismatchten mit $n = 12$ (schwarz-gestrichelte Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,221. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

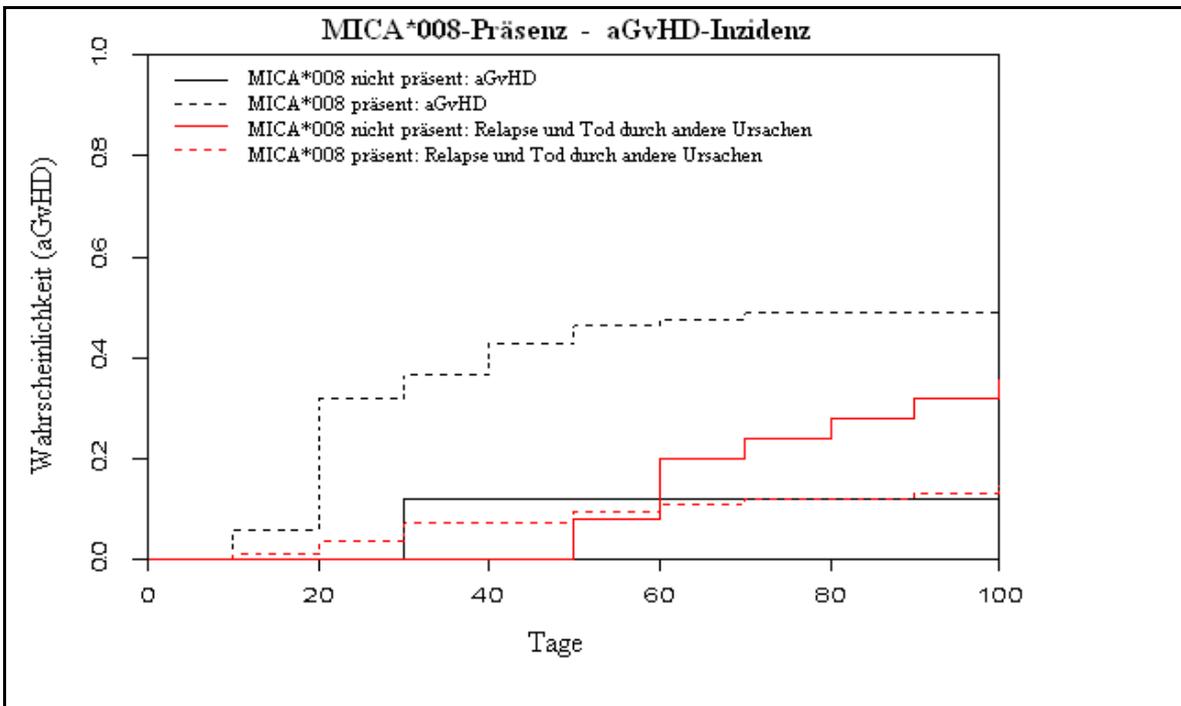


Abbildung 19 Kurve der Kumulativen Inzidenzen der akuten Graft-versus-host disease in den Gruppen MICA*008-Träger (heterozygot oder homozygot) mit $n = 89$ (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe ohne MICA*008-Allel mit $n = 25$ (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,001. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

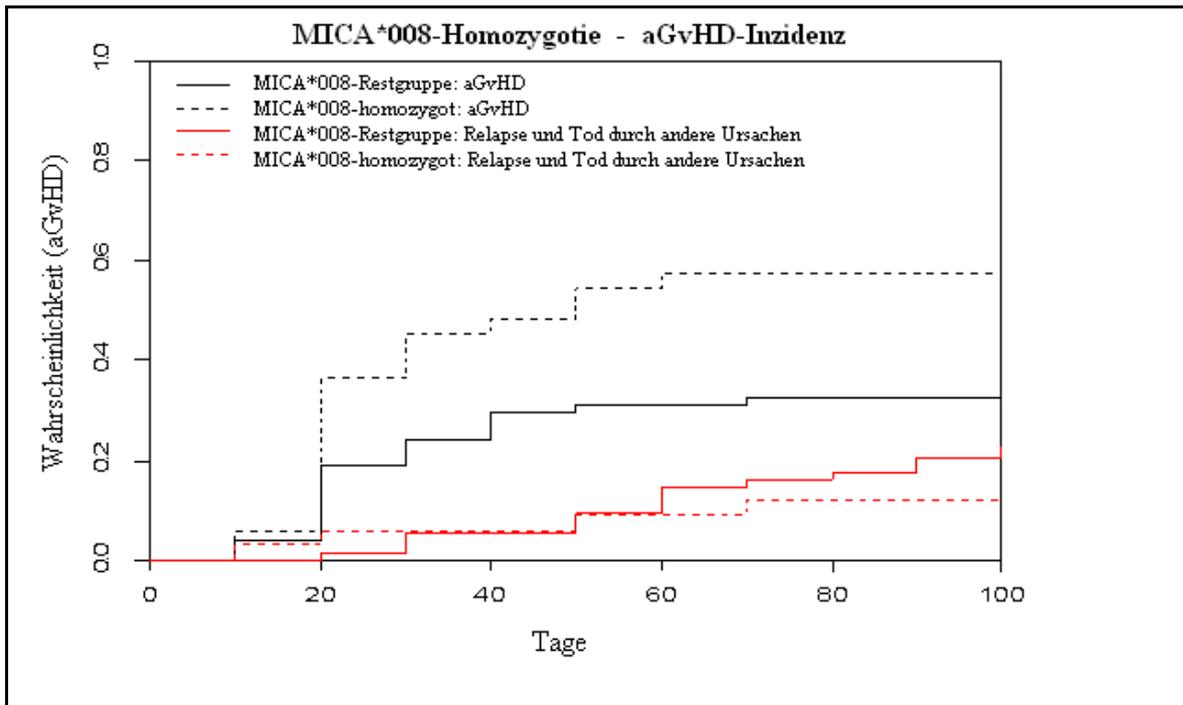


Abbildung 20 Kurve der Kumulativen Inzidenzen der akuten Graft-versus-host disease in den Gruppen MICA*008-homozygote Träger mit $n = 37$ (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe ohne oder mit nur einem MICA*008-Allel mit $n = 77$ (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,016. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

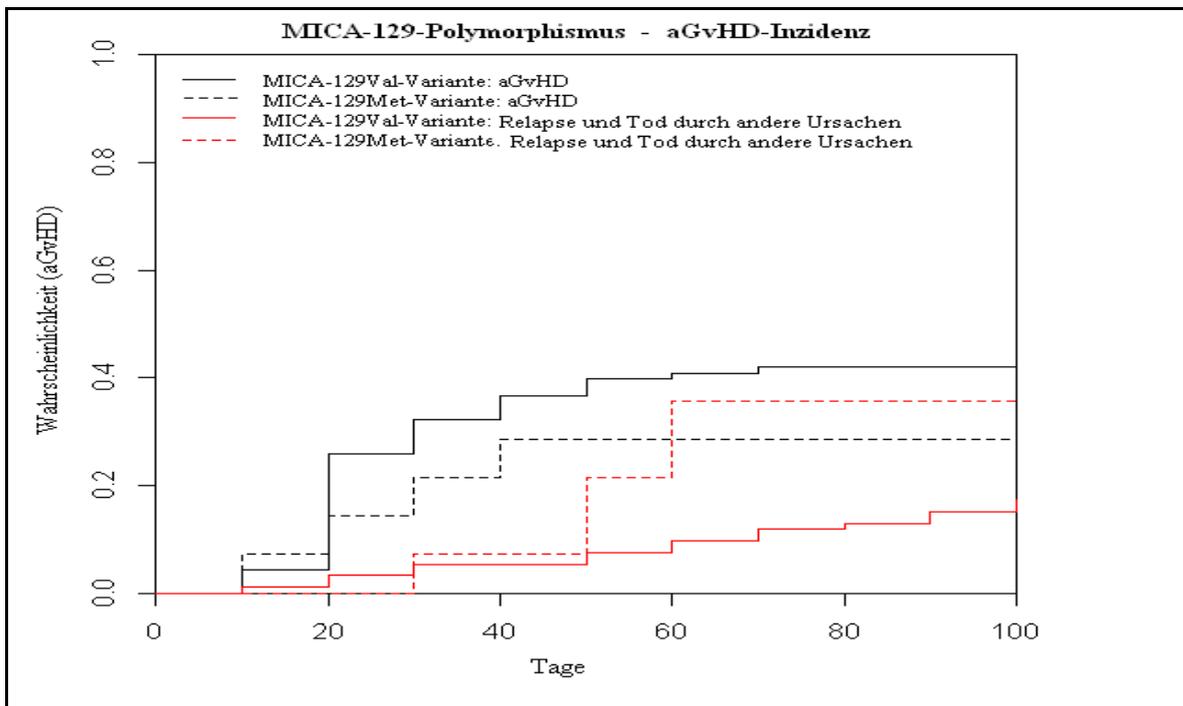


Abbildung 21 Kurve der Kumulativen Inzidenzen der akuten Graft-versus-host disease in den Gruppen der MICA-Allele mit hoher MICA-NKG2D-Bindungsaffinität (MICA*001 + MICA*007) mit $n = 14$ (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe mit $n = 100$ (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,358. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

3.3.1.2 Relapse

Die kumulative Inzidenz des Relapse erreichte in der Patientengruppe der MICA-gematchten Transplantationspaare nach 1900 Tagen mit 33,3 % seine höchste kumulative Inzidenz. In der Gruppe der MICA-Gemismatchten lag der Wert nach 1900 Tagen bei 27,3 %. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,802$). Die Daten sind in Abbildung 22 dargestellt.

Die Gruppe der MICA*008-Allelträger (hetero-oder homozygot) erreichte nach 1900 Tagen eine kumulative Inzidenz des Relapse von 29,32 %. Die Restgruppe erreichte nach dieser Zeit einen Wert von 44,0 %. Die Differenz war bei einem p-Wert von 0,18 nicht signifikant. In Abbildung 23 sind die Werte graphisch dargestellt.

In der Gruppe der homozygoten MICA*008-Allelträger lag die kumulative Inzidenz des Relapse nach 1900 Tagen bei 30,6 % und die der Restgruppe mit einem oder keinem MICA*008-Allel bei 33,7 % (s. Abbildung 24). Die Werte unterschieden sich nicht signifikant (p-Wert = 0,825).

Es bestand kein signifikanter Unterschied der Relapseinzidenz zwischen der 129Met und der 129Val-Gruppe ($p = 0,263$, s. Abbildung 25).

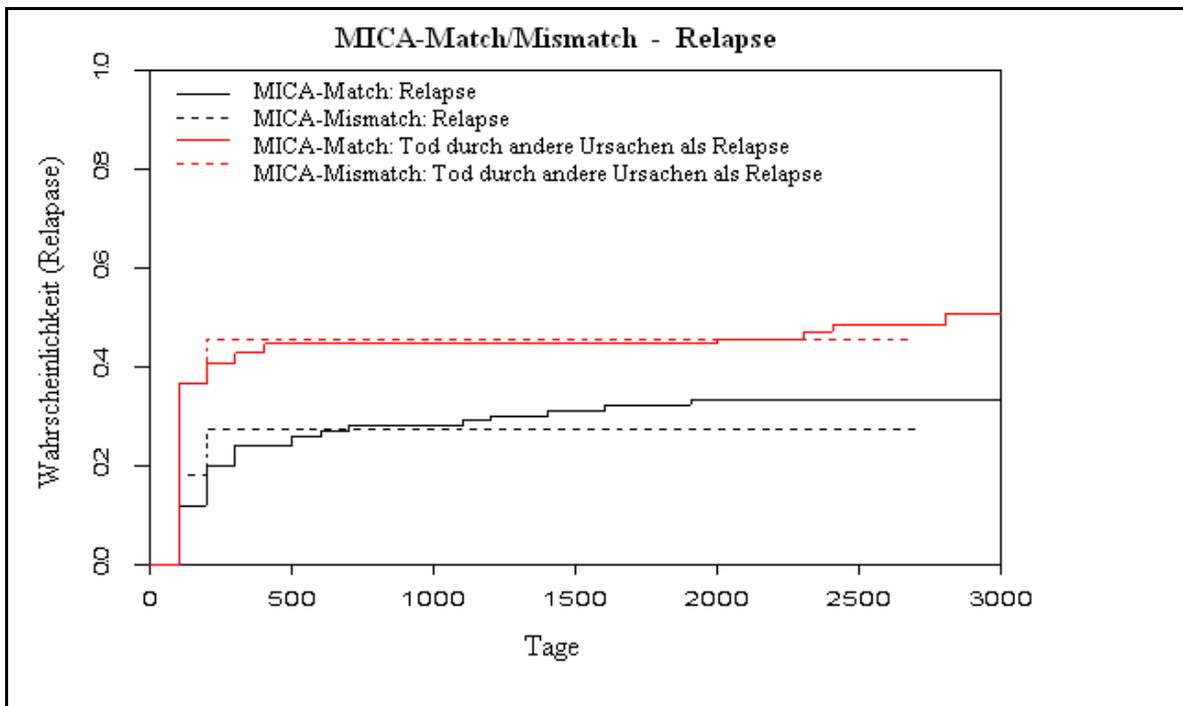


Abbildung 22 Kurve der Kumulativen Inzidenzen des Relapse in den Gruppen MICA-Gematchte mit $n = 102$ (schwarze Kurve) versus der Gruppe der MICA-Gemismatchten mit $n = 12$ (schwarz-gestrichelte Kurve) und dessen kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,802. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

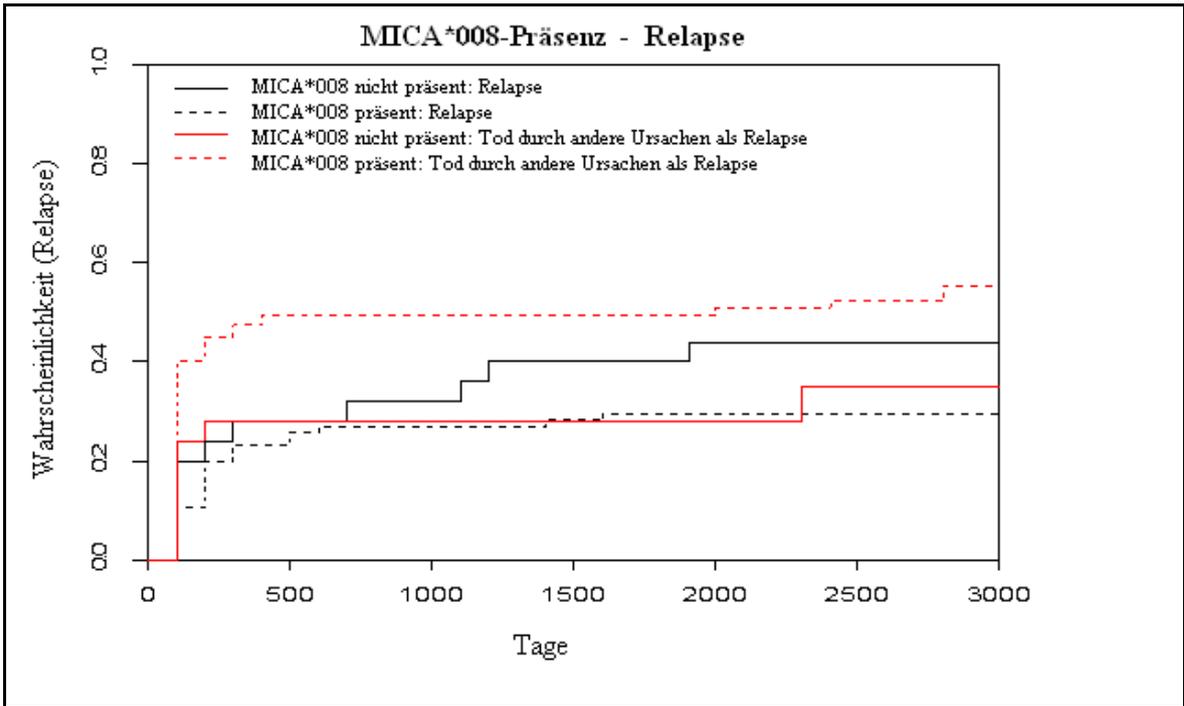


Abbildung 23 Kurve der Kumulativen Inzidenzen des Relapse (engl.: Rückfall) in den Gruppen MICA*008-Träger (heterozygot oder homozygot) mit $n = 89$ (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe ohne MICA*008-Allel mit $n = 25$ (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,18. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

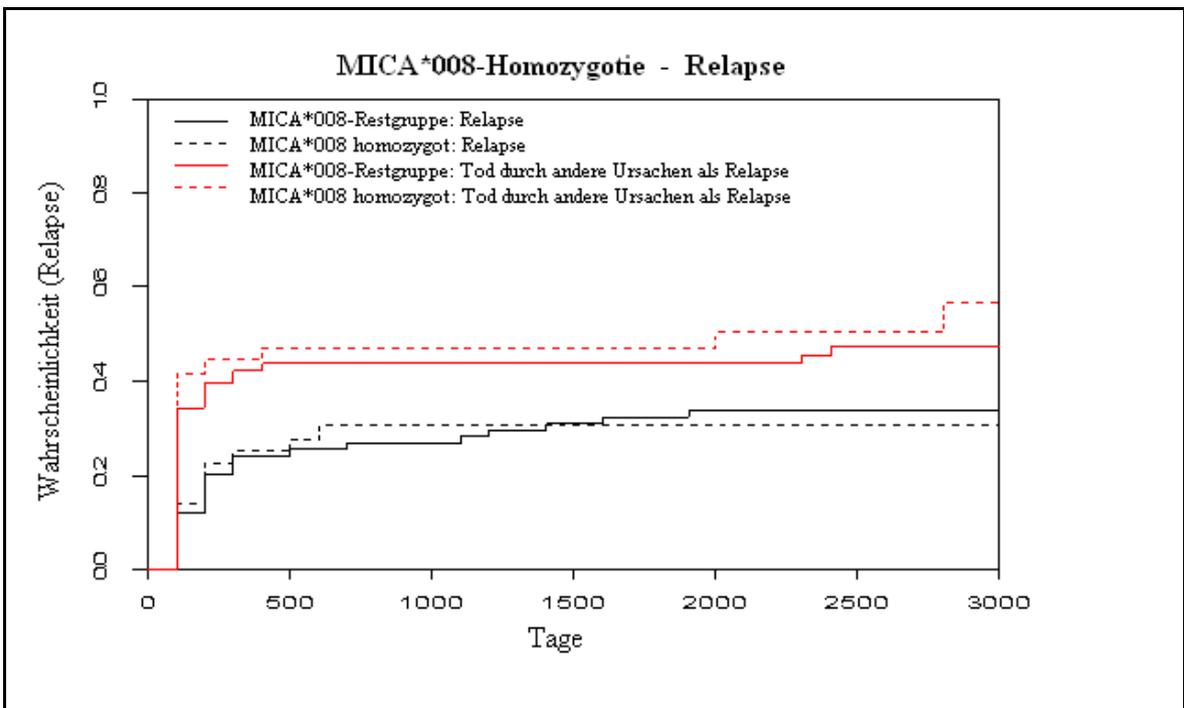


Abbildung 24 Kurve der Kumulativen Inzidenzen des Relapse (engl.: Rückfall) in den Gruppen MICA*008-homozygote Träger mit $n = 37$ (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe ohne oder mit nur einem MICA*008-Allel mit $n = 77$ (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,825. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

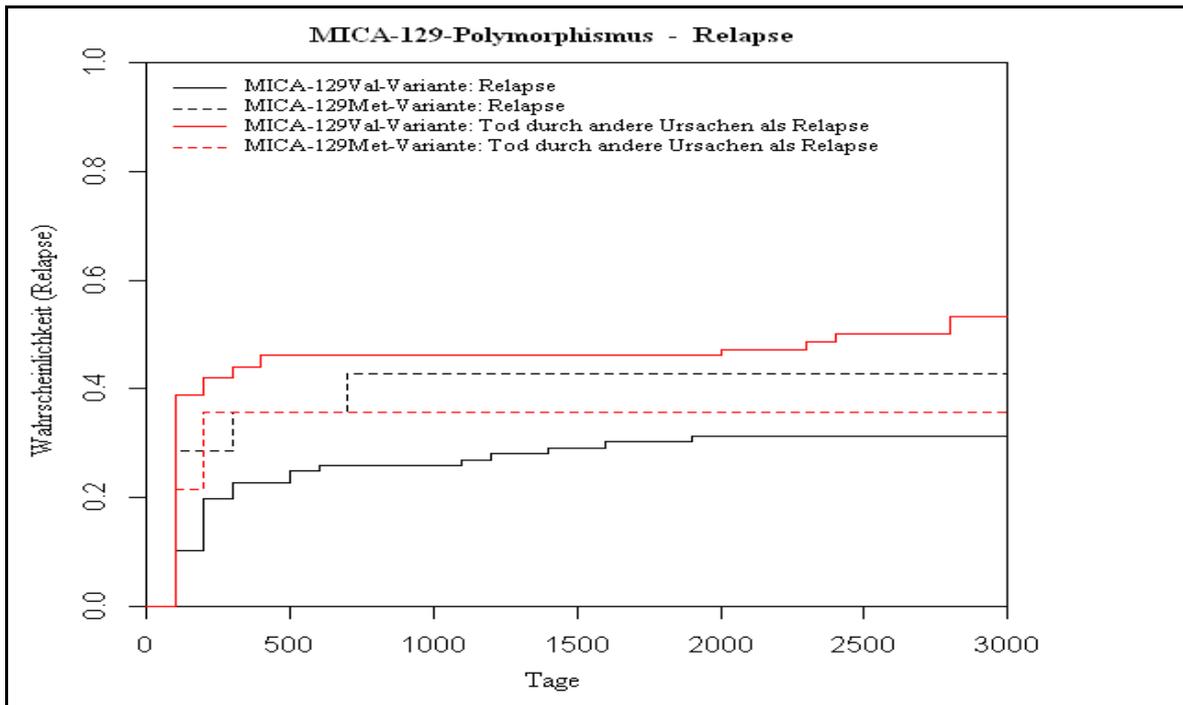


Abbildung 25 Kurve der Kumulativen Inzidenzen des Relapse in den Gruppen der MICA-Allele mit hoher MICA-NKG2D-Bindungsaffinität (MICA*001 + MICA*007) mit n = 14 (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe mit n = 100 (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p-Wert = 0,263. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

3.3.1.3 TRM

Die kumulative Inzidenz der transplantationsassoziierten Mortalität (engl: transplant related mortality, TRM) lag nach 325 Tagen bei den MICA-Gematchten bei 29,92 %. In der Gruppe der MICA-Gemismatchten waren es nach dieser Zeit 36,4 %. Diese Werte erreichten keine statistische Signifikanz ($p = 0,653$). Die graphische Darstellung der kumulativen Inzidenzen ist in Abbildung 26 ersichtlich.

Die kumulative Inzidenz für TRM lag in der Gruppe der MICA*008-Allel-Träger nach 325 Tagen bei 32,5 %. In der Restgruppe betrug sie 24,0 %. Der p-Wert von 0,427 zeigte keine statistische Signifikanz. Die graphische Darstellung der Daten ist in Abbildung 27 ersichtlich.

Der Vergleich der Gruppen homozygoter MICA*008-Allelträger zur Restgruppe mit nur einem oder keinem MICA*008-Allel ergab keinen signifikanten Unterschied für die kumulative Inzidenz der TRM ($p = 0,975$). Sie betrug nach 325 Tagen in der MICA*008-homozygoten Gruppe 30,6 %, die der Restgruppe lag bei 30,5 %. In Abbildung 28 sind die Daten graphisch dargestellt.

Es bestand kein signifikanter Unterschied der TRM zwischen der 129Met und der 129Val-Gruppe ($p = 0,657$, siehe Abbildung 29).

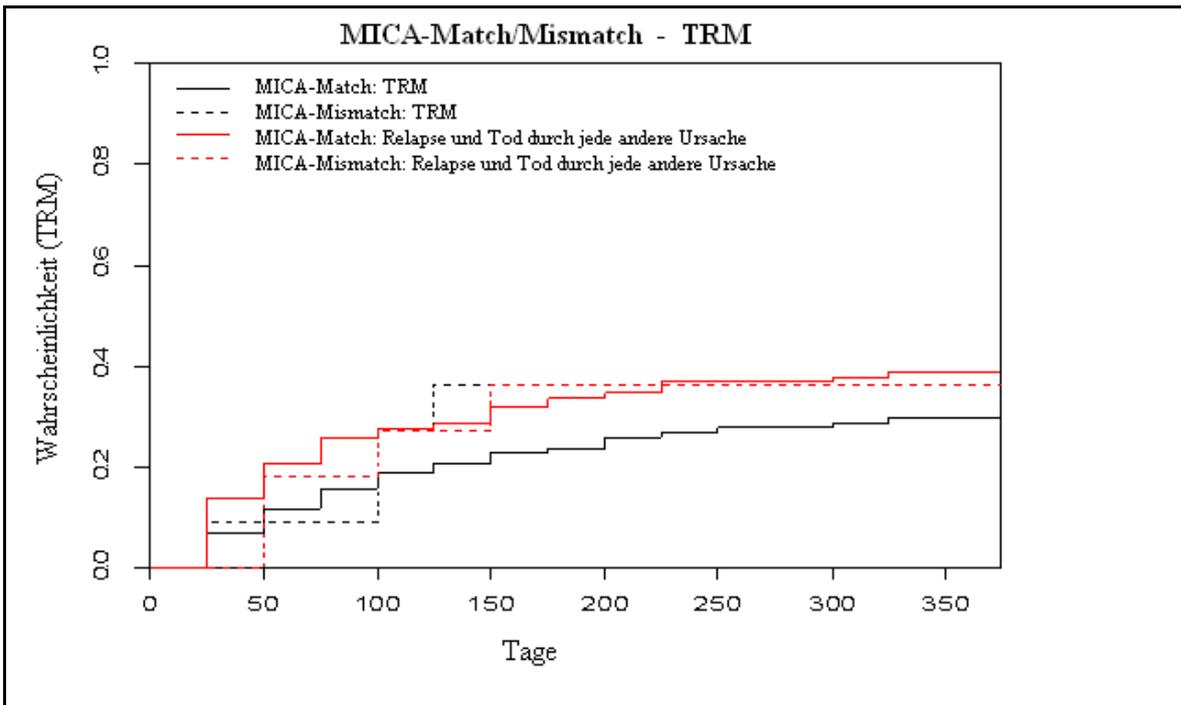


Abbildung 26 Kurve der Kumulativen Inzidenzen der transplantationsassoziierten Mortalität (engl.: transplant related mortality, TRM), in den Gruppen MICA-Gematchte mit $n = 102$ (schwarze Kurve) versus der Gruppe der MICA-Gemismatchten mit $n = 12$ (schwarz-gestrichelte Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,653. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

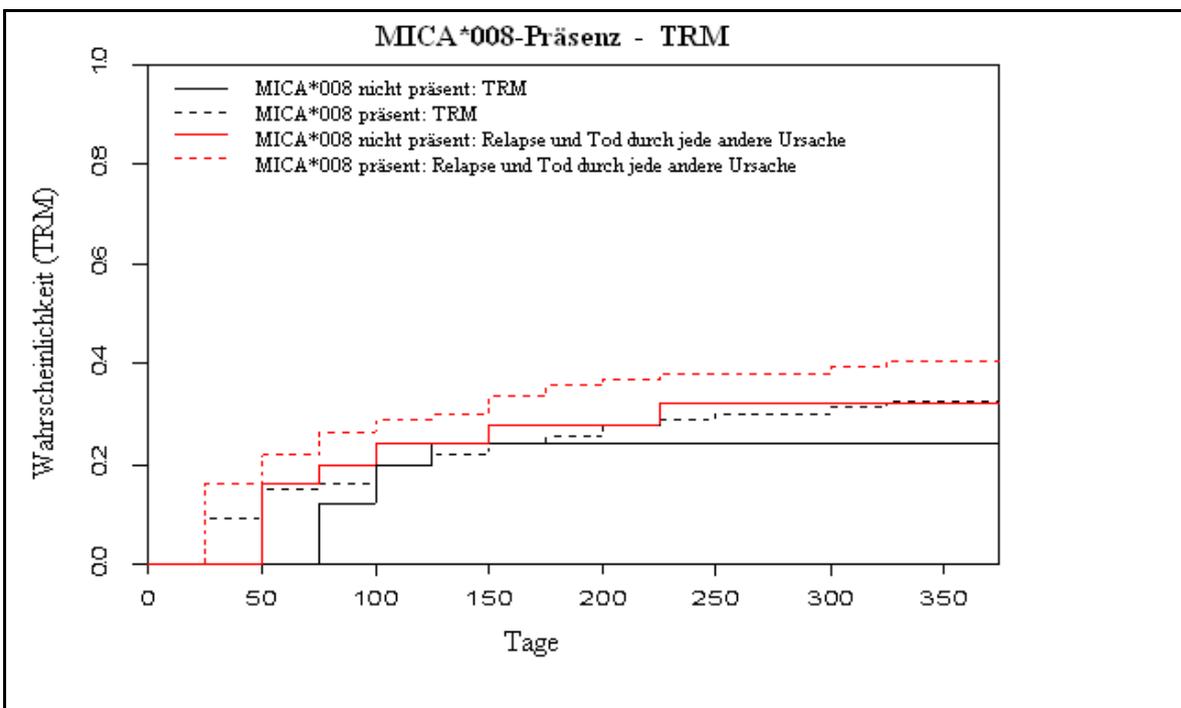


Abbildung 27 Kurve der Kumulativen Inzidenzen der transplantationsassoziierten Mortalität (engl.: transplant related mortality, TRM), in den Gruppen MICA*008-Träger (heterozygot oder homozygot) mit $n = 89$ (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe ohne MICA*008-Allel mit $n = 25$ (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,427. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

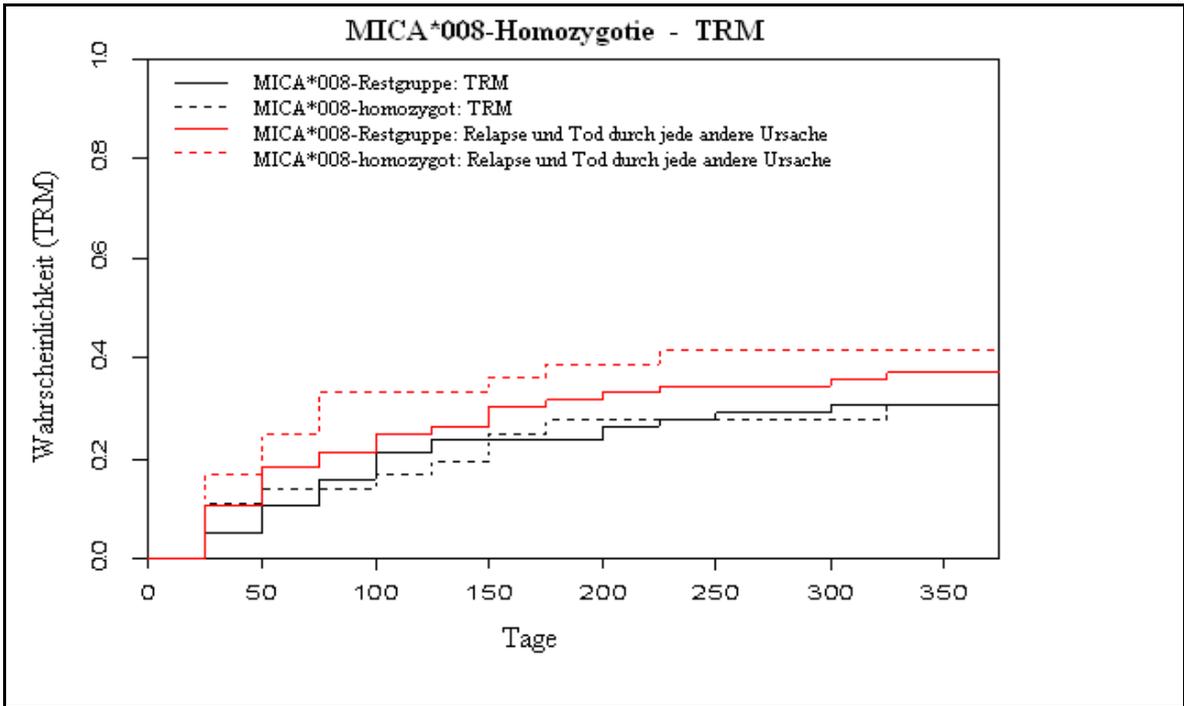


Abbildung 28 Kurve der Kumulativen Inzidenzen der transplantationsassoziierten Mortalität (engl.): transplant related mortality, TRM, in den Gruppen MICA*008-homozygote Träger mit $n = 37$ (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe ohne oder mit nur einem MICA*008-Allel mit $n = 77$ (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,975. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

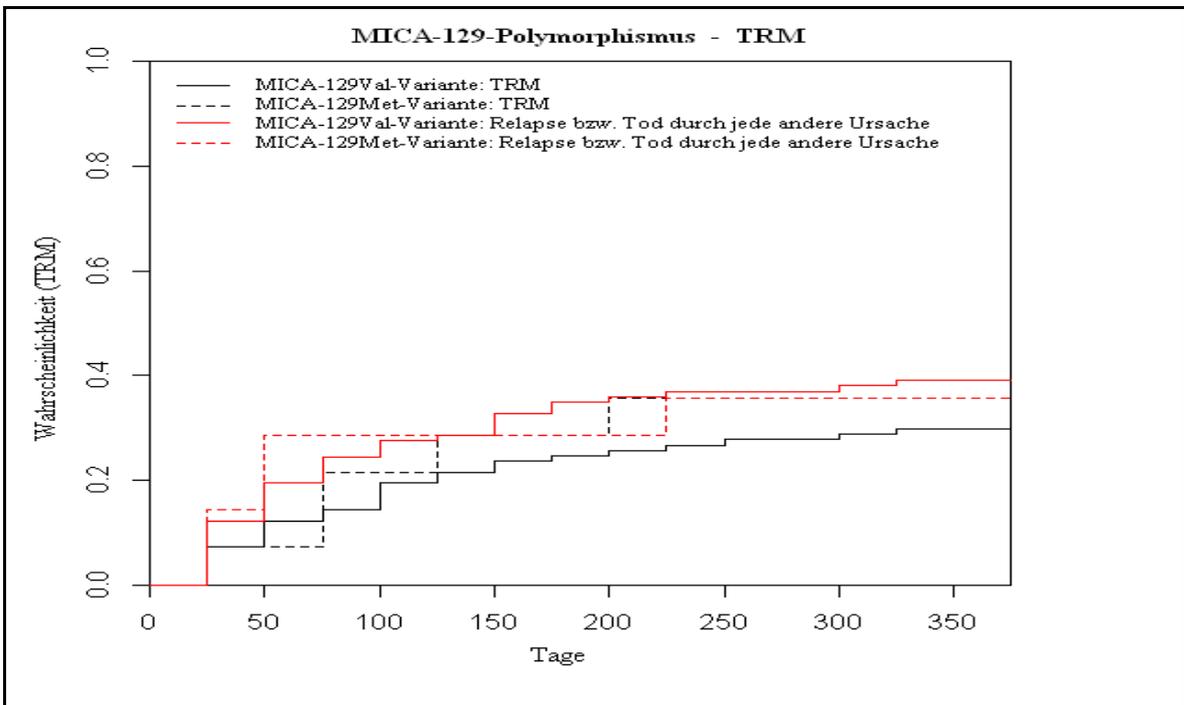


Abbildung 29 Kurve der Kumulativen Inzidenzen der transplantationsassoziierten Mortalität (engl.): transplant related mortality, TRM, in den Gruppen der MICA-Allele mit hoher MICA-NKG2D-Bindungsaffinität (MICA*001 + MICA*007) mit $n = 14$ (schwarz-gestrichelte Kurve) versus der Restgruppe mit $n = 100$ (schwarze Kurve) und deren kompetitivem Risiko (rote Kurven), p -Wert = 0,657. CR: kompetitives Risiko (engl.: Competitive Risk).

3.3.2 Multivariate Regressionsanalyse der sekundären Endpunkte

Zur weiteren Beurteilung der konkurrierenden sekundären Endpunkte aGvHD, Relapse und TRM wurde die multivariate Regressionsanalyse nach dem von Fine und Gray (1999) entwickelten Modell durchgeführt. Durchgeführt wurde diese mittels der R-Statistik-Software. Es wurden jeweils folgende Risikofaktoren berücksichtigt: Geschlecht des Patienten, Geschlechtskompatibilität, Diagnose (stratifiziert), Konditionierungsschema (myeloablative oder RIC), Stammzellquelle (BM oder PBSC), Patientenalter (zum Zeitpunkt der Tx), GvHD-Prophylaxe (Methotrexat plus Cyclosporin A oder Andere), Krankheitsstadium (ordinal). Verglichen wurden die Ergebnisse von Patienten, bei denen MICA-Übereinstimmung vorlag, zur Restgruppe. Außerdem wurden Patienten, die mindestens ein MICA*008-Allel besaßen, der Restgruppe, die kein Allel der *008-Gruppe besaß, gegenübergestellt. Die Gruppe der MICA*008-homozygoten Träger wurden mit der Restgruppe verglichen, die entweder nur ein MICA*008-Allel oder keines besaßen. Statistisch nicht signifikante Variablen wurden belassen, wenn sie definiertes Ziel der Untersuchung in dieser Arbeit waren, oder auch dann, wenn es sich dabei um international anerkannte Risikofaktoren aus dem Bereich der HSCT-Forschung handelte.

3.3.2.1 aGvHD

Mit steigendem Alter kam es pro Lebensjahr zu einem 5 % höheren Risiko, eine aGvHD zu erleiden. Die Art der Stammzellquelle wirkte sich statistisch nicht signifikant auf das Auftreten der aGvHD aus.

Das Vorliegen eines MICA-Mismatch führte zu einer 1,9-fachen Hazardrate, jedoch war der Wert nicht signifikant (s. Tabelle 15). Das Vorliegen eines MICA*008-Allels führte zu einer signifikanten, nahezu 8-fachen Steigerung der Hazardrate für das Auftreten der aGvHD. Homozygotes Vorliegen des MICA*008-Allels war hingegen nur mit einer 1,8-fachen Steigerung assoziiert (s. Tabelle 15).

Tabelle 15 Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse der aGvHD. ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronische myeloische Leukämie, MDS/MPN = Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie, unter „Andere Erkrankung“ sind zusammengefasst: Lymphome, Multiples Myelom/Plasmozytom, Aplasie und chronisch lymphatische Leukämie/CLL, MA: myeloablativ (engl.), RIC (engl.): reduced intensity conditioning, PBSC (engl.): peripheral blood stem cells, KM: Knochenmark, MICA-129Val: Allele mit Valin an Position 129 (MICA*004, *008, *016)., MICA129Met: Allele mit Methionin an Position 129 (MICA*001, *007).

Multivariate Regressionsanalyse der aGvHD					
Variable		Signifikanz	HR	95,0 % Konfidenzintervall für HR	
				Untere	Obere
Patientenalter	nominal	0,012	1,05	1,01	1,08
Stammzellquelle	KM	-	1,00	-	-
	PBSC	0,292	0,72	0,39	1,32
MICA-Übereinstimmung	match	-	1,00	-	-
	mismatch	0,41	1,85	0,43	8,01
MICA*008-Allel	Restgruppe	-	1,00	-	-
	*008-Träger	0,01	7,96	1,64	38,56
MICA*008-Allel Homozygotie	Restgruppe	-	1,00	-	-
	*008-homozygot	0,054	1,84	0,99	3,44
MICA-129- Polymorphismus	129Val-Gruppe	-	1,00	-	-
	129Met-Gruppe	0,333	1,95	0,5	7,59

3.3.2.2 Relapse

Als stärkster Risikofaktor für Relapse erwies sich die Verwendung von peripheren Blutstammzellen statt aus Knochenmark gewonnenen Stammzellen. Hier stieg das relative Risiko für Relapse auf den 4-fachen Wert. Als weiterer Risikofaktor für Relapse erwies sich die Art der Konditionierung. Wurde diese mit reduzierter Intensität (RIC) durchgeführt, kam es zu einer Steigerung der Hazardrate auf das 2,5-fache. Die Analyse des Krankheitsstadiums ergab nur für Stadium II signifikante Werte. Hier zeigte sich eine 2,5-fach höhere Hazardrate als im Stadium I. Die Art der aGvHD-Prophylaxe hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Relapserate.

MICA-Mismatching wirkte sich nicht signifikant auf die Relapserate aus. Das Vorliegen des MICA*008-Allels halbierte die Wahrscheinlichkeit eines Relapse. Beim homozygoten Vorliegen war dieser Trend ebenfalls zu erkennen. Jedoch waren diese Werte nicht signifikant. Die Werte sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16 Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse des Relapse. ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronische myeloische Leukämie, MDS/MPN = Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie, unter „Andere Erkrankung“ sind zusammengefasst: Lymphome, Multiples Myelom/Plasmozytom, Aplastische Anämie und chronisch lymphatische Leukämie/CLL, MA: myeloablative (engl.), RIC (engl.): reduced intensity conditioning, PBSC (engl.): peripheral blood stem cells, KM: Knochenmark, MICA-129Val: Allele mit Valin an Position 129 (MICA*004, *008, *016), MICA129Met: Allele mit Methionin an Position 129 (MICA*001, *007).

Multivariate Regressionsanalyse des Relapse					
Variable		Signifikanz	HR	95,0 % Konfidenzintervall für HR	
				Untere	Obere
Krankheitsstadium	1	-	1,00	-	-
	2	0,08	2,45	0,9	6,67
	3	0,744	1,27	0,3	5,43
aGvHD-Prophylaxe	standard	-	1,00	-	-
	low	0,482	0,72	0,29	1,79
Konditionierung	MA	-	1,00	-	-
	RIC	0,025	2,46	1,12	5,4
Stammzellquelle	KM	-	1,00	-	-
	PBSC	0,007	4,23	1,5	11,95
MICA-Übereinstimmung	match	-	1,00	-	-
	mismatch	0,906	0,91	0,19	4,39
MICA*008-Allel	Restgruppe	-	1,00	-	-
	*008-Träger	0,314	0,53	0,16	1,82
MICA*008-Allel Homozygotie	Restgruppe	-	1,00	-	-
	*008-homozygot	0,746	0,85	0,31	2,3
MICA-129- Polymorphismus	MICA-129-Val	-	1,00	-	-
	MICA-129-Met	0,653	1,35	0,36	5,04

3.3.2.3 TRM

Mit zunehmendem Alter kam es pro Lebensjahr zu einem Anstieg der Inzidenz der TRM um 6%. Die anderen untersuchten Risikofaktoren hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die TRM.

Das Vorliegen eines Mismatch der MICA-Allele oder das Vorhandensein des MICA*008-Allels führte jeweils zu einer Verdopplung der Hazardrate der TRM. Auch das Vorliegen der MICA-129Met-Variante hatte eine Steigerung der hazardrate um das 1,8-fache zur Folge. Die Werte erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Die Daten sind in Tabelle 17 abgebildet.

Tabelle 17 Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse der transplantationsassoziierten Mortalität (TRM). ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronische myeloische Leukämie, MDS/MPN = Myelodysplastisches Syndrom/Myeloproliferative Neoplasie, unter „Andere Erkrankung“ sind zusammengefasst: Lymphome, Multiples Myelom/Plasmozytom, Aplasie und chronisch lymphatische Leukämie/CLL, MA: myeloablative (engl.), RIC (engl.): reduced intensity conditioning, PBSC (engl.): peripheral blood stem cells, KM: Knochenmark, MICA-129Val: Allele mit Valin an Position 129 (MICA*004, *008, *016), MICA129Met: Allele mit Methionin an Position 129 (MICA*001, *007).

Multivariate Regressionsanalyse der TRM					
Variable		Signifikanz	HR	95,0 % Konfidenzintervall für HR	
				Untere	Obere
Patientenalter	nominal	0,047	1,06	1	1,12
Krankheitsstadium	1	-	1,00	-	-
	2	0,252	1,72	0,68	4,36
	3	0,848	1,13	0,31	4,12
Geschlechtsübereinstimmung	match	-	1,00	-	-
	mismatch	0,451	1,35	0,62	2,95
Konditionierung	MA	-	1,00	-	-
	RIC	0,455	0,66	0,23	1,95
Stammzellquelle	KM	-	1,00	-	-
	PBSC	0,081	2,19	0,91	5,3
MICA-Übereinstimmung	match	-	1,00	-	-
	mismatch	0,217	2,38	0,6	9,41
MICA*008-Allel	Restgruppe	-	1,00	-	-
	*008-Träger	0,235	2,53	0,55	11,73
MICA*008-Allel homozygot	Restgruppe	-	1,00	-	-
	*008-homozygot	0,891	1,07	0,41	2,81
MICA-129-Polymorphismus	MICA-129-Val	-	1,00	-	-
	MICA-129-Met	0,453	1,79	0,39	8,18

4 Diskussion

Mit der steigenden Anzahl an hämatopoetischen Stammzelltransplantationen und der Zunahme an potenziellen Stammzellspendern wächst das Interesse an der immer exakteren Abstimmung transplantationsrelevanter Antigene zwischen Spendern und Empfängern. Die Kompatibilität zwischen HLA-Klasse I- und II-Molekülen gilt hierbei als bedeutendster prognostischer Faktor für das Outcome nach HSCT (Tay et al. 1995, Speiser et al. 1996, Flomenberg et al. 2004, Loiseau et al. 2007, Lee et al. 2007, Robin et al. 2013, Fürst et al. 2013). Im Laufe der Etablierung der HSCT wurden daher immer mehr HLA-Antigene in die routinemäßige Typisierung mit eingeschlossen. In Deutschland wird eine HLA-Kompatibilität von 10/10 angestrebt, d.h. dass Spender und Empfänger in den Genorten HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 kompatibel sein sollten. Vor allem hierdurch lassen sich mittlerweile mit allogenen Spendermaterial nahezu vergleichbare Ergebnisse erzielen wie bei Verwendung eines HLA-identischen Spenders aus der Familie (Gupta et al. 2010, Perez 2011, Saber et al. 2012). In den letzten Jahren wurden außerdem deutliche Fortschritte in der Optimierung der Konditionierungsschemata, der aGvHD-Prophylaxe und der Behandlung opportunistischer Infektionen gemacht, welche die Transplantationsergebnisse insgesamt verbessert haben (Gooley et al. 2010). Gerade ein häufiges Auftreten von gefährlichen Komplikationen wie der aGvHD bei allogener HSCT stellt jedoch weiterhin eine große Herausforderung an die Transplantationsmedizin dar (Peccatori et Ciceri 2010). Der Grund für diese immunologisch vermittelten Abstossungsprozesse ist vermutlich das Vorhandensein weiterer, transplantationsrelevanter Gewebsantigene, die durch die bisher gängigen Typisierungen nicht erfasst werden (Zou et al. 2007). Es werden gegenwärtig verschiedene antigene Strukturen untersucht, für die ein Einfluss auf das Transplantationsergebnis vermutet wird. Hierzu gehören die Minor-Histokompatibilitätsantigene (Heinemann 2004, Recker 2012), verschiedene Zytokine (Ferrara 2000), die Killer immunoglobulin-like receptors (KIR) (Babor et al. 2013, Bastos-Oreiro et al. 2015) und auch die in dieser Arbeit untersuchten MICA-Antigene.

4.1 Einfluss der klinischen Risikofaktoren

In die Analysen wurden Risikofaktoren aufgenommen, die potenziell das Ergebnis bei hämatopoetischen Stammzelltransplantationen beeinflussen. Hierzu gehören das Geschlecht des Patienten, Geschlechtskompatibilität, Diagnose, Konditionierungsschema (myeloablativ oder RIC), Stammzellquelle (BM oder PBSC), Patientenalter (zum

Zeitpunkt der Tx), GvHD-Prophylaxe (Methotrexat plus Cyclosporin A oder Andere) und das Krankheitsstadium.

4.1.1 Diagnose

Die Art der Grunderkrankung ist in der gängigen Literatur ein wichtiger Einflussfaktor für das Gesamtüberleben (Imamura et al. 2006) und die Relapseinzidenz (Aschan 2006) bei HSCT. Auch in unserer Studie gab es grosse Unterschiede im Überleben in Abhängigkeit von der Grunderkrankung. Das beste Überleben hatten Patienten mit einer CML, dann folgten in absteigender Reihenfolge Patienten mit MDS/MPN, ALL und AML. Der Risikofaktor „Grunderkrankung“ wurde daher in die multivariate Analyse mit der Cox-Regression eingeschlossen.

4.1.2 Stammzellquelle

Transplantate aus peripheren Blutstammzellen enthalten etwa 10 Mal mehr T- und B-Zellen als Transplantate aus Knochenmark (Storek et al. 2001). Da diese Zellen nach der Transplantation zum Teil lange überleben, scheinen ihre Empfänger seltener an schwerwiegenden Infektionen zu erkranken als bei der Verwendung von Knochenmark (Storek et al. 2001). In mehreren Studien konnte nach Transplantation von PBSC außerdem ein schnellerer Anstieg der Neutrophilen und Thrombozyten, und somit eine schnellere Immunrekonstitution, verglichen mit jener bei der Transplantation von Knochenmark, nachgewiesen werden (Storek et al. 2001, Bensinger et al. 2001, Demiriz et al. 2012). Begleitet wurde dieser Effekt von unveränderter oder etwas geringerer Relapserate bei gleichbleibender (Demiriz et al. 2012) oder leicht gesteigerter Inzidenz der aGvHD (Powles et al 2000, Bensinger et al. 2001) und chronischer GvHD (Demiriz et al. 2012, Holtick et al. 2014). Insgesamt führten diese Effekte bisher mindestens zu vergleichbaren Ergebnissen zwischen beiden Stammzellquellen (Holtick et al. 2014) und insbesondere bei Hochrisikopatienten zu besserem Gesamtüberleben und längerem krankheitsfreien Überleben bei Verwendung von PBSC (Storek et al. 2001).

In der vorliegenden Studie konnten diese Beobachtungen nicht bestätigt werden. In der univariaten Analyse wurde eine signifikant bessere 5-Jahres-Überlebensrate von 62 % bei Verwendung von Knochenmark im Gegensatz zu 28,8 % in der PBSC-Gruppe ($p < 0,001$) nachgewiesen. In der multivariaten Analyse ließ sich dieses Ergebnis ebenfalls signifikant reproduzieren (HR = 4,413; 95 %KI = 2,378-8,189; $p = <0,001$). Der Literatur zufolge wäre ein etwa vergleichbares Ergebnis in beiden Gruppen zu erwarten gewesen (Wu et al. 2015). In einer Studie von Eapen et al. wurde zwar ebenfalls ein schlechteres Outcome bei

Verwendung von PBSC beschrieben, allerdings handelte es sich bei seiner Kohorte ausschließlich um Kinder (Eapen et al. 2004). Patienten < 18 Jahre waren in der vorliegenden Studie jedoch ausgeschlossen, weshalb ein direkter Vergleich nicht möglich war. Die Suche nach potenziellen Verzerrungen innerhalb der Gruppen ergab keine Erklärung. Altersverteilung und Krankheitsstadien waren in beiden Gruppen vergleichbar. Da der Zeitpunkt der Transplantationen relativ lange zurückliegt, bestanden möglicherweise noch erhebliche Unterschiede innerhalb der verschiedenen Behandlungsstrategien, wie z.B. bei der Infektionsprophylaxe oder der Beherrschung der aGvHD. Auch hat sich mittlerweile das Verhältnis von Knochenmark-Transplantaten zu peripheren Stammzelltransplantaten zugunsten der PBSC verschoben. Lag es in unserer Kohorte noch bei 42 % zu 58 %, liegt es heute bei etwa 25 % zu 75 % (Körbling et Freireich 2011).

4.1.3 Krankheitsstadium

Das Krankheitsstadium gilt in der Literatur als ein wichtiger prognostischer Parameter für das Outcome bei HSCT (Henslee-Downey 1997, Craddock et al. 2010, Zhou et al. 2012, Bokhari et al. 2012). Es stellt außerdem einen Risikofaktor für die Relapserate dar, die mit steigendem Krankheitsstadium zunimmt (Aschan 2006, Craddock et al. 2010). Auch in unserer Studienkohorte wurde das Gesamtüberleben sowie das krankheitsfreie Überleben hochsignifikant davon beeinflusst, in welchem Krankheitsstadium die HSCT durchgeführt wurde. Während das 5-Jahres-Überleben im frühen Krankheitsstadium (n = 47) bei 57,2 % lag, war es im intermediären Stadium (n = 35) bereits auf 26,7 % gesunken und betrug im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (n = 15) noch 13,3 % (p < 0,001). Beim krankheitsfreien Überleben war ein ähnliches Ergebnis zu beobachten. Hier lag im frühen Krankheitsstadium das krankheitsfreie Überleben nach 5 Jahren bei 53,2 %, im intermediären Stadium bei 23,9 % und im fortgeschrittenen Krankheitsstadium bei 13,3 % (p = 0,001). In der multivariaten Analyse zeigte sich im intermediären Stadium eine 1,6-fache Steigerung der Hazardrate (HR) im Vergleich zum frühen Krankheitsstadium (HR = 1,607; 95 % KI = 0,813-3,176; p = 0,172). Im fortgeschrittenen Stadium stieg diese im Vergleich zum frühen Stadium auf das 3-fache an (HR = 2,96; 95 % KI = 1,268-6,908; p = 0,012).

4.1.4 Patientenalter

Das Alter der Patientenkohorte zum Zeitpunkt der Transplantation lag im Median bei 41,5 Jahren (Spannweite: 18 – 62 Jahre) und hatte deutlichen Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Pro zunehmendem Lebensjahr verschlechterte sich das Gesamtüberleben um 4,3 % (HR = 1,043; 95 %KI = 1,011-1,077; p = 0,008). Das schlechtere Outcome bei älteren Patienten wird auch in der Literatur beschrieben (Eapen et Rocha 2008, Zhou et al. 2012, Bokhari et al. 2012).

4.1.5 Konditionierungsverfahren

Ein Grund für das schlechte Outcome bei älteren oder multimorbiden Patienten ist die hohe Toxizität der myeloablativen Konditionierungsbehandlung, die eine hohe Mortalität durch TRM mit sich bringt (Peccatori et Ciceri 2010). In den letzten zwei Jahrzehnten wurden neue Konditionierungsschemata mit reduzierter Intensität (RIC) entwickelt, welche noch ausreichend immunosuppressiv sind, um das Engraftment der Spenderzellen zu ermöglichen, und gleichzeitig durch verminderte Gewebetoxizität in der Lage sind, die Rate der TRM zu senken. Zwar erkaufte man sich diesen Effekt mit einer höheren Relapseinzidenz (Dreger et al 2005). Auch blieb ein positiver Effekt auf die aGvHD aus (Luger et al. 2012). Trotzdem wurde die HSCT erst durch die RIC auch für ältere Patienten und Patienten mit Komorbiditäten eine ausreichend sichere und effektive Therapie (Peccatori et Ciceri 2010, Craddock et al. 2010, Hamadani et al. 2011, Ribera 2011).

In der univariaten Analyse führte die myeloablativ behandelte Gruppe, verglichen zur Gruppe, die mittels RIC vorbehandelt wurden, zu signifikant besserem OS und DFS. Erklärt werden könnte dieser Unterschied dadurch, dass die RIC aus den oben genannten Gründen überwiegend bei Hochrisikopatienten, zu denen auch ältere Menschen gehören, zur Anwendung kam. In der myeloablativ behandelten Gruppe lag das mediane Lebensalter bei 39 Jahren und damit deutlich niedriger als in der RIC-Gruppe, mit medianem Lebensalter von 47 Jahren. In der multivariaten Analyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen.

4.1.6 GvHD-Prophylaxe

Vor allem nach allogener HSCT kommt es häufig durch T-Zellen des Spender-Immunsystems zur Ausbildung der aGvHD (Ferrara et al. 2009), die wegen ihrer hohen Mortalität gefürchtet ist. Es gab mehrere Versuche, die T-Zellen des Spendermaterials zu entfernen, um dieser gefährlichen Erkrankung vorzubeugen. Hierdurch kommt es zwar zu einem Rückgang der aGvHD, jedoch steigt parallel hierzu die Relapseinzidenz an. Dies ist auf den fehlenden Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL-Effekt) zurückzuführen, bei dem v.a. T-Lymphozyten des Spenderimmunsystems zytotoxisch auf Tumorzellen des Empfängers wirken und diese eliminieren (Horowitz et al. 1990, Mavroudis et Barrett

1996, Kim et al. 2007). Insgesamt gibt es somit bisher keinen signifikanten Überlebensvorteil durch Reduktion der aGvHD (Champlin et al. 2000). Es gibt jedoch neuerdings Ansätze, die darauf abzielen, die aGvHD und den GvL-Effekt voneinander zu trennen, um den Vorteil des GvL-Effektes ohne den nachteiligen Effekt der aGvHD zu nutzen (Warren et Deeg 2013). Hierzu werden im Rahmen einer GvHD-Prophylaxe auch niedrig dosierte Schemata angewandt. Die Verwendung des Standard-Schemas war, verglichen mit niedrig dosierten Schemata, in der multivariaten Analyse mit signifikant schlechterem Überleben assoziiert (HR = 2,574; 95%KI = 1,095-6,049; p = 0,03).

4.2 Bedeutung der MICA-Allele

MICA ist ein Antigen, das vorrangig von gastrointestinalen Epithelzellen exprimiert wird (Groh et al.1998, Zwirner 1999). Es ist stressinduzierbar, was bedeutet, dass seine Expression durch Zellstress gesteigert wird. Seine extrazellulären Anteile führen als Ligand des NKG2D-Rezeptors zur Aktivierung seiner jeweiligen Trägerzelle, v.a. NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten (Zou et al. 2002). NK-Zellen gehören zu den ersten Immunzellen, die nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation ihre Funktionalität wiedererlangen (Kalwak et al. 2003). Es ist daher anzunehmen, dass sie die immunologische Regenerationsphase und möglicherweise auch die Entwicklung der aGvHD entscheidend beeinflussen (Pittari et al. 2010). Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von MICA auf das Outcome bei der HSCT zu untersuchen. Hierzu war es erforderlich, den für die Auswertung störenden HLA-Mismatch-Effekt zu minimieren, weshalb nur Patienten-Spender-Paare in die Studie eingeschlossen wurden, die hochauflösend HLA-typisiert (HLA-A, -B, -C, -DRB1, und -DQB1) und -gematcht waren. Untersucht wurde der Effekt eines MICA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger, sowie der Einfluss des in allen Populationen am häufigsten vorkommenden Allels, des MICA*008-Allels, auf die klinischen Endpunkte OS, DFS, aGvHD, Relapse und TRM. Außerdem belegen mehrere Studien, dass MICA-Allele aufgrund eines Polymorphismus unterschiedlich starke Bindungsaffinität zum korrespondierenden NKG2D-Rezeptor besitzen (Steinle et al. 2001, Isernhagen 2014). Es wurden daher zwei Gruppen gebildet, um diesen Effekt zu untersuchen. Die Gruppe der Allele mit hoher Bindungsaffinität nach Steinle (MICA*001 + MICA*007) wurde mit der Restgruppe verglichen. Untersucht wurde ihr Einfluss im Hinblick auf das Gesamtüberleben, das DFS, die aGvHD, Relapse und TRM.

4.2.1 MICA-129-Polymorphismus

Den genannten Studien zufolge binden Allele mit Methionin an Position 129 (MICA-129-Met-Variante: MICA*001, *007) 10-bis 50-fach stärker an den NKG2D-Rezeptor als Allele mit Valin in dieser Position (MICA-129-Val-Variante: MICA*004, *008, *016) (Steinle et al. 2001, Isernhagen 2014). Dies könnte den Aktivierungsgrad von NKG2D-tragenden Zellen beeinflussen (Isernhagen 2014) und sich somit auf die Entstehung der aGvHD oder auf das Gesamtüberleben auswirken.

In einer Studie von Anderson konnte beim Vergleich der Gruppen mit unterschiedlichen NKG2D-Bindungsaffinitäten kein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens der aGvHD festgestellt werden (Anderson et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit war jedoch ein deutlicher Trend zu schlechterem Überleben in der Gruppe mit hoher Bindungsaffinität (MICA-129Met-Variante) zu erkennen, wenngleich die Ergebnisse keine statistische Signifikanz aufwiesen. Das 5-Jahres-Überleben lag hier in der MICA-129-Met-Gruppe bei 21,4 % und erreichte in der Gruppe der MICA-129-Val-Variante 45,5 %. In der multivariaten Analyse ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren. Die Hazardrate lag etwa 1,6-mal so hoch wenn ein Allel mit stärkerer Bindungsaffinität vorlag (HR = 1,593; 95% KI = 0,64-3,965; p = 0,317).

4.2.2 Übereinstimmung der MICA-Allele

Obwohl die Spender-Empfänger-Paare vor der HSCT nicht auf ihre MICA-Übereinstimmung hin untersucht wurden, lag die Rate an MICA-Matching bei 89,5 % (102 von 114 Spender-Empfänger-Paaren). Diese hohe „zufällige“ Rate an MICA-Matching bei HLA-gematchten Spender-Empfänger-Paaren lässt sich durch die direkte Nachbarschaft des HLA-B- und des MICA-Genortes im MHC erklären. Hierdurch kommt es zum sog. Kopplungsungleichgewicht (engl.: linkage disequilibrium), was bedeutet, dass sich die Allelverteilung in der Bevölkerung nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet (Tian et al. 2001, Gao et al. 2006, Parmar et al. 2009). Durch Matching der HLA-B-Gene kam es somit zu einer Häufung von MICA-Matching. Die Häufigkeit der MICA-Mismatches in der untersuchten Kohorte lag bei 10,5 % (12 von 114 Spender-Empfänger-Paaren). Dieser Wert ist vergleichbar mit dem aus einer Studie von Parmar et al. (HLA-Kompatibilität 10/10), wo der Anteil an Mismatching von MICA zwischen Spendern und Empfängern 8,4 % betrug (Parmar et al. 2009). Bei allen Paaren handelte es sich in unserer Kohorte um ein inkomplettes Mismatch, d.h. dass Patienten-Spenderpaare im MICA-Genotyp jeweils in einem Allel übereinstimmten und sich im anderen unterschieden.

Aktuelle Studien zeigen, dass MICA-Mismatch bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation zu gesteigerter Inzidenz der aGvHD und zu schlechterem Überleben führen (Tay et al. 1995, Kitcharoen et al. 2006, Parmar et al. 2009). Eine kleine Studie von Anderson (Anderson et al. 2009) kommt zwar hier zu einem anderen Ergebnis, jedoch war in der dort untersuchten Kohorte nur ein einziges MICA-Mismatch vorhanden, weshalb ihre Aussagekraft als gering einzustufen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte ein nachteiliger Effekt auf das Gesamtüberleben gezeigt werden. Bei Vorliegen eines MICA-Mismatch gab es einen Trend zu schlechterem Überleben mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 33,3 % gegenüber 43,6 % bei MICA-gematchten Paaren ($p = 0,598$). In der multivariaten Analyse war der Unterschied mit einer 2,5-fachen Hazardrate bei MICA-Mismatching noch deutlicher und erreichte statistische Signifikanz ($HR = 2,53$; $95\%KI = 0,995-6,432$; $p = 0,051$). Auch war das krankheitsfreie Überleben signifikant kürzer ($HR = 2,305$; $95\%KI = 0,927-5,735$; $p = 0,072$).

Das schlechtere Outcome bei MICA-Mismatch ließ sich zum Teil auf eine gesteigerte Inzidenz der TRM zurückführen. In der univariaten Analyse lag die kumulative Inzidenz des therapieassoziierten Versterbens bei MICA-Gematchten bei 29,92 % und in der Gruppe der MICA-Gemismatchten bei 36,4 % ($p = 0,653$). Die multivariate Analyse der konkurrierenden Ereignisse zeigte diesen Trend mit einer 2,4-fach gesteigerten Hazardrate bei MICA-Mismatch noch deutlicher, war aber ebenfalls aufgrund der relativ geringen Mismatch-Fallzahlen nicht statistisch signifikant ($HR = 2,38$; $95\%KI = 0,6-9,41$; $p = 0,217$). In einer Studie von Parmar wurde das schlechtere Outcome bei MICA-Mismatch hauptsächlich durch gesteigerte aGvHD erklärt (Parmar et al. 2009). Dieser Effekt war in der vorliegenden Studie in der multivariaten Analyse der sekundären Endpunkte ebenfalls zu beobachten. Hier gab es einen deutlichen Trend zu häufigerem Auftreten der aGvHD bei MICA-Mismatch, der statistisch nicht signifikant war ($HR = 1,85$; $95\%KI = 0,43-8,01$; $p = 0,41$).

Die in unserer Studie als auch in der Literatur beschriebene gesteigerte Inzidenz der aGvHD (Parmar et al. 2009, Askar et al. 2014) ist durchaus nachvollziehbar, denn MICA-Expression findet hauptsächlich auf Epithelzellen und insbesondere dem gastrointestinalen Epithel statt (Groh et al. 1996). Dieses ist als generell besonders anfällig für aGvHD beschrieben worden (Zwirner 1998). Endothelzellen wird eine bedeutende Rolle im Abstoßungsprozess bei allogener Gewebetransplantation zugeschrieben (Regele 2008). Sie bieten eine gute Angriffsfläche für alloreaktive Antikörper und sind an der Steuerung immunologischer Prozesse beteiligt (Regele 2008). Hinzu kommt, dass MICA-Expression

als ein Zeichen von Zellstress durch mehrere Faktoren gesteigert sein dürfte. Zum einen durch die Toxizität der Konditionierungsbehandlung mit einer daraus resultierenden Anhäufung von Immunzellen, als auch durch die Pathophysiologie der aGvHD mit der Ausschüttung einer immensen Anzahl an Zytokinen (Ferrara 2000, Gannagé et al. 2008). NK-Zellen mit ihrem spezifischen NKG2D-Rezeptor für MICA binden an die vermehrt MICA-exprimierenden Epithelzellen und lysieren diese. Die Effekte machen sich insbesondere bei den Zellen des Gastrointestinaltraktes bemerkbar und verursachen als eines der Leitsymptome der aGvHD gastrointestinale Beschwerden (Groh et al. 1996, Gannagé et al. 2008, Elsner et al. 2010). Außerdem könnten spezifische Antikörper gegen inkompatible MICA-Epitope die Trägerzellen schädigen (Zhang et al. 2006). Hinweise hierzu liefern Studien über Transplantatabstoßung solider Organe. Hier konnte in den Seren von Patienten, bei denen es zur Transplantatabstoßung kam, Antikörper gegen MICA nachgewiesen werden (Zwirner et al. 2000). Außerdem war eine höhere Transplantatabstoßung zu beobachten, wenn die Empfänger zuvor gegen MICA sensibilisiert worden waren (Zou et al. 2007). Dieser Effekt wurde als besonders ausgeprägt beschrieben, wenn aufgrund guter HLA-Übereinstimmung ein eher geringes immunologisches Risiko zu erwarten war (Zou et al. 2007).

Wie auch in der Literatur beschrieben, verhielt sich die Relapse-Inzidenz umgekehrt proportional zur Inzidenz der aGvHD (Sullivan et al. 1989, Kim et al. 2007, Peccatori et al. 2010). So gab es einen Trend zu sinkender Relapse-Inzidenz bei MICA-Gemismatchten. Die kumulative Inzidenz des Relapse erreichte in der Patientengruppe der MICA-Gematchten 33,3 % und in der Gruppe der MICA-Inkompatiblen 27,3 % ($p = 0,802$). In der multivariaten Analyse war kein Einfluss eines MICA-Mismatch auf die Relapse-Rate zu erkennen (HR = 0,91; 95 % KI = 0,19-4,39; $p = 0,906$).

4.2.3 MICA*008-Allel

In populationsgenetischen Studien zur Verteilung der MICA-Allele ist das MICA*008-Allel bei Kaukasiern sowie bei Nicht-Kaukasiern das am häufigsten vorkommende Allel. Diese Gruppe wurde daher gesondert untersucht. Sein Anteil in der Bevölkerung beträgt in der Literatur zwischen 28 % und 55 %, wobei asiatische und afrikanische Populationen die niedrigsten Anteile besitzen und über die Hälfte aller Kaukasier Allelträger sind (Petersdorf 1999, Katsuyama et al. 1999, Tian et al. 2001, Marin et al. 2004, Gao et al. 2006). In der hier untersuchten Kohorte lag die Allelfrequenz des MICA*008-Allels bei 55,3 %. 89 von 114 Patienten (78,1 %) waren MICA*008-Allel-Träger. Dieser relativ hohe Prozentsatz ist zum einen auf den hohen Anteil von Kaukasiern in dieser

mitteleuropäischen Kohorte zurückzuführen. Außerdem kam es durch das retrospektive Design der Studie mit dem Einschluss von nur 10/10 gematchten Spender-Empfänger-Paaren zu einer Selektion hin zu häufig vorkommenden Allelen. Bei 37 der MICA*008-Träger (41,6 %) lag das Allel homozygot vor, bei 52 Patienten (58,4 %) heterozygot. Untersucht wurde die Gruppe mit mindestens einem MICA*008-Allel im Vergleich zur Restgruppe. Die Gruppe der MICA*008-homozygoten Träger wurde gesondert untersucht und ebenfalls mit der Restgruppe verglichen.

MICA*008-Allele gehören zu einer Gruppe von Allelen, die auch als MICA*A5.1 bekannt sind (Suemizu et al. 2002). Diese Allele weisen einen wichtigen Unterschied zu anderen MICA-Allelen auf. Sie besitzen eine Guanin-Insertion in dem für die Transmembran-Region codierenden Bereich innerhalb des Exon 5'STR, was zu einem Frameshift und hierdurch zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt. Das exprimierte Protein hat in der Folge eine abgeschnittene Transmembran-Region und keinen, bzw. einen sehr kurzen zytoplasmatischen Schwanz (Mizuki et al. 1997, Ashiru et al. 2013). Diese Mutation führt insbesondere aufgrund einer abweichenden Oberflächenexpression zu deutlich unterschiedlichen biologischen Funktionen (Suemizu et al. 2002). Typischerweise wandern Moleküle intakter MICA-Allele zur basolateralen Zell-Oberfläche intestinaler Epithelzellen, dem Ort, an dem der hauptsächliche Kontakt mit intraepithelialen Lymphozyten, den T-Zellen und NK-Zellen, stattfindet. Der zytoplasmatische Schwanz fungiert dabei als Zuordnungsmerkmal, welches das Molekül zur basolateralen Zellmembran diktiert (Suemizu et al. 2002). Fehlt der zytoplasmatische Schwanz, so wie beim MICA*008-Allel, ordnen sich die Moleküle stattdessen in ungerichteter Weise an der apikalen Zellmembran seiner Trägerzelle an (Suemizu et al. 2002). Dieser Unterschied scheint Auswirkungen auf die immunbiologische Funktion dieser Allele zu haben. Zwar ließ sich beim Vergleich der MICA*008-Träger-Gruppe (5-Jahres-Überleben = 43,2 %) mit der Restgruppe (5-Jahres-Überleben = 40 %) kein signifikanter Einfluss auf OS ($p = 0,918$) und DFS ($p = 0,691$) feststellen. Auch in der homozygoten Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied in Hinblick auf das OS ($p = 0,548$) und das DFS ($p = 0,288$). Jedoch konnte in der Gruppe der MICA*008-Träger eine signifikant höhere Rate der aGvHD nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit der aus einer Studie von Parmar et al. 2009.

In der Gruppe der MICA*008-Allelträger der Patienten fand sich zunächst in der univariaten Analyse eine hochsignifikant höhere kumulative Inzidenz der aGvHD. Sie erreichte hier 48,8 % und lag in der Restgruppe bei 12,0 % ($p = 0,001$). Bei Homozygotie

für das MICA*008-Allel stieg die kumulative Inzidenz der aGvHD weiter auf 57,6 % und lag in der Restgruppe bei 32,4 % ($p = 0,016$). In der multivariaten Analyse der konkurrierenden Endpunkte ließ sich unter Einschluss der signifikanten Risikofaktoren in der Gruppe der MICA*008-Allelträger eine signifikante, nahezu 8-fache Steigerung der Inzidenz der aGvHD im Vergleich zur Restgruppe feststellen ($HR = 7,96$; 95 %KI = 1,64-38,56; $p = 0,01$). In der Gruppe der homozygoten MICA*008-Allelträger war dieser Effekt in der multivariaten Analyse ebenfalls, wenn auch schwächer, ausgeprägt ($HR = 1,84$; 95%KI = 0,99-3,44; $p = 0,054$). Anderson et al. hatten in ihrer Studie zwar gegensätzliche Ergebnisse, nämlich ein verringertes Auftreten der aGvHD bei Vorliegen von MICA*008 festgestellt (Anderson et al. 2009). Jedoch handelte es sich hierbei aufgrund der geringen Größe der Kohorte mit 38 Spender-Empfänger-Paaren um eine Studie mit eingeschränkter Aussagekraft.

Wie aus der Literatur bekannt, war der Anstieg der aGvHD außerdem mit einer verringerten Relapserate assoziiert. In der univariaten Analyse war dieser Effekt nur schwach ausgeprägt. Betrachtet man die Inzidenz des Relapse jedoch in der multivariaten Analyse der konkurrierenden Endpunkte, beobachtet man einen deutlichen, wenngleich nicht signifikanten Trend zu einem Rückgang der Rückfallrate in der MICA*008-Gruppe ($HR = 0,53$; 95 %KI = 0,16-1,82; $p = 0,314$). Dies entspricht der häufig beschriebenen umgekehrten Relation zwischen dem Auftreten von aGvHD und Krankheitsrückfällen in Kohorten mit hämatopoetischer Stammzelltransplantation (Sullivan et al. 1989, Kim et al. 2007, Peccatori et Ciceri 2010).

Aus immunbiologischer Sicht könnten die hier erzielten Ergebnisse durch ein unterschiedliches Expressionsmuster innerhalb der MICA-Allele erklärt werden. Aufgrund der kodominanten Expression der MICA-Allele kommen drei mögliche Szenarien in Betracht: Erstens, kein MICA*008-Allel ist vorhanden, was zu typischer basolateraler MICA-Expression führt. Zweitens, MICA*008 ist homozygot, dann wäre apikale MICA-Expression in intestinalen Epithelzellen zu erwarten. Drittens, ein MICA*008-Allel ist neben einem beliebigen zweiten MICA-Allel vorhanden; dann wäre apikale und basolaterale Expression zu erwarten. Die potenziell grössere Oberfläche für MICA-Expression im letzten Szenario wäre eine mögliche Erklärung für die höhere Anfälligkeit für die Entwicklung einer aGvHD bei den MICA*008-heterozygoten Individuen.

In oben beschriebenem Gedankenexperiment müsste sich in den ersten beiden Szenarien die jeweilige Größe der exprimierenden Oberfläche ähneln und somit zu vergleichbarer

Inzidenz der aGvHD führen. In der MICA*008-homozygoten Gruppe konnte jedoch in der univariaten Analyse mit 57,6 % eine signifikant höhere kumulative Inzidenz der aGvHD als in der Restgruppe (32,4 %, $p = 0,016$) nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine weitere Eigenart der MICA*008-Allele, deren Bedeutung bei der HSCT noch unklar ist. So vermögen einige Viren die MICA-Expression ihrer Host-Zelle zu verringern, um diese, und somit sich selbst vor der Zerstörung durch NK-Zellen und durch zytotoxische T-Lymphozyten zu schützen (Zou et al. 2005, Chalupny et al. 2006, Thomas et al. 2008, Ashiru et al. 2009). Das MICA*008-Allel scheint jedoch gegen diesen Mechanismus der Herabregulation resistent zu sein (Zou et al. 2005; Thomas et al. 2008). Im Falle einer Virusinfektion würde MICA*008 somit weiterhin exprimiert und eher dem Immunsystem zugänglich gemacht, was zu einer besseren Bekämpfung bei Virusinfekten beitragen könnte. MICA*008-Allele hätten somit ohne ihren zytoplasmatischen Schwanz einen Selektionsvorteil, was eine Erklärung für seine hohe Allelfrequenz in allen bekannten Populationen sein könnte. Diese Besonderheit der MICA*008-Allele könnte sich jedoch bei der HSCT als Nachteil erweisen, da es sich hier bei der MICA-tragenden Zelle nicht um eine kranke, virusinfizierte Zelle, sondern um eine gesunde Körperzelle handelt, die im Rahmen der aGvHD vom Spenderimmunsystem als fremd erkannt und angegriffen wird. Zwar wurden die beschriebenen Effekte bisher nur bei viralen Infektionen, z.B. durch das Humane Cytomegalievirus (HCMV) oder das Humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8), beschrieben. Denkbar wäre jedoch, dass das MICA*008-Allel auch in anderen Situationen, wie beispielsweise bei malignen Erkrankungen, durch seine molekularen Unterschiede verhältnismäßig häufiger exprimiert wird. Dies könnte eine weitere Erklärung für die allgemein gesteigerte Anfälligkeit für aGvHD bei Vorhandensein von MICA*008 und für die weitere Steigerung der aGvHD bei Homozygotie für MICA*008 sein.

Einige Studien zeigen, dass sich MICA A5.1-Moleküle nicht in die Zellmembran integrieren, sondern als lösliches Protein (sMICA) im endoplasmatischen Retikulum gebildet und später in den Extrazellulärraum sezerniert werden (Mizuki et al. 1997). Dies würde bei homozygotem Vorliegen von MICA A5.1 ein komplettes Fehlen von MICA-Expression auf der Zelloberfläche bedeuten (Kennedy et al. 2002), was allerdings im Widerspruch zur beschriebenen, gesteigerten aGvHD stehen würde. Ausserdem gibt es Hinweise dafür, dass lösliches MICA in der Lage ist, den NKG2D-Rezeptor von Immunzellen herabzuregulieren und somit die Zytotoxizität von NK-Zellen herabzusetzen (Ashiru et al. 2010 et 2013). Diese Herabregulation war bei Tumorpatienten mit einer

schlechteren Prognose assoziiert (Baragaño Raneros et al. 2014) und könnten bei der HSCT zu einem verringerten GvL-Effekt führen. Unsere Beobachtungen lassen jedoch durch die gesteigerte Inzidenz der aGvHD auf einen ebenfalls gesteigerten GvL-Effekt schliessen.

Die gesteigerte aGvHD bei MICA*008-Trägern hatte eine gesteigerte Rate an TRM zur Folge. Die kumulative Inzidenz für TRM lag in der Gruppe der MICA*008-Allel-Träger bei 32,5 % und somit geringfügig höher als in der Restgruppe mit 24,0 % ($p = 0,427$). In der multivariaten Analyse der konkurrierenden Endpunkte war der Trend deutlich sichtbar, allerdings ebenfalls nicht signifikant ($HR = 2,53$; 95 %KI = 0,55-11,73; $p = 0,235$). Homozygotie für MICA*008 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Auftreten der TRM ($HR = 1,07$; 95 %KI = 0,41-2,81; $p = 0,891$). Statistisch gesehen könnten die Ergebnisse eine höhere Inzidenz an Versterben durch aGvHD in der frühen Posttransplantationsphase andeuten, was sich mit der beschriebenen, gesteigerten Inzidenz für aGvHD deckt.

4.3 Limitationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie müssen mit Vorsicht interpretiert werden. Das Design der Studie war retrospektiv, und um potenzielle Interferenzen von HLA-Mismatches (Loiseau et al. 2007, Park et al. 2011) auszuschliessen, wurden ausschließlich hochauflösend gematchte Transplantationspaare verwendet, d.h. alle in diesem Kollektiv untersuchten Transplantationspaare waren auf 10 ihrer jeweiligen HLA-Merkmale hin identisch gematcht. Zur MICA-Übereinstimmung hatte im Vorfeld keine Untersuchung auf das Matching hin stattgefunden. Trotzdem ergab die Genotypisierung bei 102 von 114 Transplantationspaaren (89,5 %) ein komplettes MICA-Match. Dies ist auf eine hohe Kopplungsrate der direkt benachbarten Genloci von HLA-B und MICA zurückzuführen (Marin et al. 2004, Gao et al. 2006). Da Voraussetzung zum Studieneinschluss ein komplettes HLA-Matching war, ergab sich somit eine ebenfalls hohe Rate an MICA-Übereinstimmung. Die geringe Anzahl an MICA-Mismatches limitierte jedoch die statistische Aussagekraft bezüglich ihrer Auswirkungen auf das Outcome bei hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Die insgesamt eher niedrige Anzahl an Patienten führte außerdem zu relativ breiten Konfidenzintervallen. Größer angelegte Studien müssten den potenziellen Effekt der MICA-Polymorphismen auf die aGvHD genauer untersuchen.

4.4 Schlussfolgerung

Vieles deutet darauf hin, dass MICA-Moleküle als Zellstress-induzierte Antigene eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Prozessen der Immunabwehr des Körpers spielen. Die hohe Mortalität bei Blutstammzelltransplantationen ist weiterhin ein grosser Nachteil dieser Therapieform. Die Funktion von MICA voll zu verstehen, könnte das Risiko immunologischer Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen kalkulierbarer machen, sowie das Outcome verbessern. Da die hochauflösende Genotypisierung heutzutage Standard für die Spendersuche bei hämatopoetischer Stammzelltransplantation ist und auch die Anzahl der Transplantationen weiter ansteigt, ist in unserem Zentrum eine Nachfolgestudie geplant, um anhand einer größeren Kohorte dieser Frage nachzugehen.

5 Zusammenfassung

Die Entdeckung und Erforschung des Humanen Leukozyten-Antigen-Systems (HLA-System) vor über 30 Jahren eröffnete die Möglichkeit der Therapie vor allem maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems durch die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen. Seither ist ein kontinuierlicher Rückgang der Mortalität bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation zu verzeichnen, der jedoch in erster Linie besseren Behandlungsoptionen bei Infektionen zuzuschreiben ist. Da zum Zeitpunkt der untersuchten Transplantationen trotz kompletter Übereinstimmung der Humanen Leukozyten-Antigene das Outcome bei der nicht-verwandten hämatopoetischen Stammzelltransplantation schlechter war als bei der Verwendung eines Familienspenders, wurde die Suche nach weiteren Gewebsantigenen forciert. Es wurde ein Gen in direkter Nachbarschaft des HLA-B-Genlocus (Humanes Leukozyten-Antigen, Gruppe B) innerhalb des menschlichen MHC (main histocompatibility complex) klassifiziert. Dieses wurde als MHC class I chain related Gene A (MICA) bezeichnet. Die vorliegende Studie zielte darauf ab, dieses Gen und seine Polymorphismen zu untersuchen, und ihren Einfluss auf das Outcome bei der nicht-verwandten Blutstammzelltransplantation zu analysieren. Hierzu wurden Daten und DNA-Proben aus einer früheren Studie über HLA-Differenzen bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation verwendet. Mittels labordiagnostischer Verfahren wurden die Proben von Patienten und Spendern hinsichtlich des MICA-Gens und seiner Polymorphismen typisiert. Zur statistischen Analyse der gewonnenen Daten kamen Kaplan-Meier-Kurven, der Logrank-Test, die Cox-Regressionsanalyse sowie kumulative Inzidenzen und die kompetitive Risikoanalyse zur korrekten Darstellung konkurrierender Endpunkte zur Anwendung.

Bezüglich des Gesamtüberlebens und des krankheitsfreien Überlebens konnte ein signifikant besseres Outcome bei MICA-gematchten Spender-Empfänger-Paaren nachgewiesen werden. Es fand sich außerdem eine signifikant höhere Rate von aGvHD (engl.: acute graft-versus-host disease) in der Gruppe der MICA*008-Allel-tragenden Patienten, die das Gesamtüberleben jedoch nicht beeinflussten. Nachteile dieser Studie waren das retrospektive Design sowie die eher niedrige Anzahl an Patienten. Dennoch legitimieren die Daten der vorliegenden Arbeit zu weiteren Nachforschungen in grösseren Kohorten, um eine Bestätigung der beobachteten Effekte zu ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

1. Anderson E, Grzywacz B, Wang H, Wang T, Haagenson M, Spellman S, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR: Limited role of MHC class I chain-related gene A (MICA) typing in assessing graft-versus-host disease risk after fully human leukocyte antigen-matched unrelated donor transplantation. *Blood* 114: 4753-4754 (2009)
2. Aschan J: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *Br Med Bull* 77-78: 23-36 (2006)
3. Ashiru O, Bennett NJ, Boyle LH, Thomas M, Trowsdale J, Wills MR: NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol* 83: 12345-12354 (2009)
4. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT: Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 70: 481-489 (2010)
5. Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, Valés-Gómez M: A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. *Biochem J* 454: 295-302 (2013)
6. Askar M, Sun Y, Rybicki L, Zhang A, Thomas D, Kalaycio M, Pohlman B, Dean R, Duong H, Hanna R, Maciejewski J, Majhail NS, Bolwell B, Sobecks R: Synergistic Effect of Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A and Human Leukocyte Antigen-DPB1 Mismatches in Association with Acute Graft-versus-Host Disease after Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 20: 1835-1840 (2014)
7. Babor F, Fischer JC, Uhrberg M: The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. *Front Immunol* 4: 27 (2013)
8. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T: A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6259-6263 (1994)
9. Bahram S, Spies T: The mic gene family. *Res Immunol* 147: 328-333 (1996)
10. Baragaño Raneros A, Suarez-Álvarez B, López-Larrea C: Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands. *Oncoimmunology* 3: e28497 (2014)
11. Barton-Burke M, Dwinell DM, Kafkas L, Lavalley C, Sands H, Proctor C, Johnson E: Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant. *Oncology* 22: 31-45 (2008)
12. Bastos-Oreiro M, Anguita J, Martínez-Laperche C, Fernández L, Buces E, Navarro A, Pascual C, Pérez-Corral A, Balsalobre P, Muñoz C, Kwon M, Serrano D, Perez-Martinez A, Buño I, Gayoso J, Díez-Martín JL: Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor (iKIR) mismatches improve survival after T-cell-repleted haploidentical transplantation. *Eur J Haematol* 96: 483-491 (2016)
13. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science* 285: 645-647 (1999)

-
14. 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)
 15. Bird L: Immune responses. Micromanaging stress. *Nature Reviews Immunology* 8: 661 (2008)
 16. Bland JM, Altman DG: The logrank test. *BMJ* 328: 1073 (2004)
 17. Bokhari SW, Watson L, Nagra S, Cook M, Byrne JL, Craddock C, Russell NH: Role of HCT-comorbidity index, age and disease status at transplantation in predicting survival and non-relapse mortality in patients with myelodysplasia and leukemia undergoing reduced-intensity-conditioning hemopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 47: 528-534 (2012)
 18. Carlens S, Aschan J, Remberger M, Dilber M, Ringdén O. Low-dose cyclosporine of short duration increases the risk of mild and moderate GvHD and reduces the risk of relapse in HLA-identical sibling marrow transplantation recipients with leukemia. *Bone Marrow Transplant* 24: 629-635 (1999)
 19. Chalupny NJ, Rein-Weston A, Dosch S, Cosman D: Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 175-181 (2006)
 20. Champlin RE, Passweg JR, Zhang MJ, Rowlings PA, Pelz CJ, Atkinson KA, Barrett AJ, Cahn JY, Drobyski WR, Gale RP, Goldman JM, Gratwohl A, Gordon-Smith EC, Henslee-Downey PJ, Herzig RH, Klein JP, Marmont AM, O'Reilly RJ, Ringdén O, Slavin S, Sobocinski KA, Speck B, Weiner RS, Horowitz MM: T-cell depletion of bone marrow transplants for leukemia from donors other than HLA-identical siblings: advantage of T-cell antibodies with narrow specificities. *Blood* 95: 3996-4003 (2000)
 21. Collins RW: Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet* 31: 105-114 (2004)
 22. Copelan EA.: Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 354: 1813-1826 (2006)
 23. Craddock C, Nagra S, Peniket A, Brookes C, Buckley L, Nikolousis E, Duncan N, Tauro S, Yin J, Liakopoulou E, Kottaridis P, Snowden J, Milligan D, Cook G, Tholouli E, Littlewood T, Peggs K, Vyas P, Clark F, Cook M, Mackinnon S, Russell N: Factors predicting long-term survival after T-cell depleted reduced intensity allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 95: 989-995 (2010)
 24. Daikeler T, Tichelli A, Passweg J: Complications of autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with autoimmune diseases. *Pediatr Res* 71: 439-444 (2012)
 25. De Pagter PJ, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, Uiterwaal CS, van Baarle D, Sanders EA, Boelens J: Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 831-839 (2008)
 26. Deeg HJ, Antin JH: The clinical spectrum of acute graft-versus-host disease. *Semin Hematol* 43: 24-31 (2006)

-
27. Demiriz IS, Tekgunduz E, Altuntas F: What Is the Most Appropriate Source for Hematopoietic Stem Cell Transplantation? Peripheral Stem Cell/Bone Marrow/Cord Blood. *Bone Marrow Research* Volume 2012: Article ID 834040, 5 Seiten (2012)
 28. Dreger P, Brand R, Milligan D, Corradini P, Finke J, Lambertenghi Delilieri G, Martino R, Russell N, van Biezen A, Mitchallet M, Niederwieser D; Chronic Leukemia Working Party of the EBMT: Reduced-intensity conditioning lowers treatment-related mortality of allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a population-matched analysis. *Leukemia* 19: 1029-1033 (2005)
 29. Eapen M, Horowitz MM, Klein JP, Champlin RE, Loberiza FR Jr, Ringdén O, Wagner JE: Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 22: 4872-4880 (2004)
 30. Eapen M, Rocha V: Principles and analysis of hematopoietic stem cell transplantation outcomes: the physician's perspective. *Lifetime Data Anal* 14: 379-388 (2008)
 31. El Kassar N, Legouvello S, Joseph CM, Salesses P, Rieux C, Cordonnier C, Vernant JP, Farcet JP, Bierling P, Kuentz M: High resolution HLA class I and II typing and CTLp frequency in unrelated donor transplantation: a single-institution retrospective study of 69 BMTs. *Bone Marrow Transplant* 27: 35-43 (2001)
 32. Elsner L, Flügge PF, Lozano J, Muppala V, Eiz-Vesper B, Demiroglu SY, Malzahn D, Herrmann T, Brunner E, Bickeböller H, Multhoff G, Walter L, Dressel R: The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *J Cell Mol Med* 14: 992-1002 (2010)
 33. Ferrara JL: Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. *J Hematother Stem Cell Res* 9: 299-306 (2000)
 34. Ferrara JL1, Levine JE, Reddy P, Holler E: Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550-1561 (2009)
 35. Ferrara JLM, Deeg HJ: Graft-versus-host disease. *New Engl J Med* 324: 667-674 (1991)
 36. Fine JP, Gray RJ: A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc* 94: 496-509 (1999)
 37. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D: Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 104: 1923-1930 (2004)
 38. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S: Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44: 351-357 (1996)
 39. Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S: MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 49: 557-560 (1999)

-
40. Frigoul A, Lefranc MP: MICA: standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases, *Recent Research Developments in Human Genetics* 3: 95-145 (2005)
 41. Fürst D, Müller 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)
 42. Fürst D, Solgi G, Recker K, Mytilineos D, Schrezenmeier H, Mytilineos J: Sequence-based typing of major histocompatibility complex class I chain-related gene A alleles by use of exons 2-5 information. *Tissue Antigens* 77: 201-205 (2011)
 43. Gambelunghe G, Falorni A: MICA Gene: A New Polymorphic Major Histocompatibility complex (MHC) Susceptibility Gene for Autoimmune Endocrine Diseases. *Trends in Immunology Research*: 17-32 (2005)
 44. Gannagé M, Buzyn A, Bogiatzi SI, Lambert M, Soumelis V, Dal Cortivo L, Cavazzana-Calvo M, Brousse N, Caillat-Zucman S. Induction of NKG2D ligands by gamma radiation and tumor necrosis factor-alpha may participate in the tissue damage during acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 85: 911-915 (2008)
 45. Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O'Brien SJ, Carrington M: Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two North American populations. *Hum Immunol* 67: 152-158 (2006)
 46. Garcia KC, Degano M, Pease LR, Huang M, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA: Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 279: 1166-1172 (1998)
 47. Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, Steffens C, Nguyen C, Lehrach H, Hofer E, Francis F. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* 48: 163-173 (1998)
 48. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED: Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18(4): 295-304 (1974)
 49. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, Martin PJ, Sandmaier BM, Marr KA, Appelbaum FR, Storb R, McDonald GB: Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 363: 2091-2101 (2010)
 50. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, Einsele H, Cordonnier C, Acute and Chronic Leukemia Working Parties, Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation: Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant* 36: 757-769 (2005)
 51. Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat* 16: 1141-1154 (1988)
 52. Gray RJ: The cmprsk Package. Subdistribution analysis of competing risks. <https://cran.r-project.org/web/packages/cmprsk/cmprsk.pdf> (8.07.2015)

-
53. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89: 2079-2088 (1997)
 54. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, and Spies T: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*: 93: 12445-12450 (1996)
 55. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spiess T: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial GammaDelta T cells. *Science* 279: 1737-1740 (1998)
 56. Guo SW, Thompson EA: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372 (1992)
 57. Gupta V, Tallman MS, He W, Logan BR, Copelan E, Gale RP, Khoury HJ, Klumpp T, Koreth J, Lazarus HM, Marks DI, Martino R, Rizzieri DA, Rowe JM, Sabloff M, Waller EK, DiPersio JF, Bunjes DW, Weisdorf DJ: Comparable survival after HLA-well-matched unrelated or matched sibling donor transplantation for acute myeloid leukemia in first remission with unfavorable cytogenetics at diagnosis. *Blood* 116: 1839-1848 (2010)
 58. Hahn T, McCarthy PL Jr, Hassebroek A, Bredeson C, Gajewski JL, Hale GA, Isola LM, Lazarus HM, Lee SJ, Lemaistre CF, Loberiza F, Maziarz RT, Rizzo JD, Joffe S, Parsons S, Majhail NS: Significant improvement in survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation during a period of significantly increased use, older recipient age, and use of unrelated donors. *J Clin Oncol* 31: 2437-2449 (2013)
 59. Hamadani M, Mohty M, Kharfan-Dabaja MA: Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia. *Cancer Control* 18: 237-245 (2011)
 60. Hansen JA, Petersdorf EW, Lin MT, Wang S, Chien JW, Storer B, Martin PJ: Genetics of allogeneic hematopoietic cell transplantation. Role of HLA matching, functional variation in immune response genes. *Immunol Res* 41: 56-78 (2008)
 61. Heinemann F: Molekulargenetische Analyse der minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHag) und deren Relevanz für die allogene Blutstammzell-Transplantation. *Med Dissertation, Universität Duisburg-Essen* (2004)
 62. Henslee-Downey PJ, Abhyankar SH, Parrish RS, Pati AR, Godder KT, Neglia WJ, Goon-Johnson KS, Geier SS, Lee CG, Gee AP: Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. *Blood* 89: 3864-3872 (1997)
 63. Holtick U, Albrecht M, Chemnitz JM, Theurich S, Skoetz N, Scheid C, von Bergwelt-Baildon M: Bone marrow versus peripheral blood allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD010189 (2014)
 64. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555-562 (1990)
 65. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC, Jr., Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S: Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5: 889-899 (2004)

-
66. Hüe S, Monteiro RC, Berrih-Aknin S, Caillat-Zucman S: Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells. *J Immunol* 171: 1909-1917 (2003)
 67. Imamura M, Asano S, Harada M, Ikeda Y, Kato K, Kato S, Kawa K, Kojima S, Morishima Y, Morishita Y, Nakahata T, Okamura J, Okamoto S, Shiobara S, Tanimoto M, Tsuchida M, Atsuta Y, Yamamoto K, Tanaka J, Hamajima N, Kodera Y: Current status of hematopoietic cell transplantation for adult patients with hematologic diseases and solid tumors in Japan. *Int J Hematol* 83: 164-178 (2006)
 68. Isernhagen, A: Functional effects of the MICA-129 dimorphism on NK cell activity and association with the outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Med Dissertation, Universität Göttingen* (2014)
 69. Joyce MG, Sun PD: The Structural Basis of Ligand Recognition by Natural Killer Cell Receptors. *J Biomed Biotechnol Volume 2011: Article ID 203628, 15 Seiten* (2011)
 70. Kalwak K, Moso? I, Cwian J, Gorczy?ska E, Toporski J, Turkiewicz D, Latos-Grazy?ska E, Chybicka A: A prospective analysis of immune recovery in children following allogeneic transplantation of t-cell-depleted or non-T-cell-depleted hematopoietic cells from HLA-disparate family donors. *Transplant Proc* 35: 1551-1555 (2003)
 71. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *JASA* 53: 457-481 (1958)
 72. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319: 675-678 (1986)
 73. Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuki N, Kera J, Bahram S, Nose Y, Inoko H: Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54: 178-184 (1999)
 74. Kennedy C, Naipal A, Gruis NA, Struijk L, ter Schegget J, Willemze R, Claas FH, Bouwes Bavinck JN, Doxiadis II: MICA gene polymorphism is not associated with an increased risk for skin cancer. *J Invest Dermatol* 118: 686-691 (2002)
 75. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, Beatty PG, Champlin R, Filipovich A, Gajewski J, Hansen JA, Henslee-Downey J, McCullough J, McGlave P, Perkins HA, Phillips GL, Sanders J, Stroncek D, Thomas ED, Blume KG: Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med* 328: 593-602 (1993)
 76. Kim HJ, Min WS, Eom KS, Cho BS, Kim SY, Bok JN, Kim KS, Min CK, Lee S, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Kim CC: Anti-leukaemic role of acute GvHD after unrelated haematopoietic stem cell transplantation in intermediate- to high-risk acute myelogenous leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 40: 1069-1074 (2007)
 77. Kim HT: Cumulative incidence in competing risks data and competing risks regression analysis. *Clin Cancer Res* 13: 559-565 (2007)
 78. Kirsten H, Petit-Teixeira E, Scholz M, Hasenclever D, Hantmann H, Heider D, Wagner U, Sack U, Hugo Teixeira V, Prum B, Burkhardt J, Pierlot C, Emrich F, Cornelis F, Ahnert P: Association of MICA with rheumatoid arthritis independent of known HLA-DRB1 risk alleles in a family-based and a case control study. *Arthritis Res Ther* 11: 60 (2009)

-
79. Kitcharoen K, Witt CS, Romphruk AV, Christiansen FT, Leelayuwat C: MICA, MICB, and MHC beta block matching in bone marrow transplantation: relevance to transplantation outcome. *Hum Immunol* 67: 238-246 (2006)
 80. Klein JP, Andersen PK: Regression modeling of competing risks data based on pseudovalues of the cumulative Incidence function. *Biometrics* 61: 223-229 (2005)
 81. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H; European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86: 2041-2050 (1995)
 82. Körbling M und Freireich EJ: Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 117: 6411-6416 (2011)
 83. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C: High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 110: 4576-4583 (2007)
 84. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, Carabasi MH, Gale RP, Giralt S, Hale GA, Ilhan O, McCarthy PL, Socie G, Verdonck LF, Weisdorf DJ, Horowitz MM.: Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 100: 406-414 (2002)
 85. Li J, Cui L, He W: Distinct Pattern of Human V α 1 ?? T Cells Recognizing MICA. *Cell Mol Immunol* 2: 253-256 (2005)
 86. Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK: Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2: 443-451 (2001)
 87. Ljunggren HG, Kärre K: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11: 237-244 (1990)
 88. 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)
 89. Luger SM, Ringdén O, Zhang MJ, Pérez WS, Bishop MR, Bornhauser M, Bredeson CN, Cairo MS, Copelan EA, Gale RP, Giralt SA, Gulbas Z, Gupta V, Hale GA, Lazarus HM, Lewis VA, Lill MC, McCarthy PL, Weisdorf DJ, Pulsipher MA: Similar outcomes using myeloablative vs reduced-intensity allogeneic transplant preparative regimens for AML or MDS. *Bone Marrow Transplant* 47: 203-211 (2012)
 90. Marin ML, Savioli CR, Yamamoto JH, Kalil J, Goldberg AC: MICA polymorphism in a sample of the São Paulo population, Brazil. *Eur J Immunogenet* 31: 63-71 (2004)

-
91. Martin M, Mann D, Carrington M: Recombination rates across the HLA complex: use of microsatellites as a rapid screen for recombinant chromosomes. *Hum Mol Genet* 4: 423-428 (1995)
 92. Mavroudis D, Barrett J: The graft-versus-leukemia effect. *Curr Opin Hematol* 3: 423-429 (1996)
 93. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1298-1303 (1997)
 94. Mohty M, Bay JO, Faucher C, Choufi B, Bilger K, Tournilhac O, Vey N, Stoppa AM, Coso D, Chabannon C, Viens P, Maraninchi D, Blaise D: Graft-versus-host disease following allogeneic transplantation from HLA-identical sibling with antithymocyte globulin-based reduced-intensity preparative regimen. *Blood* 102: 470-476 (2003)
 95. Molinero LL, Marcos CY, Mirbaha F, Fainboim L, Stastny P, Zwirner NW: Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. *Eur J Immunogenet* 29: 315-319 (2002)
 96. 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: Deutscher Konsensus 2013 zur immungenetischen Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation. *Transfusionsmedizin* 4: 190-196 (2014)
 97. Mytilineos J, Fürst D: Ethikantrag: Retrospektive genetische Analysen von Non-HLA Polymorphismen und nicht klassischen HLA-Polymorphismen im Hinblick auf deren Einfluss bei der nicht-verwandten Blutstammzelltransplantation. Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm. Antrag Nr. 263/09 (2007)
 98. Niederwieser D, Pasquini MC, Aljurf MD, Confer DL, Baldomero H, Bouzas LF, Horowitz MM, Minako Iida M, Kodaera Y, Lipton JH, Oudshoorn M, Gluckman E, Passweg JR, Szer J, Novitzky N, van Rood JJ, Noel L, Madrigal JA, Frauendorfer K, Gratwohl A, Appelbaum FR: Global Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) At One Million: An Achievement Of Pioneers and Foreseeable Challenges For The Next Decade. A Report From The Worldwide Network For Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 122: 2133 (2013)
 99. Ota M, Katsuyama Y, Mizuki N, Ando H, Furihata K, Ono S, Pivetti-Pezzi P, Tabbara KF, Palimeris GD, Nikbin B, Davatchi F, Chams H, Geng Z, Bahram S, Inoko H: Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 49: 448-454 (1997)
 100. Park M, Koh KN, Kim BE, Im HJ, Park KD, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Park HJ, Park BK, Seo JJ: The impact of HLA matching on unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in Korean children. *Korean J Hematol* 46: 11-17 (2011)

-
101. Parmar S, Del Lima M, Zou Y, Patah PA, Liu P, Cano P, Rondon G, Pesoa S, de Padua Silva L, Qazilbash MH, Hosing C, Popat U, Kebriaei P, Shpall EJ, Giralto S, Champlin RE, Stastny P, Fernandez-Vina M: Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood* 114: 2884-2887 (2009)
 102. Pasquini MC, Wang Z. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides. <http://www.cibmtr.org> (23.06.2015)
 103. Peccatori J, Ciceri F: Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 95: 857-859 (2010)
 104. Perez LE: Outcomes from unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Control* 18: 216-221 (2011)
 105. Perz JB, Gürel S, Schonland SO, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P: CD4+CD25highCD127low regulatory T cells in peripheral blood are not an independent factor for chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Scientific World Journal* 3: 606839 (2012)
 106. Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA: Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 49: 605-612 (1999)
 107. Pittari G, Fregni G, Roguet L, Garcia A, Vataire AL, Wittnebel S, Amsellem S, Chouaib S, Bourhis JH, Caignard A: Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant* 45: 862-871 (2010)
 108. Pollock RA, Chandran V, Pellett FJ, Thavaneswaran A, Eder L, Barrett J, Rahman P, Farewell V, Gladman DD: The functional MICA-129 polymorphism is associated with skin but not joint manifestations of psoriatic disease independently of HLA-B and HLA-C. *Tissue Antigens* 82: 43-47 (2013)
 109. Powles R, Mehta J, Kulkarni S, Treleaven J, Millar B, Marsden J, Shepherd V, Rowland A, Sirohi B, Tait D, Horton C, Long S, Singhal S: Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. *Lancet* 355: 1231- 1237 (2000)
 110. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED: 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 15: 825-828 (1995)
 111. Recker K: Auswirkungen von Minor Histokompatibilitätsantigen Mismatches auf die unverwandte, allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation. *Med Dissertation, Universität Ulm* (2012)
 112. Regele H: The role of endothelial cells in allograft rejection. *Pathologe* 29: 141-144 (2008)
 113. Ribera JM: Allogeneic stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: when and how. *Haematologica* 96: 1083-1086 (2011)
 114. Roberts I A G, de la Fuente J: HSCT in the haemoglobinopathies. *European group for blood and transplantation, EBMTESHhandbook Chapter 43* (accessed 14.12.2014) <http://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library> (2008)

-
115. Robin M, Porcher R, Adès L, Boissel N, Raffoux E, Xhaard A, Larghero J, Gardin C, Himberlin C, Delmer A, Fenaux P, Dombret H, Socié G, Peffault de Latour R: Matched unrelated or matched sibling donors result in comparable outcomes after non-myeloablative HSCT in patients with AML or MDS. *Bone Marrow Transplant* 48: 1296-1301 (2013)
 116. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE: The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases *Nucleic Acids Research* 43: 423-431 (2015)
 117. Roifman C M, Fischer A, Notarangelo L D, de la Morena M T, Seger R A: Indications for hemopoietic stem cell transplantation. *Immunol Allergy Clin North Am* 30: 261-262 (2010)
 118. Saber W, Opie S, Rizzo JD, Zhang MJ, Horowitz MM, Schriber J: Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood* 119: 3908-3916 (2012)
 119. Sanger F, Nicklen S, Coulson A R: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467 (1977)
 120. Schaffer JV: The changing face of graft-versus-host disease. *Semin Cutan Med Surg* 25: 190-200 (2006)
 121. Schemper M and Smith TL: A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Controlled clinical trials* 17: 343-346 (1996)
 122. Scrucca L, Santucci A, Aversa F: Competing risk analysis using R: an easy guide for clinicians. *Bone Marrow Transplant* 40: 381-387 (2007)
 123. Scrucca L, Santucci A, Aversa F: Regression modeling of competing risk using R: an in depth guide for clinicians. *Bone Marrow Transplant* 45: 1388-1395 (2010)
 124. Serna DS, Lee SJ, Zhang MJ, Baker S, Eapen M, Horowitz MM, Klein JP, Rizzo JD, Loberiza FR Jr: Trends in Survival Rates After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Acute and Chronic Leukemia by Ethnicity in the United States and Canada. *J Clin Oncol* 21: 3754-3760 (2003)
 125. Shankarkumar U: The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. *Int J Hum Genet* 4: 91-103 (2004)
 126. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, Thomas ED: Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 69: 204-217 (1980)
 127. Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, et al. High resolution HLA matching associated with decreased mortality after unrelated bone marrow transplantation. *Blood* 87: 4455-4462. (1996)
 128. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T: Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53: 279-287 (2001)
 129. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, Witherspoon RP, Bensinger W, Flowers ME, Martin P, Storb R, Appelbaum FR, Boeckh M: Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 97: 3380-3389 (2001)

-
130. Strominger JL: The gamma delta T cell receptor and class Ib MHC related proteins: enigmatic molecules of immune recognition. *Cell* 57: 895-898 (1989)
 131. Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, Inoko H: A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2971-2976 (2002)
 132. Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, Witherspoon RP, Fefer A, Fisher L, Buckner CD, Anasetti C, Appelbaum FR, Badger C: Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 73: 1720-1728 (1989)
 133. Tay GK, Witt CS, Christiansen FT, Charron D, Baker D, Herrmann R, Smith LK, Diepeveen D, Mallal S, McCluskey J: Matching for MHC haplotypes results in improved survival following unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 15: 381-385 (1995)
 134. Thomas ED, Lochte HL Jr; Lu WC, Ferrebee JW: Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257: 491-496 (1957)
 135. Thomas M, Boname JM, Field S, Nejentsev S, Salio M, Cerundolo V, Wills M, Lehner PJ: Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1656-1661 (2008)
 136. Tian W, Boggs DA, Ding WZ, Chen DF, Fraser PA: MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 29 African-American families. *Immunogenetics* 53: 724-728 (2001)
 137. Warren EH, Deeg HJ.: Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens* 81: 183-193 (2013)
 138. Waßmuth R: Einführung in das HLA-System. *Ecomed Medizin, Landsberg/Lech*, 2. Auflage. S. 9-32 (2005)
 139. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH: An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285: 730-732 (1999)
 140. Wu S, Zhang C, Zhang X, Xu YQ, Deng TX: Is peripheral blood or bone marrow a better source of stem cells for transplantation in cases of HLA-matched unrelated donors? A meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 96: 20-33 (2015)
 141. Wu X and Liu Q: Epstein - Barr virus - associated Diseases in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: *J Hematol Oncol* 5: 8 (2012)
 142. Zentrales Knochenmarkspenderregister Deutschland: Blutstammzellspender: Seit nunmehr 20 Jahren steigt die Anzahl neuer Spender konstant. Pressemitteilung 30.12.2011. <https://www.zkrd.de/de/press/detail/4434> (accessed 25.06.2015)
 143. Zentrales Knochenmarkspenderregister Deutschland: Spenderzahlen. <http://www.zkrd.de/de/spenderzahlen> (accessed 19.07.2015)
 144. Zentrales Knochenmarkspenderregister Deutschland: Wie lange dauert eine Spendersuche? http://www.zkrd.de/de/spendersuche/wie_lange_dauert_eine_spendersuche.php. (accessed 19.07.2015)

-
145. Zhang Y, Stastny P: MICA antigens stimulate T cell proliferation and cell-mediated cytotoxicity. *Hum Immunol* 67: 215-222 (2006)
 146. Zhou QL, Tang XW, Sun AN, Qiu HY, Jin ZM, Miao M, Fu ZZ, Zhao BR, Shi XL, Chen GH, Wu DP: Impact of disease status on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 20: 954-958 (2012)
 147. Ziegler A, Lange S, Bender R.: Survival analysis: Cox regression. *Dtsch Med Wochenschr* 132: 42-44 (2007)
 148. Zinkernagel RM, Doherty PC: Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogeneic system. *Nature* 248: 701-702 (1974)
 149. Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P: Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J Immunol* 174: 3098-3104 (2005)
 150. Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A, Zhang Y, Lavingia B, Stastny P: MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum Immunol* 63: 30-39 (2002)
 151. Zou Y, Stastny P, Süssal C, Döhler B, Opelz G: Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 357: 1293-1300 (2007)
 152. Zou Y, Stastny P: Antibodies against major histocompatibility complex class I-related chain A in transplant recipients. *Chin Med J (Engl)* 124: 764-770 (2011)
 153. Zwirner NW, Dole K, Stastny P: Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 60: 323-330 (1999)
 154. Zwirner NW, Fernández-Viña MA, Stastny P: MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 47: 139-148 (1998)
 155. Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Stastny P: Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol* 61: 917-924 (2000)

7 Danksagung

Nun möchte ich zum Abschluss gerne all denjenigen Menschen danken, die mir diese Arbeit erst ermöglichten, mich begleitet, motiviert und unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. H. Schrezenmeier, der es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung zu schreiben.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. H. Schrezenmeier, Herrn PD. J. Mytilineos und Herrn Dr. D. Fürst für die Korrektur und Begutachtung dieser Arbeit.

Besonders hervorzuheben ist Herr Dr. D. Fürst. Ihm danke ich sehr für seine Geduld, sein ständig offenes Ohr für meine Fragen und für seine stets ausgezeichnete Unterstützung.

Zu besonderem Dank bin ich auch Frau Dr. K. Reckers verpflichtet, die mir immer so hilfsbereit zur Seite stand und mir wichtige Hinweise und Tips zur Erstellung der Arbeit gab. Hier ist auch das gesamte Laborpersonal zu nennen, das mir stets so freundlich und geduldig auf meine Fragen antwortete und mich bei der Laborarbeit unterstützte.

Selbstverständlich ist so eine Arbeit nicht möglich ohne die moralische Unterstützung von lieben Menschen, die einem immer wieder Mut machen und zur Seite stehen, wenn es einmal nicht so gut läuft. Hier möchte ich mich ganz besonders bei meinen lieben Eltern bedanken, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglichten, mich immer so selbstverständlich unterstützten und mir auch für diese Arbeit sehr viel Kraft und Mut gaben. Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen drei lieben Geschwistern, die nicht müde wurden mich zu motivieren und immer für mich da waren. Zu guter Letzt bedanke ich mich bei all jenen, die mir in dieser langen Zeit nahe standen, für ihre Geduld und moralische Unterstützung.