Universität Ulm
Institut für Transfusionsmedizin

Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier

Der Einfluss von HLA-E Polymorphismen auf den Erfolg der nichtverwandten Stammzelltransplantation
- Eine retrospektive Analyse -

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

eingereicht von
Jovana Bindja
Stuttgart
2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schrezenmeier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Bullinger

Tag der Promotion: 17.01.2014

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Bedeutung des humanen Leukozytenantigensystem (HLA-System) 1

1.1.1 Polygenie und Polymorphismus des HLA-Komplexes 1

1.1.2 HLA-Funktion im Immunsystem 2

1.1.3 HLA-Kompatibilität und Transplantation 2

1.2 HLA-E 3

1.2.1 Polymorphismus und Expression 3

1.2.2 Funktion im Überblick 4

1.2.3 HLA-E und das angeborene Immunsystem 5

1.2.3.1 NK-Zellen: Effektorzellen der angeborenen Immunität 5

1.2.3.2 HLA-E und NK-Zellen Interaktion 5

1.2.3.3 CTLD-Rezeptorfamilie: Struktur des CD94/NKG2A–HLA–E Komplexes 7

1.2.3.4 NK-Zellen und deren großes Rezeptorrepertoire 7

1.2.4 HLA-E und das erworbene Immunsystem 8

1.2.5 HLA-E und die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation 9

1.3 Ziele dieser Arbeit 10

2 Material und Methoden 11

2.1. Formelle Daten 11

2.1.1. Studiendesign 11

2.1.2. Charakteristika des Patientenkollektivs 11

2.1.3. Statistische Analyse 14

2.2. Grundlage für Genotypisierungsmethoden: Polymerasekettenreaktion (PCR) 15

2.3. Sequenzierung 15

2.4. PCR-SSP (engl.: polymerase chain reaction-sequence-specific priming) 21

2.5. Validierung der SSP-Methode 27

3 Ergebnisse 28

3.1. HLA-E SSP-Typisierungsergebnisse im untersuchten Studienkollektiv 28

3.2. Die statistische Analyse der Endpunkte OS und DFS mit SPSS 29

3.2.1. Die univariate Analyse der Endpunkte OS und DFS nach Kaplan-Mayer 29

3.2.2. Die multivariate Analyse der Endpunkte OS und DFS nach Cox 32

3.3. Die statistische Analyse der kumulativen Inzidenzen mit R 34

3.3.1. Die statistische Analyse des Endpunktes Rezidiv bzw. Relapse 34

3.3.2. Die statistische Analyse der transplantationsassoziierten Mortalität (TRM) 37

3.3.3. Die statistische Analyse der akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD) 40

3.4. Ergebnisse der Validierung der SSP-Methode 43

4 Diskussion 44

4.1. Methodische Aspekte 44

4.1.1. Wie valide ist die HLA-E Typisierung mit der PCR-SSP Methode? 44

4.2. Statistik 45

4.2.1. Warum Kaplan-Meier bzw. Cox-Regression? 45

4.2.2. Warum Kumulative Inzidenzen und Kompetitives Risiko? 47

4.2.3. Ausblick 48

4.3. Inhaltliche Aspekte 49

4.3.1. Welche Rolle spielt das HLA-E für das Outcome nach PBSZT? 49

4.3.2. Sind HLA-E*01:01 homozygote Spender eine Gefahr für ihren Empfänger? 50

4.3.3. HLA-E*01:03 Homozygotie des Patienten als Schutz vor TRM und aGvHD? 51

4.3.4. HLA-E-Polymorphismus: Doch kein Einfluss auf das Outcome? 53

4.3.5. Limitationen 54

4.3.6. Schlussfolgerung 57

4.3.7. Ausblick 62

5 Zusammenfassung 64

6 Literaturverzeichnis 66

Danksagung 66

Lebenslauf 80

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aGvHD	*Acute graft-versus-host disease*
ALL	Akute lymphatische Leukämische
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	*Antigen-presenting cell*
BMDW	*Bone marrow donors worldwide*
C	Cytosin
CD	*Cluster of differentiation*
cGvHD	*Chronic graft-versus-host disease*
CIF	*Cumulative incidence function*
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CR	*Competitive risk*
CTLD	*C-type lectin-like-domain*
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DAP 12	*DNAX activating protein of 12 kilo Dalton*
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	*Dendritic cell*
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
Df	*degree of freedom*
DFS	*Disease-free survival*
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DRST	Deutsches Register für Stammzelltransplantationen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
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*
PBSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSV	Herpes simplex Virus
HvG	*Host versus graft*
HWE	Hardy-Weinberg-Equlilibrium

IFN	Interferon
IHWG	*International Histocompatibility Working Group*
IL	Interleukin
IPSS	*International Prognostic Scoring System*
ITIM	*Immunoreceptor tyrosinbased inhibitory motif*
KIR	*Killer cell immunglobulin-like receptor*
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
Mb	Megabasen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	*Major histocompatibility complex*
MICA	*MHC class I polypeptide-related sequence A*
MMF	Mykophenolat-Mofetil
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
NCR	*Natural cytotoxic receptor*
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PASW	*Predictive Analytics Software*
PBSZT	*Periphere Blutstammzelltransplantation*
PCR	*Polymerase chain reaction*
RR	*Relatives Risiko*
SBT	*Sequence-based typing*
SNP	*Single nucleotide polymorphism*
SPSS	*Statistical Package for the Social Sciences*
SSO	*Sequence-specific oligonucleotide*
SSOP	*Sequence-specific oligonucleotide probe*
SSP	*Sequence specific priming*
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBI	*Total body irradiation*
TCR	*T-cell receptor*
TH1 Zellen	T-Helfer 1 Zelle
TH2 Zellen	T-Helfer 2 Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRM	*Transplantat-related mortality*
TX	Transplantation

1 EINLEITUNG

Die allogene Stammzelltransplantation stellt für viele Patienten mit einer bösartigen hämatologischen Erkrankung die einzig kurative Therapiemaßnahme dar[175,202]. Neben den malignen Bluterkrankungen sind nichtmaligne hämatopoetische Erkrankungen, Immundefektsyndrome oder angeborene Stoffwechselerkrankungen seltenere Indikationen[9,37,171]. Dass die Stammzelltransplantation allerdings nach wie vor lebensbedrohliche Risiken in sich birgt und das Ziel als kurative Therapiemaßnahme zu wirken nicht immer erreicht, lässt sich an einer Langzeitüberlebensrate zwischen 40-60% unschwer erkennen[49,66,124,160]. Besonders die fehlende Übereinstimmung der klassischen transplantationsrelevanten HLA-Allele zwischen Spender und Empfänger ist mit erhöhtem Risiko für Transplantatabstoßung, Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl.: *Graft-versus-Host Disease, GvHD*) und Mortalität assoziiert[11,44,60,197]. Seit der Einführung von Stammzellspenderregistern stehen nach Angaben des BMDWs (engl.: *bone marrow donors worldwide*) mittlerweile weltweit über 23,0 Millionen (Stand: Januar 2014) nichtverwandte freiwillige Knochenmark-/Stammzellspender zur Auswahl, so dass bei unverwandten Transplantationen oft mehr als nur ein HLA-kompatibler Spender zur Verfügung steht[208]. Trotz der großen Spenderauswahl und moderner Typisierungsmethoden wie z.B. der hochauflösenden HLA-Typisierung gibt es immer noch viele Komplikationen[60], so dass die Erforschung zusätzlicher prädiktiver Faktoren notwendig ist um den optimalen Spender in Zukunft bestimmen zu können[48,205]. Möglicherweise stellt das HLA-E solch einen Faktor dar.

1.1 Bedeutung des humanen Leukozytenantigensystem (HLA-System)

1.1.1Polygenie und Polymorphismus des HLA-Komplexes

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex, MHC) wird beim Menschen speziesspezifisch als HLA-Komplex (engl.: *Human Leukocyte Antigen)* bezeichnet[83,167]. Er ist 3,6Mb groß, befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.1-6p21.3) und umfasst mehr als 220 Genorte[83,100].Dieser Komplex weist die höchste Gendichte und den am stärksten ausgeprägten Polymorphismus im menschlichen Genom auf, weshalb eine eigenständige Nomenklatur für die wichtigsten Genloci etabliert wurde[83,167,200]. Es werden die Klassen I-III unterschieden[83]. Dabei gehören die exprimierten Gene A, B und C einschließlich weiterer 9 nicht exprimierter Pseudogene der Klasse Ia an, die derzeit ca. 3300 bekannte Allele umfasst[165,166]. Die nichtklassischen Gene der Klasse Ib setzen sich aus den exprimierten Genorten E, F, G und

dem Pseudogen H zusammen und definieren sich mit weniger als 100 Allelen durch einen geringen Polymorphismus und geringerer Expression[141]. Desweiteren kodieren diese Genorte der Klasse Ib auch für das MIC-Antigensystem (engl.: *MHC Class I chain-related genes*)[8,64], welches ebenfalls eine Rolle im Rahmen der PBSZT spielen soll[99]. Die Klasse-II-Region weist wiederrum eine hohe Polygenie auf und wird in mehrere Subregionen (HLA-DR, HLA-DQ HLA-DP; DMA, DMB, DOB, DOA) unterteilt[123,168]. Diese Polygenie gewährleistet die Diversität der HLA-Moleküle der Klasse I und II in der Antigenpräsentation[83].
Die MHC-Klasse-III Genorte kodieren unter anderem für die Komplementproteine und nehmen eine Sonderstellung im MHC-Komplex ein, die nicht direkt mit dem HLA-System in Verbindung steht[83].

1.1.2HLA-Funktion im Immunsystem

Die physiologische HLA-Funktion liegt in der Vermittlung von Selbst- und Nicht-Selbst, sowohl bei der Prägung des Immunsystems, als auch in der Auseinandersetzung mit Proteinantigenen, die fremder Herkunft (allogen) oder körpereigen (autolog) sein können[100]. Diese Funktionen sind Bestandteil des erworbenen (adaptiven) Immunsystems, das sich durch Antigenspezifität der Immunantwort und durch die immunologische Gedächtnisfunktion auszeichnet[83]. Für die antigenspezifische zelluläre Immunantwort sind die Prozessierung und Präsentation des Antigens notwendig, letzeres wird von den Haupthistokompatibilitätsantigenen als antigenpräsentierende Moleküle übernommen[100]. Sowohl die Antigenerkennung als auch die Prüfung der HLA-Moleküle auf Selbst oder Nicht-Selbst erfolgt durch die Bildung eines ternären Komplexes bestehend aus einem HLA-Molekül, einem daran gebundenen prozessierten Antigen und einem T-Lymphozytenrezeptor, wobei eine Interaktionsspezifität von HLA-Klasse-I- mit CD8-positiven (cytotoxischen) T-Lymphozyten und von HLA-Klasse-II-Molekülen mit CD4-positiven T-Lymphozyten (Helferzellen) besteht[83,100].

1.1.3HLA-Kompatibilität und Transplantation

Die HLA-Gene werden auch als starke (engl.: *major*) Transplantationantigene bezeichnet, da sie für die Transplantationsabstoßung bei der Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen hauptverantwortlich sind[21,101]. Die Gegenwart fremder HLA-Moleküle, sowohl als präsentierende Moleküle, als auch als präsentierte Peptidfragmente führt im Rahmen allogener Transplantationen zur T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion[69]. Die immungenetische Spenderauswahl basiert auf der Zielsetzung einer möglichst

vollständigen Identität für alle transplantationsrelevanten HLA-Genorte [185] d.h. 10/10 zwischen Spender und Empfänger[151,181,200]. Kann dies nicht erzielt werden, so ist für die Spenderauswahl eine Abwägung der Akzeptabilität der vorliegenden HLA-Disparitäten (engl.: *acceptable mismatches)* zu treffen, da der Transplantationserfolg vornehmlich von der Quantität aber auch der Qualität der HLA-Mismatches abhängt. Ein Individuum ist für einen HLA-Genort homozygot, wenn beide Allele identisch sind, und heterozygot, wenn die Allele differieren. Da die Expression in kodominanter Weise erfolgt, sind beim Heterozygoten beide Allele im Phänotyp vertreten. Die Gesamtheit der Allelausstattung mehrerer HLA-Genorte auf einem Chromosom wird als Haplotyp bezeichnet und normalerweise als Einheit vererbt, da Rekombinationen im Bereich des HLA-Komplexes weniger als 3% ausmachen. Daraus folgt, dass Eltern und ihre Kinder jeweils haploident, Geschwisterpaare dabei mit einer stochastischen Wahrscheinlichkeit von je 25% vollident oder nichtident bzw. in 50% der Fälle haploident sind[197]. Die tatsächliche Erfolgsquote bei der Suche nach vollidenten Geschwistern liegt mit 30-35% jedoch höher, denn gemäß der Häufigkeit einzelner HLA-Merkmale kommt es zu rein phänotypischen, also zufälligen Übereinstimmungen. Daher können auch im erweiterten Familienkreis bis zu 5% partiell HLA-kompatible Spender gefunden werden. Diese sind oftmals haploident, weisen aber zusätzlich phänotypische Übereinstimmungen mit dem Patienten auf. Da erst durch die Option der unverwandten Fremdspender- und Plazentarestblut-Transplantate die Wahrscheinlichkeit einen passenden Spender zu finden auf über 80% erhöht wird, ist es notwendig geeigneten Strategien zur Optimierung der immungenetischen Spender- und Empfängerauswahl (engl.: *HLA-Matching*) zu entwickeln.

Über die Bedeutung des HLA-Systems für alloreaktive T- und B-Lymphozyten-abhängige Reaktionen hinaus, können auch alloreaktive NK-Zellen Transplantationen beeinflussen. Gemäß der *„Missing-Self"*-Hypothese kommt es zur Lyse von Zellen, wenn diese keine HLA-Moleküle aufweisen die ein inhibitorisches Signal vermitteln können. Hauptligand eines inhibitorischen NK-Rezeptors stellt dabei das HLA-E dar. Hierauf soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.2 HLA-E

1.2.1Polymorphismus und Expression

HLA-E ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 zwischen HLA-A und HLA-C lokalisiert. Es ist wenig polymorph und gehört zur Familie der nichtklassischen HLA-Klasse-Ib-Moleküle, die lediglich aus 4 Loci besteht[141]. Bis jetzt sind insgesamt elf

Allele beschrieben[166]. HLA-E*01:02 wurde aus der IMGT/HLA Datenbank wieder rausgenommen, da gezeigt werden konnte, dass dessen Sequenz identisch mit der von HLA-E*01:01:01:01 zu sein scheint[166].

Tabelle 1 Nomenklatur der HLA-E Allele

HLA-E Nomenklatur			
E*01:01:01:01	E*01:03:01:01	E*01:03:02:02	E*01:03:05
E*01:01:01:02	E*01:03:01:02	E*01:03:03	E*01:04
E*01:01:01:03	E*01:03:02:01	E*01:03:04	

Die 11 Allele unterscheiden sich in Nukleotiden, die entweder in nicht codierenden Bereichen liegen oder synonym für die gleichen Aminosäuren codieren, so dass nur 3 Proteine entstehen:

- HLA-E*01:04, welches vernachlässigbar selten vorkommt bzw. wahrscheinlich ein Sequenzierungsartefakt darstellt,
- HLA-E*01:01 (E*01:01:01:01/02/03) und
- HLA-E*01:03 (E*01:03:01:01/02, E*01:03:02:01/02, E*01:03:03/04/05)[43].

Die letzten beiden Moleküle kommen in der Population etwa gleichhäufig vor und unterscheiden sich in Exon 3 an der Nukleotidposition 48, so dass die Aminosäure Glyzin statt Arginin an Position 107 der α2 Domäne der schweren Kette zu finden ist[90,167]. Dies führt zu Unterschieden in der Expressionsdichte der beiden Allele an der Zelloberfläche. Zwar kommt HLA-E fast ubiquitär auf Zellen vor[195], jedoch wird das HLA-E*01:03 im Gegensatz zu HLA-E*01:01 signifikant stärker exprimiert[194,195,206]. Dieser Unterschied in der Expressionsdichte der beiden HLA-E Allele soll mit dem Überleben und dem Auftreten von Komplikationen nach PBSZT korrelieren.

1.2.2Funktion im Überblick

HLA-E weist eine duale Funktion auf und schlägt somit eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem[56,195,199], indem es entweder einen Komplex mit Peptiden bildet, die aus den Leitsequenzen der körpereigenen MHC-I Moleküle stammen und so durch Bindung an die CD94-NKG2A/C Rezeptoren die Immunantwort der NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) reguliert[25,27,189] oder indem es Peptide bindet, die aus der Antigenprozessierung stammen und dann eine T-Zell-vermittelte Immunantwort induzieren kann[75,118,202]. Da HLA-E solch breitgefächerte Funktionen im Immunsystem übernimmt, ist es möglich, dass es auch klinisch signifikante

Auswirkungen auf den Erfolg einer PBSZT (engl.: *hematopoietic stem cell transplantation*) haben könnte[44,195].

1.2.3HLA-E und das angeborene Immunsystem

1.2.3.1NK-Zellen: Effektorzellen der angeborenen Immunität

Entwicklungsgeschichtlich zählen die NK-Zellen, die sich mit den T-Lymphozyten eine gemeinsame Progenitorzelle teilen, zum erworbenen Immunsystem und stellen 10% der zirkulierenden Lymphozyten dar[17]. Sie zeichnen sich durch CD56 Positivität bei gleichzeitigem Fehlen von CD3 an ihrer Oberfläche aus. Die Subpopulation mit einer geringen Dichte an CD56 (dim) bei gleichzeitig starker CD16 (bright) Expression überwiegt mit 90% und ist stark zytotoxisch, während die kleinere $CD3^-$ CD56 (bright) Subpopulation vor allem Zytokine produziert und geringe Toxizität aufweist[36]. Diese Heterogenität der NK-Zellen scheint den Verlauf der Immunantwort nach einer PBSZT wesentlich zu bestimmen [139]. Da NK-Zellen schon sehr früh nach unspezifischer Aktivierung durch IL-2, IFN oder TNF während einer Immunreaktion Zytokine und Chemokine bilden und Zielzellen auch direkt ohne vorherige Antigenpräsentation, allein durch das Fehlen von körpereigenen MHC-Klasse-I-Molekülen lysieren können (engl.: *missing-self hypothesis*)[116], gehören sie funktionell zur angeborenen Immunität[17]. Sie erhalten dabei ihre immunologische Kompetenz zur Erkennung von körpereigenem MHC durch einen Reifungsprozess (engl.: *licensing*)[97,216]. Nicht nur eine veränderte Expressionsdichte, wie sie im Rahmen von viralen [202] bzw. bakteriellen Infektionen[75] oder malignen Tumorerkrankungen[90] vorkommt, führt zur Aktivierung der NK-Zellen, sondern auch die veränderte Prozessierung der MHC-Klasse-I-Moleküle und deren Präsentation via HLA-E[131]. Somit beeinflusst HLA-E nicht nur die Regulation des angeborenen Immunsystems, sondern stellt zusammen mit den NK-Zellen einen Sensor für die MHC-Klasse Ia Expression dar[44].

1.2.3.2HLA-E und NK-Zellen Interaktion

Als Ligand der CD94/NKG2A/C Rezeptoren aktiviert bzw. inhibiert HLA-E die Zytotoxizität und Zytokinproduktion der NK-Zellen[25,27]. Diese Aktivierung oder Hemmung wird dabei von multiplen Faktoren beeinflusst[182,203]. Einen dieser Faktoren stellt der Typ des CD94/NKG2x Rezeptors (x = A/B, C, E/H, wobei A/B und E/H Splicevarianten entsprechen) dar. Diese Rezeptorfamilie enthält eine C-Typ lektinähnliche (engl.: *c-type lectin-like domain, CTLD*) Ektodomäne und interagiert mit HLA-E und dem gebundenen hydrophoben Nonamerpeptid aus den konservierten Leitsequenzen klassischer

MHC-Klasse I-Moleküle und HLA-G[27,152,194]. Über ihre intrazelluläre Domäne können unterschiedliche Varianten dieser Rezeptorfamilie gegensätzliche Signale an die NK-Zellen weiterleiten. Dabei entstehen hemmende Signale über die zwei ITIM (engl.: *immunoreceptor tyrosinbased inhibitory motif, ITIM*) Motive des CD94/NKG 2A Rezeptors und aktivierende über den DAP 12 Adapter Signalweg des CD94/NKG 2C Rezeptors[62,90]. Dabei überwiegen die hemmenden Signale und dies ist auf eine sechsfach höhere Affinität von HLA-E zum CD94/NKG2A Rezeptor zurückzuführen[91]. Desweiteren kann HLA-E über seine Expressionsdichte die Vulnerabilität der Zielzelle beeinflussen und somit indirekt die NK-Zellen regulieren[131]. Die Interaktion zwischen NK-Zellen und HLA-E wird auch durch die Stabilität ihrer Bindung beeinflusst, die von dem präsentierten Nonamer abhängig ist[91,194,196]. Das Signalpeptid des HLA-G weist dabei die stärkste Bindungsstabilität auf[91]. Auch wenn die Leitsequenzen stark konserviert sind, unterscheiden sie sich in ihrer Fähigkeit im Komplex mit HLA-E an der Oberfläche der Zelle exprimiert zu werden und tragen somit entscheidend dazu bei, ob die Zielzelle von der NK-Zelle lysiert oder toleriert wird[30].Wie die Zelle die gegensätzlich auf sie einwirkenden Signale zu einer einzigen Endinformation verarbeitet, wird in Abbildung 1 veranschaulicht[182].

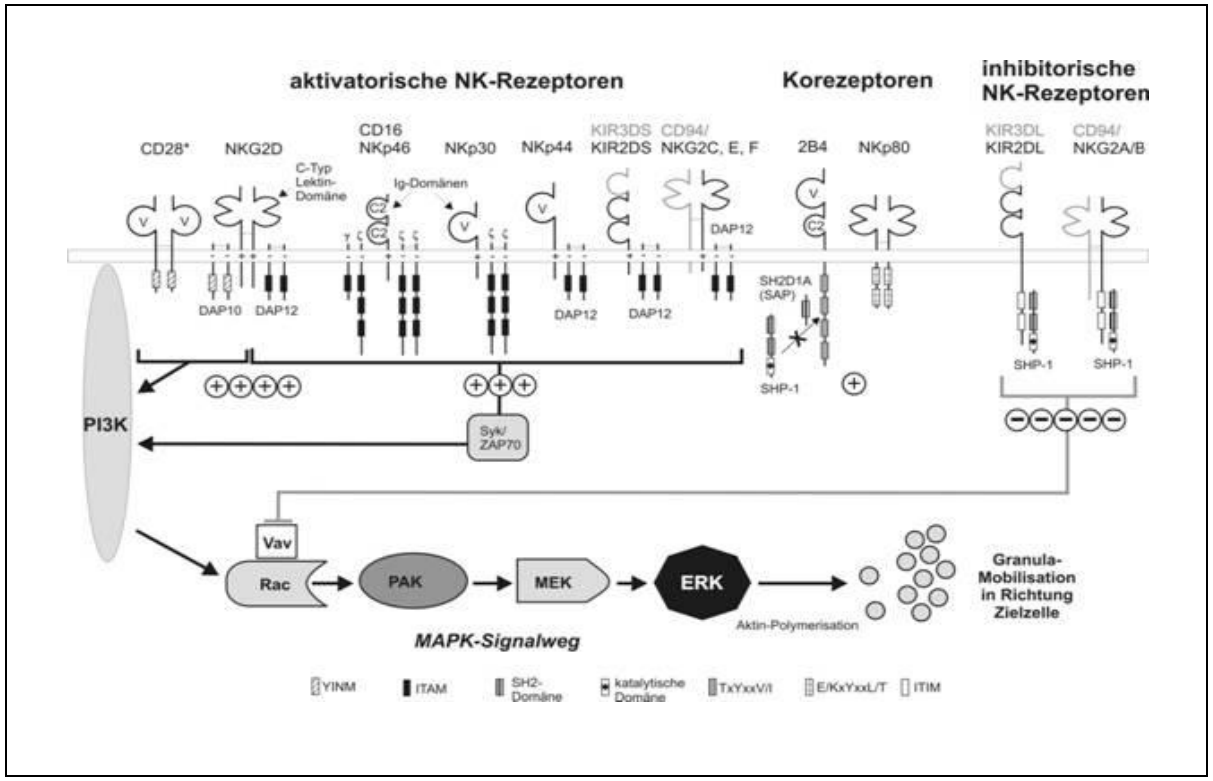

Abbildung 1 Signaltransduktion in NK-Zellen *(Abbildung stammt aus dem Abschnitt 1.5.5 der Einleitung der Dissertation von Thomas Schirrmann Tumorspezifisches Targeting der humanen Natürlichen Killerzellinie YT durch Gentransfer chimärer Immunglobulin-T-Zellrezeptoren, Rer. nat. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (2005). Die aktivatorischen NK-Rezeptoren lösen über die PI3K und den MAPK-Signalweg die Aktivierung der ERK2-Kinase aus, die die Mobilisierung der zytotoxischen Granula bewirkt. Korezeptoren unterstützen diesen Signalweg. Inhibitorische NK-Rezeptoren inaktivieren über die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 den Rac-1-Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav-1 und hemmen den MAPK-Signalweg.*

1.2.3.3CTLD-Rezeptorfamilie: Struktur des CD94/NKG2A–HLA–E Komplexes

Die CD94/NKG2x Rezeptoren sind über Disulfidbrücken verbundene Heterodimere, denen allen die invariante Komponente CD94 gemeinsam ist[34]. CD94 nimmt zwar nicht an der Signaltransduktion teil und weist daher auch im Gegensatz zu NKG2x keine intrazelluläre Domäne auf, ist aber für die Expression von NKG2x an der Zelloberfläche essentiell. Während CD94 von einem konservierten Gen codiert wird, codieren fünf Gene für NKG2x (x = A/B, C, E/H, A/B und E/H stellen Splicevarianten dar), die sich jedoch ebenfalls nur wenig in ihren Introns unterscheiden[131]. Die C-terminale Region, der aus den Leitsequenzen der klassischen MHC-Klasse I stammenden Peptide, die gleichzeitig die stärkste Variabilität innerhalb der Leitsequenz der MHC-Klasse I Moleküle darstellt, interagiert vollständig mit CD94, der invarianten Komponente des Heterodimers CD94/NKG2A. Erkannt und gebunden werden die unterschiedlichen Peptide dabei über Arginin an Position 5 und einen variablen hydrophoben Rest an Position 8. Die sechsfach höhere Affinität jeder möglichen HLA-E/Peptid–Komplexkombination zum hemmenden CD94/NKG2A Rezeptor im Vergleich zum aktivierenden Rezeptor CD94/NKG2C lässt sich auf die Kettenreste 167-170 in einer Schleife der Rezeptoren, die einen signifikanten Anteil der Anlagerungsregion mit CD94 ausmacht, zurückführen[90].

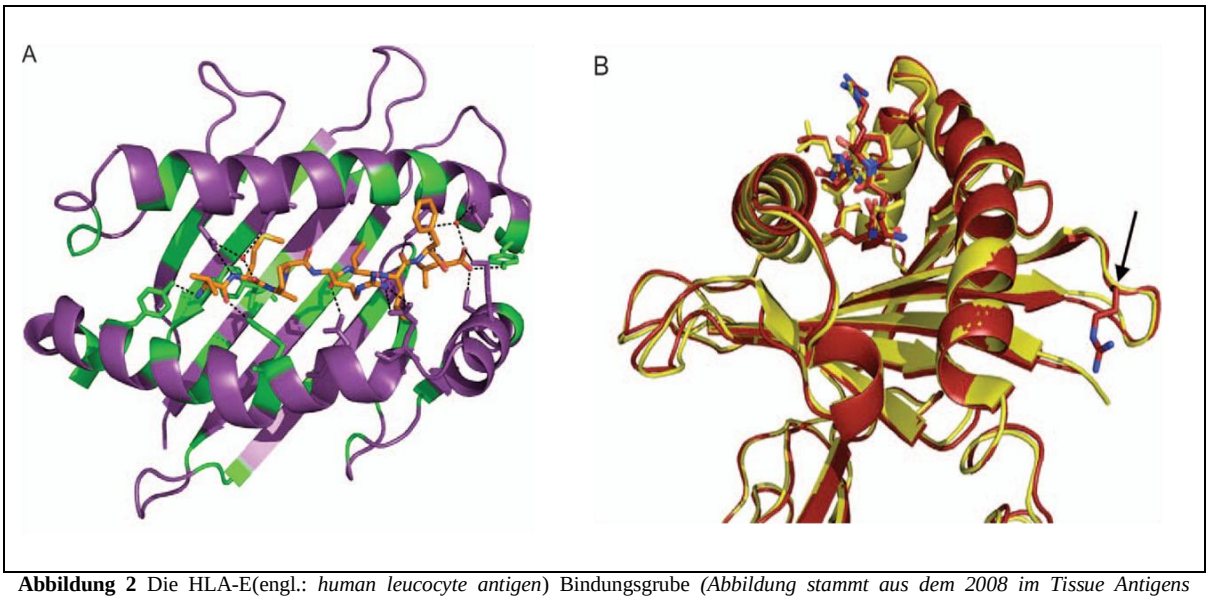

Abbildung 2 Die HLA-E(engl.: *human leucocyte antigen*) Bindungsgrube *(Abbildung stammt aus dem 2008 im Tissue Antigens erschienenen Reviewartikel von L. C. Sullivan, C. S. Clements, J. Rossjohn2 & A. G. Brooks „The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity“, aus dem Abschnitt „HLA-E in innate immunity“). (A) HLA-E schwere Kette (lila) mit hydrophobem Rest (grün), Peptid (orange) aus der HLA-G Leitsequenz (VMAPRTLFL) gebunden an HLA-E, und Bindungen der HLA-E schweren Kette an die Peptidenden (gestrichelte Linien). (B) HLA-E*01 01 (rot) und HLA-E*01 03 (gelb) Darstellung in Überlagerung. Der Pfeil zeigt auf die unterschiedlichen Kettenreste der Allele an Position 107 der jeweiligen HLA-E schweren Kette.*

1.2.3.4NK-Zellen und deren großes Rezeptorrepertoire

Neben den C-Type Lectin Rezeptoren weisen NK-Zellen auf ihrer Oberfläche KIRs (engl.: *killer cell immunglobulin-like receptors*)[146] und NCRs (engl.: *natural cytotoxic*

receptors) auf, die zur Immunglobulin Superfamilie gehören[131]. Während die aktivierenden NCRs Liganden binden die nicht zum HLA-System gehören[133], werden die NK-Zellen über die KIRs zusätzlich für das HLA-System negativ reguliert, indem sie klassische MHC-Klasse I-Moleküle erkennen und binden[139]; fehlen diese und erreichen die Zelle zusätzlich aktivierende Signale über andere Rezeptoren (KIRs[16], NCRs[133], NKG2D[67]), wird die Zielzelle lysiert[33]. Auch wenn die Rezeptoren als Haplotypen vererbt werden, unterscheidet sich das Rezeptorrepertoire einzelner NK-Zellen eines Individuums[134,215]. Dabei hat jede NK-Zelle mindestens einen KIR oder CD94/NKG2A als hemmenden Rezeptor für die Erkennung von körpereigenen HLA-Molekülen[131]. Zur endgültigen Lyse oder Toleranz der Zielzelle kann es erst nach der Verarbeitung aller einzelnen Signale kommen, die die NK-Zelle über die verschiedenen Rezeptoren erreichen[32]. Die verschiedenen Rezeptoren scheinen sich komplementär zueinander zu verhalten und stellen somit ein Sicherheitssystem für den Organismus vor Autoreaktivität durch die NK-Zellen dar. HLA-Liganden die von einem System nicht erkannt werden, können noch immer durch das Andere detektiert werden[131].

1.2.4HLA-E und das erworbene Immunsystem

HLA-E präsentiert während Entzündungs-/Infektionsreaktionen stressinduzierte Proteine oder virale bzw. bakterielle Peptide und triggert dadurch nach Bindung an TCR die zytotoxische Immunantwort[75,130]. Neben den NK-Zellen exprimieren teilweise CD8+ T-Zellen, γδT-Zellen (1-5% der Lymphozyten)[55] und CD4+ TH2 Zellen den CD94/NKG2A Rezeptor[24,61,90]. Bindet HLA-E über diesen Rezeptor an CD8+ T-Zellen oder an γδT-Zellen kommt es zur Hemmung der TCR-vermittelten zytolytischen Aktivität und Zytokinproduktion[23,45]. Dies ist relevant für die Modulation der Immunantwort im Rahmen von Virus-[145] und Krebserkrankungen[210]. Auch aktivierte TH2 Zellen, die B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen umfunktionieren, werden durch Bindung von HLA-E an CD94/NKG2A in ihrer Funktion gehemmt. Bei Erkrankungen, die mit einer verminderten HLA-E Expression einhergehen, wie zum Beispiel die HSV Infektion[127], kommt es so zu einer Verminderung der hemmenden Signale und somit zu einer verstärkten TH2 Antwort. Da aktivierte TH1 Zellen, die die zelluläre Immunantwort verstärken, diesen Rezeptor nicht exprimieren und somit von HLA-E unabhängig sind, kommt es zu einer Modulation des TH1/TH2 Gleichgewichtes und der Entzündungsreaktion. Neben Asthma, Kolitis und Autoimmunerkrankungen bei denen das TH1/TH2 Zytokingleichgewicht eine zentrale Rolle spielt[61], könnte dieser Aspekt der HLA-E Funktion auch im Rahmen der

Stammzelltransplantation von Bedeutung sein. So konnte in einem Mausmodel mit aGvHD durch einen agonistischen monoklonalen Antikörper für NKG2A, der die Spender-T-Zell Expansion hemmen sollte diese Reaktion supprimiert werden[95].

1.2.5HLA-E und die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

1.2.5.1.Komplikationen nach allogener PBSZT

Die allogene PBSZT besteht aus einer Vorbereitungsphase, der Konditionierung, der Transplantation selbst (Tag 0), der Zeit des Engraftments (bis Tag 30), einer frühen Post-TX Phase (bis Tag 100), einer späteren Post-TX Phase (bis Tag365) und im optimalsten Fall, wenn man zahlreiche Komplikationen der PBSZT erfolgreich bewältigt hat, der Normalisierung des Immunsystems (nach 1-2 Jahren). Neben Mukositiden, Panzytopenien und Infektionen[54,110] stellt die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion bzw. –Krankheit (engl.: *graft-versus-host reaction/ disease, GvHR/GvHD*), eine der gefürchtetsten Komplikation der allogenen PBSZT dar. Die GvHD ist eine immunvermittelte Erkrankung, die aus einer komplexen Interaktion zwischen der adaptiven Immunität des Spenders und der des Empfängers resultiert[191]. Hierbei richten sich in erster Linie aktivierte T-Zellen und NK-Zellen des Spenders gegen Zellen des Empfängers[9,81,163,217]. Es wird die aGvHD, die typischerweise Haut, Darm und Leber innerhalb der ersten 100 Tage nach PBSZT befällt[9,46], von der cGvHD, die später auftritt und zu diversen auch systemischen (autoimmunähnlichen) Syndromen bis hin zum Transplantatversagen führen kann unterschieden[190]. Inzidenz und Intensität der GvHD und somit die mit ihr einhergehende erhöhte Morbidität und Mortalität (engl.: TRM *transplantat-related mortality*)[10,40,79,204], korrelieren stark mit der HLA-Disparität von Spender und Empfänger[3,12]. Selbst wenn Spender und Empfänger für die transplantationsrelevanten klassischen HLA-Moleküle vollständig kompatibel sind, tritt dennoch eine GvHD in 30-70% der Fälle auf[71,80,81,112,113], d.h. weitere Faktoren[22,80,217] z.B. die schwachen (engl.: *minor*) Transplantationsantigene[192,205] oder der HLA-E Allelstatus können möglicherweise die GvHD-Inzidenz beeinflussen. Für den homozygoten HLA-E*01:03 Allelstatus der Empfänger gibt es erste Hinweise dafür, dass er einen genetischen Schutzfaktor vor aGvHD darstellt und zu vermindertem Auftreten von schweren GvHD (Grad III-IV) führen könnte[44,199]. Desweiteren scheint dieser Allelstatus mit signifikanter Reduktion der TRM, höherer Überlebensrate und gesteigerter DFS (engl.: *disease-free survival*) einherzugehen[199]. Neben der TRM und der akuten und chronischen GvHD stellen weitere häufige Komplikationen, die das Überleben nach

PBSZT beeinflussen, Transplantatabstoßung, Relapse und Infektionen dar[59,199]. Auch auf diese Komplikationen könnte HLA-E ebenfalls einen Einfluss haben. So sollen zum Beispiel HLA-E*01:01 homozygote Empfänger nach PBSZT häufiger frühe bakterielle Infektionen und somit eine höhere TRM aufweisen, was auf die quantitativ geringere Expressionsdichte von HLA-E*01:01 zurückgeführt wird[195,198].

1.2.5.2.HLA-E in der Immuntherapie: GvL

Die GvL (engl.: *graft versus leukemia*)[82] stellt einen wesentlichen und gewünschten Effekt dar[94,176], der den Heilungserfolg nach allogener PBSZT erheblich beeinflusst, in dem es restliche Tumorzellen eliminieren kann[177] und so die Rezidivrate bei AML-Patienten (akute myeloische Leukämie) senkt[139,156]. Da die Differenzierung der NK-Zellen aus der CD34 Stammzelle des Spenders schon innerhalb der ersten 2-3 Wochen der Rekonstitutionsphase des Immunsystems erfolgt, die der T-Zellen jedoch einige Wochen länger benötigt[4,92], wird der Effekt der GvL zumindest initial der Alloreaktivität von NK-Zellen zugeschrieben, die sich noch verstärkt wenn eine Inkompatibilität zwischen den KIRs des Spenders und den MHC-I KIR Liganden des Empfängers in GvH Richtung vorliegt [116,139]. Die frühe Reifung der NK-Zellen nach einer PBSZT ist gestört[36] und führt zu einer veränderten Rezeptorzusammensetzung bei der eine CD94/NKG2A Expression überwiegt[139]. Als Hauptligand dieses Rezeptors ist HLA-E in der Lage die Autoreaktivität von NK-Zellen zu hemmen und beeinflusst somit möglicherweise den GvL Effekt[139].

1.3 Ziele dieser Arbeit

Die Fragestellungen dieser Arbeit lauten:

1 Ist die PCR-SSP Methode ein geeignetes bzw. valides Verfahren zur Typisierung der HLA-E Allele?

2 Inwiefern hat die HLA-E Kompatibilität von Spender- und Empfängerpaaren Einfluss auf das Outcome von unverwandten allogenen Stammzelltransplantationen in Hinblick auf Gesamtüberleben (OS), krankheitsfreies Überleben (DFS), transplantatassoziierte Mortalität (TRM), Rezidiv (Relapse) der Grunderkrankung und akute Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (aGvHD)?

3 Inwiefern hat der homozygote HLA-E*01:03 Genotyp einen positiven Einfluss auf das Outcome von unverwandten allogenen Stammzelltransplantationen in Hinblick auf OS, DFS, TRM, Rezidiv bzw. Relaps und aGvHD?

4 Verringert der homozygote HLA-E*01:01 Genotyp die TRM des Empfängers?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1.Formelle Daten

2.1.1.Studiendesign

Bei diesem Forschungsprojekt handelt es sich um eine retrospektive Analyse. Die Genotypisierungsdaten werden in Zusammenhang mit den HLA-Typisierungsergebnissen und den folgenden klinischen Endpunkten in Bezug gesetzt:

- Gesamtüberleben bzw. OS (engl.: *overall survival*), definiert als der Zeitraum bis zum Eintreffen des Todes, unabhängig von dessen Ursache,
- Krankheitsfreies Überleben bzw. DFS (engl.: *disease-free survival*), definiert als der Zeitraum bis zum Eintreffen des ersten Rezidivs bzw. des Todes für die übrigen Patienten, die kein Rezidiv erlitten,
- Rezidiv der Grunderkrankung (Relapse),
- transplantationsassoziierte Mortalität, TRM (engl.: *transplantat-related mortality*), definiert als transplantationsassoziierte Frühmortalität innerhalb der ersten 12 Monate nach Transplantation und
- akute (innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation) GvHD (engl.: *graft-versus-host disease).*

Die klinischen Daten für diese Studie wurden im Deutschen Register für Stammzelltransplantationen (DRST) erhoben. Sowohl eine indirekte Einwilligung der Patienten über das DRST, als auch die Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Universität Ulm liegen vor. DNA Material wurde im Rahmen der Fremdspendersuche gesammelt. Ein Einverständnis für die HLA-Typisierung wurde eingeholt.

2.1.2.Charakteristika des Patientenkollektivs

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde aus der anonymisierten DNA, die bereits für die Durchführung der „Carreras-Studie“ (durch die Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e. V. unterstützte Studie „Immunologische Bedeutung von HLA-Allel-Differenzen für die allogene Blutstammzelltransplantation“; Projektnummer D.1859) gesammelt wurde, ein Kollektiv von Patienten und deren nicht-verwandten freiwilligen Stammzellspendern zusammengestellt. Das analysierte Kollektiv umfasst 116 Patienten, die im Zeitrahmen zwischen 1997 und 2002 durch eine Stammzelltransplantation therapiert wurden. Die Patientendaten stammten dabei aus 9 verschiedenen Zentren (Siehe Abb. 3). Retrospektiv wurden Spender ausgesucht, deren HLA-Merkmale hochaufgelöst 10/10

kompatibel waren. In Abhängigkeit von der jeweiligen Krankheit bzw. dem jeweiligen Krankheitsstadium (Stadium 1-3) wurden die Patienten von den verschiedenen Transplantationszentren in 3 Risikogruppen eingeteilt. Für ALL und AML galten die folgenden 3 Stadien: Erste komplette Remission, zweite komplette Remission und fortgeschrittene Erkrankung. Gesondert davon wurde die CML mit einer ersten chronischen Phase, der zweiten chronischen Phase und einer Blastenphase betrachtet. Das MDS bzw. MPS wurde nach dem IPSS (engl.:*Internatinal Prognostic Scoring System*) als Erkrankung mit niedrigem, intermediärem und hohem Risiko klassifiziert. Siehe hierzu Tabelle 1. Die Konditionierung der Patienten erfolgte entweder als myeloablative Konditionierung (77,6%) bestehend aus einer Ganzkörperbestrahlung, die meist mit einer Cyclophosphamid-Hochdosischemotherapie kombiniert wurde oder als dosisreduzierte Konditionierung (22,4%), welche überwiegend eine auf Fludarabin basierende Chemotherapie mit oder ohne Melphalan darstellte. Die Prophylaxe der GvHD erfolgte in den meisten Fällen durch eine Kombinationstherapie aus Cyclosporin A und Methotrexat (81,6% der Patienten), während Mykophenolat-Mofetil (MMF) nur bei 7,0% und eine Cyclosporin A Monotherapie nur bei 7.9% der Patienten zum Einsatz kamen. Andere Substanzen zur Prophylaxe waren selten und machten zusammen 3,5% aus. Weitere Charakteristika des Patientenkollektivs im Überblick sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

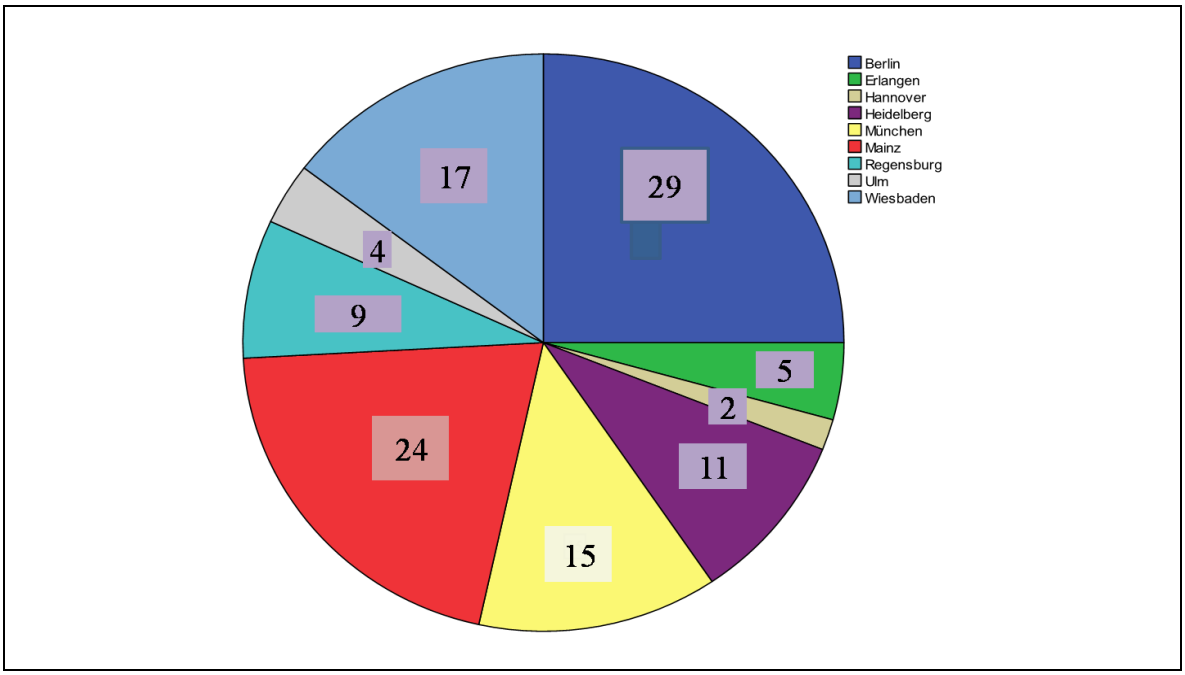

Abbildung 3 Kreisdiagramm zur Veranschaulichung der Zusammensetzung der Multizenteranalyse mit Angabe des Anteils der Patienten aus dem jeweiligen Zentrum in absoluten Zahlen

Tabelle 2 Das International Prognostic Scoring System (IPSS) zur Prognosebeurteilung von MDS/MPS. *KM Knochenmark, MDS Myelodysplastisches Syndrom, MPS Myeloproliferatives Syndrom.*

International Prognostic Scoring System (IPSS)					
Wert in Punkten:	0	0,5	1	1,5	2
Blasten im KM	<5%	5-10%	-	11-20%	21-30%
Karyotyp*	Günstig	Intermediär	Schlecht		
Wert in Punkten	0	0,5-1	1,5-2	2,5-3,5	>2,5
Risiko	Niedrig	intermediär I	intermediär II	Hoch	Hoch
*günstig: normal, -Y, Deletion (5q), Deletion (20q). schlecht: komplex (= oder >3 Anomalien) oder Aberrationen auf Chromosom 7. Intermediär: andere.					

Tabelle 3 Eigenschaften des Patientenkollektivs. *m männlich, w weiblich;ALL Akut lymphatische Leukämie, AML Akut myeloische Leukämie, CML chronisch lymphatische Leukämie, MDS Myelodysplastisches Syndrom, MPS Myeloproliferatives Syndrom, * siehe Tabelle 4*

Eigenschaften des Patientenkollektivs	**Daten absolut (relativ in %)**
Anzahl der Empfänger/Spenderpaar 116 (100%)	
männliche Empfänger	73 (62,9%)
weibliche Empfänger	43 (37,1%)
Geschlechterkombination	
Empfänger/Spenderpaar: m/m	49 (42.2%)
Empfänger/Spenderpaar: m/w	24 (20,7%)
Empfänger/Spenderpaar: w/m	25 (21,6%)
Empfänger/Spenderpaar: w/w	18 (15,5%)
Alter (Median)	
Alter der Empfänger bei Transplantation	42 (18-67)
Alter der Spender	36 (19-58)
Diagnosen der Empfänger	
ALL	23 (19,8%)
AML	37 (31,9%)
CML	32 (27,6%)
MDS/MPS	8 (6,9%)
Sonstige*	16 (13,8%)
Stadien der Erkrankungen	
Früh	49 (42,2%)
Intermediär	38 (32,8%)
Fortgeschritten	14 (12,1%)
Unbekannt	15 (12,9%)
Transplantationszeitraum von 1997 bis 2002	
Art der Transplantation	
PBSC	71 (61,2%)
Knochenmark	45 (38,8%)
T-Zell Depletion	
mit T-Zell Depletion	1 (0.9%)
ohne T-Zell Depletion	115 (99,1%)
Konditionierung	
myeloablativ/hochdosiert	90 (77,6%)
Dosisreduziert	26 (22,4%)
Follow-Up in Tagen 377 (4-3685)	
Todesursache	
Rezidiv/Progression	27 (37,5%)
Sekundärmalignom	1 (1,4%)
Transplantationsassoziiert	35 (48,6%)
sonstige/unbekannt	2 (2,8%)/7 (9,7%)

Tabelle 4 Hauptdiagnosen und Einteilung in die einzelnen Stadien. *ALL akute lymphatische Leukämie, AML akute myeloische Leukämie, CLL chronisch lymphatische Leukämie, CML chronisch myeloische Leukämie, NHL Non-Hodgkin Lymphome, MDS myeloisch-dysplatisches Syndrom, MPS myeloproliferatives Syndrom. Für ALL und AML galten die folgenden 3 Stadien Erste komplette Remission, zweite komplette Remission und fortgeschrittene Erkrankung. Gesondert davon wurde die CML mit einer ersten chronischen Phase, der zweiten chronischen Phase und einer Blastenphase betrachtet. Das MDS bzw. MPS wurde nach dem IPSS (engl. Internatinal Prognostic Scoring System) als Erkrankung mit niedrigem, intermediärem und hohem Risiko klassifiziert.*

Hauptdiagnose	**Stadium der Erkrankung**			**Gesamt**
	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	
ALL	12	9	2	23
AML	13	17	5	35
CLL	0	0	1	1
CML	18	6	5	29
Lymphome	0	2	0	2
NHL	0	2	0	2
MDS/MPS	6	0	1	7
Multiples Myelom	0	2	0	2
Gesamt	49	38	14	101

2.1.3.Statistische Analyse

Für die statistische Analyse der Referenzdaten vom August 2008 wurde das SPSS Programm PASW® Statistics 18 verwendet[52]. Die Beurteilung des OS und des DFS zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung im August 2008 erfolgte dabei mit Hilfe der (univariaten) Kaplan-Meier Methode[218] und (multivariaten) Cox-Regressionsmodellen [96,219]. Für beide Testverfahren galt ein Signifikanzniveau ab einem P-Wert < 0,05. Bekannte Todesursachen wurden entsprechend den Kaplan-Meier-Kriterien als unzensiertes Ereignis definiert, zensiert definiert solche, die nicht gestorben sind, aber nicht bis Ende des Follow-Ups beobachtet werden konnten. In der gängigen Statistiksoftware (SPSS, SAS, Stata) gibt es (bisher) wenige kompakte Tools, mit denen sich Multistate-Modelle bequem anpassen lassen. Im Statistikprogramm R sind hingegen die meisten Multistate-Modelle und insbesondere die Modelle für konkurrierende Ereignisse implementiert, daher wurden mit Hilfe von R sowohl die Berechnungen der kumulativen Inzidenzen als auch die kompetitive Risikoanalyse mit Hilfe des cmprsk Package[70] nach der Methode von Jason P. Fine[58] und Robert J. Gray[70] vorgenommen[57]. In der statistischen Analyse des Relapse wurde der Tod durch jede andere Ursache (ausgenommen Tod durch wiederkehrende Erkrankung) als kompetitives Risiko (CR) definiert. In der statistischen Analyse der TRM wurde der Relapse bzw. Tod durch jede andere Ursache (ausgenommen TRM) als CR definiert. In der statistischen Analyse der aGVHD galten die Parameter Relapse und Tod durch jede andere Ursache (ausgenommen Tod durch aGvHD) als CR.

2.2.Grundlage für Genotypisierungsmethoden: Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen *In-vitro*-Amplifikation eines ausgewählten DNA-Abschnittes (engl.: *templates*) zwischen zwei flankierenden Oligonukleotiden (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden[136]. Zyklisch durchgeführte DNA-Strangseparation (Denaturierung) durch Temperaturerhöhung (94-96°C) und anschließende Primeranlagerung (engl.: *annealing*) bei Abkühlung (50-60°C) mit nachfolgender Neusynthese (engl.: *extension*) des jeweils komplementären Stranges erzielen eine Vervielfältigung der DNA. Der Teilschritt der Neusynthese wird bei 72°C von einer thermostabilen DNA-Polymerase durchgeführt.

2.3.Sequenzierung

2.3.1.Testprinzip

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchsynthese nach Sanger et al 1975[179]. Diese Methode ermöglicht das Ablesen der Nukleotidfolge eines untersuchten DNA-Abschnittes, auch als DNA-Sequenz bezeichnet, durch die kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Replikation. Diese früher mit radioaktiven Isotopen durchgeführte Methode wird heutzutage durch die computergestützte DNA-Sequenzierung unter dem Einsatz von fluoreszenzmarkierten Terminatoren, den Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTPs) ersetzt[158]. Grundlage für die Sequenzierung stellt die im oberen Abschnitt beschriebene Methode: die PCR dar. Um nun die Produkte zu erhalten, aus denen sich die Sequenz der untersuchten DNA ablesen lässt, kommt die Methode der Kettenabbruchsynthese zum tragen:

- unter die nativen dNTPs werden die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs gegeben, wobei jede Base durch einen sie derfinierenden Farbstoff gekennzeichnet ist.
- Wird ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes ddNTP eingebaut, bricht die DNA-Synthese ab, da den ddNTPs die 3’-Hydroxylgruppe für die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung durch die DNA-Polymerase fehlt.
- Wird jeweils ein Didesoxyanalogon einer Base in geringerer Konzentration als die dNTPs zu einem Ansatz gegeben, erhält man durch statistisch verteilte Kettenabbrüche unterschiedlich lange DNA-Fragmente.
- Während die Stränge durch Kapillarelektrophorese auf dünnen denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden, kommt es in den einzelnen Bereich des Gels zur Anregung der Fluoreszenz des jeweils eingebauten Farbstoffes durch einen langwelligen 50 mW Argon-Laserstrahl und die Emission der jeweiligen Bande wird

durch das Detektorsystem registriert. Die vier verschiedenen ddNTPs können differenziert werden, da sie bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren (ddGTP: 540nm, ddATP: 570 nm, ddTTP: 600 nm, ddCTP: 630 nm).

- Die Sequenz wird mit dem Programm Collection (ABI PrismTM 377 Collection Version 2.1) in Chromatogrammform dargestellt.

Abbildung 4 zeigt die schematische Darstellung der Reaktion, die im Prinzip den drei Reaktionsschritten der PCR gleicht.

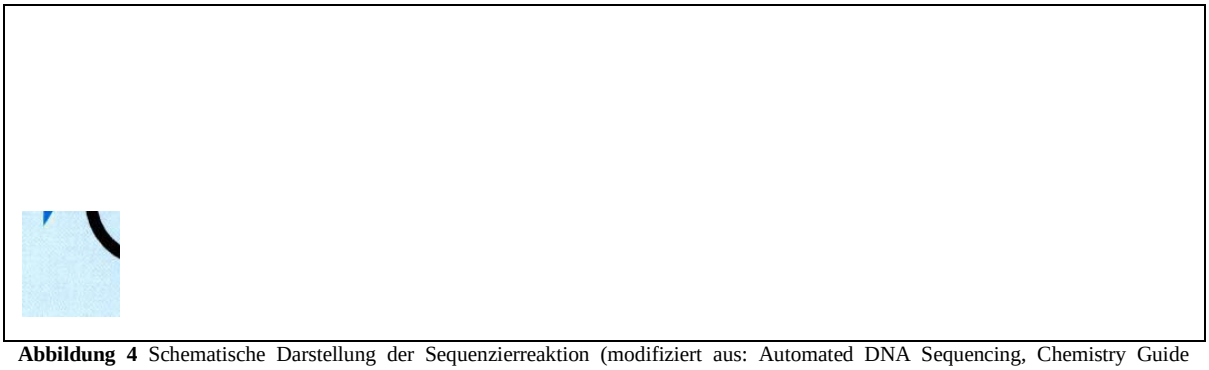

Abbildung 4 Schematische Darstellung der Sequenzierreaktion (modifiziert aus: Automated DNA Sequencing, Chemistry Guide Applied Biosystems). *A Adenin (grün), C Cytosin (blau), G Guanin (orange), T Thymin (rot), dNTP Desoxynukleotid Triphosphat, ddNTP Didesoxynukleotid Triphosphat.*

2.3.2.Durchführung

2.3.2.1.Templateherstellung

Der erste Schritt dient der Vervielfältigung der zu sequenzierenden DNA. Hierzu wurden 15,8µl Mastermix, 2µl Primermix (0,5µM) und 0,2µl (5 U/µl) Taq-Polymerase (Qiagen, Cat no. 201205, Hilden) je Probe in ein Eppendorfgefäß (Eppendorf AG Hamburg, Reaktiongefäße3810x, 1,5µl) gegeben. Der Mastermix setzte sich aus 1,825mM $MgCl_2$, 6% Glycerin, 1mM dNTP (GE Healthcare Life Science UK, Illustra™ Solution dNTPSet 100mM, Produktkode 28-4056-51, 100µmol dATP, 100µmol dCTP, 100µmol dGTP, 100µmol dTTP) in $(NH4)_2SO4$ Puffer zusammen. Der Primermix wurde aus 100µM Vorwärtsprimer SE-In1 bestehend aus der Sequenz 5‘-CGATCTCAGCCCCTCCTC-3‘ und 100µM Rückwärtsprimer RE-In3 mit der Sequenz (Metabion) 5‘-GGCACAGTCCTAGCCCAAG-3‘ (Metabion) auf eine Konzentration von 0,5µM eingestellt. Der Vorwärtsprimer erkennt die Basen der Positionen 169 bis 186 und der Rückwärtsprimer die Basen an den Positionen 1039 bis 1021. Die Produktlänge beträgt somit 871bp. Nun wurden je Probe 18µl aus diesem Eppendorfgefäß in ein Well pipettiert und 2µl der jeweiligen DNA (2-50ng/µl) hinzugegeben. Anschließend konnte die PCR im Thermocycler (GeneAmp®, PCR System 9700, Applied Biosystem) mit dem Thermoprofil aus Tabelle 5 gestartet werden. Zur Kontrolle der erfolgten PCR wird im Anschluss eine Gelelektrophorese (siehe 2.4.2.2) für ca. 10-15 Minuten durchgeführt.

Dabei wurden von jeder Probe 10µl in ein neues Well mit 5µl Ethidiumbromid pipettiert und das Gel für die Elektrophorese beladen. Die Wells mit den übrigen 10µl der Proben wurden solange wieder verschlossen (Flat Cap Strip, Thermoscientific, UK) und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 5 Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die Produktherstellung zur Sequenzierung. *DNA (engl.) DeoxyriboNucleicAcid, dNTPs* Desoxyribonukleosid-Triphosphate, *Taq Taq-Polymerase, Temp. Temperatur.*

Reaktionsansatz		**Temperaturprofil**			
Mastermix ($MgCl_2$:1,825mM, 6% Glycerin, 1mM dNTPs, in $(NH4)_2SO4$ Puffer)	16,5µl	Prozess	Temp.	Zeit	
		Initial-Denaturierung	96°C	2‘00‘‘	
		Denaturierung	94°C	0‘10‘‘	10 Zyklen
Primermix (0,5µM)	2,0µl	**Annealing/ Extension**	65°C	1‘00‘‘	
Taq (5U/µl)	0,2µl	**Denaturierung**	94°C	0‘10‘‘	20 Zyklen
DNA (2-50ng/µl)	2,0µl	**Annealing**	61°C	0‘50‘‘	
Gesamtvolumen	20,0µl	**Extension**	72°C	0‘30‘‘	
			72°C	10‘00‘‘	
		Hold	4°C	∞	

2.3.2.2.Reinigung des Produkts mit ExoSap-It®

Waren Banden in der Gelelektrophorese nachzuweisen, konnte die Reinigung des Produktes erfolgen. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung bei 96°C für 2 Minuten im Thermocycler (GeneAmp®, PCR System 9700, Applied Biosystem). Da unverbrauchte dNTPs und überschüssige Primer den weiteren Prozess stören, mussten diese entfernt werden. Dazu wurden zu jeder Probe 3µl ExoSap-It® (GE Healthcare Life Science UK, Produktcode: US78200) pipettiert und diese mit bis zu 800 Umdrehungen zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus). Die Exonuklease I und Shrimp alkaline Phosphatase aus ExoSap-It® benötigen die Inkubationsschritte aus Tabelle 6.

Tabelle 6 Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die ExoSap-It Reinigung des PCR-Produktes. *ExoSap-It Agens zur Reinigung des PCR-Produkts, DNA (engl.) DeoxyriboNucleicAcid, PCR (engl.) polymerase chain reaction, Temp. Temperatur.*

Reaktionsansatz		**Temperaturprofil**		
		Prozess	Temp.	Zeit
DNA-Amplifikate	10µl	**Inkubation**	37°C	15‘00‘‘
ExoSap-It	3µl	**Inaktivierung**	80°C	15‘00‘‘
Gesamtvolumen	13µl	Hold	4°C	∞

2.3.2.3.BigDyeCycle Sequenzierung

Für die Sequenzierung in Vorwärts/-Rückwärtsrichtung wurde jeweils folgender Mix erstellt:

6µl Vorwärtsprimer 5µM (SE-In1 5‘-CGATCTCAGCCCCTCCTC-3‘) bzw. 6µl Rückwärtsprimer 5µM (RE-In3 5‘-GGCACAGTCCTAGCCCAAG-3‘), 1,5µl

BigDyeSequenzierungsBuffer 5X (AppliedBiosystems) und 0,5µl BigDye®Terminator Enzym (BigDyeTerminator V1.1 Sequencing Standard, AppliedBiosystems). Es werden 8µl Vorwärtsmix in ein Well und 8µl Rückwärtsmix in das nächste Well je Probe pipettiert. Hierzu wurden dann jeweils 2 µl DNA-Amplifikat gegeben. Diese 10µl je Probe wurden nach kurzer Zentrifugation (Multifuge 3 S-R, Heraeus) im Thermocycler (GeneAmp®, PCR System 9700, Applied Biosystems) mit dem aus Tabelle 7 ersichtlichem Programm inkubiert. Um Kontaminationen zu vermeiden werden Prä- und Post PCR-Ansätze räumlich getrennt voneinander durchgeführt.

Tabelle 7 Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die BigDyeCycle Sequenzierung. *BigDyeBuffer Pufferlösung für Sequenzierung, BigDyeEnzym Enzym für Sequenzierung, DNA (engl.) DeoxyriboNucleicAcid), V Vorwärtsprimer, R Rückwärtsprimer.*

Reaktionsansatz		**Temperaturprofil**			
		Prozess	Temp	Zeit	
Primer V bzw.R (0,5µM)	6,0µl	**Initial-Denaturierung**	96°C	1’00’’	
BigDyeEnzym	0,5µl	**Denaturierung**	96°C	0’10’’	25 Zyklen
BigDyeBuffer (5X)	1,5µl	**Annealing**	50°C	0’05’’	
DNA-Produkt	2,0µl	**Extension**	60°C	2’00’’	
Gesamt	10,0µl	Hold	4°C	∞	

2.3.2.4.CleanSEQ (AGENCOURT® CLEANSEQ® Dye-Terminator Removal)

Das Agencourt CleanSEQ System ermöglicht eine schnelle und einfache manuell durchführbare Reinigung der Cycle-Sequencing Produkte für Sequenzen von bis zu 700 bp Länge[13].

Testprinzip: Der Einsatz von magnetischen Beads, die selektiv an die Cycle-Sequencing Produkte binden erlaubt in Kombination mit der einwirkenden Kraft einer Magnetplatte das wiederholte Spülen mit Ethanol und somit die Separation dieser Produkte von kontaminierenden Substanzen.

Einzelschritte der CleanSEQ Prozesse:

- CleanSEQ-Beads (Agencourt® CleanSEQ® Dye-Terminator Removal, Produkt A29173) und 85% Ethanol werden mit dem PCR-Produkt in Wells pipettiert. Nun binden die Beads selektiv an die PCR-Produkte.
- Aufsetzten auf eine Magnetplatte. Nach 4 Minuten haften die an die magnetischen Beads gebundenen PCR-Produkte über die einwirkende Magnetkraft an der Innenfläche des Wells, während die verunreinigenden Produkte im Überstand zurückbleiben und abpipettiert werden können.
- Der Reinigungsschritt durch Zugabe von 85% Ethanol wird erneut durchgeführt, um eventuell zurückgebliebene Verunreinigungen zu entfernen.

- Nach Abpipettieren des Überstandes für 10 Minuten lufttrocknen lassen.
- Zuletzt werden die Beads in den Wells mit Hilfe eines Elutionspuffers (HPLC) ausgespült, die Wells von der Magnetplatte genommen und kurz zentrifugiert. Dabei Lösen sich die PCR-Produkte wieder von den Beads.
- Die Wells werden erneut auf eine für den Sequenzer geeignete Metallplatte gestellt und die Beads diesmal ohne die PCR-Produkte an die Innenfläche der Wells gezogen, während dir PCR-Produkte frei im Elutionspuffer schwimmen. Nun kann die Sequenzierung beginnen.

Eine Veranschaulichung dieses Prinzips erfolgt in Abb. 5.

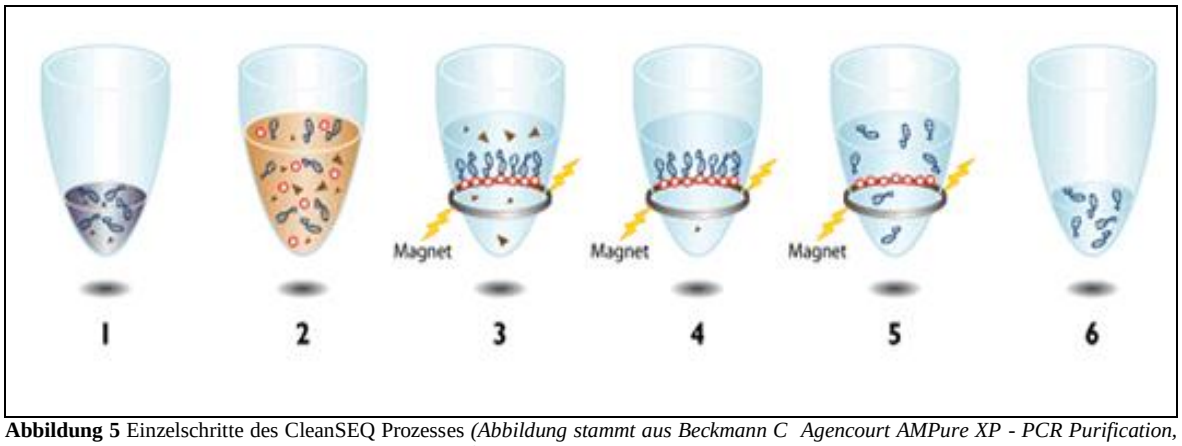

Abbildung 5 Einzelschritte des CleanSEQ Prozesses *(Abbildung stammt aus Beckmann C Agencourt AMPure XP - PCR Purification, http //www.beckmangenomics.com/products/dna_purification_and_cleanup/agencourt_cleanseq.html*,01/2013. *1. AgencourtCleanSEQ und Ethanol werden zum PCR-Produkt pipettiert; 2. Bindung magnestischer Baeds an die PCR-Produkte; 3. Separation der an die magnetischen Beads gebundenen PCR-Produkte von kontaminierenden Substanzen auf der Magnetplatte für 4 Minuten; 4.Abpipettieren des Überstandes und wiederholtes Reinigen mit Ethanol; 5. Ausspülung der Beads mit HPLC; 6. Transfer in den Sequenzer .*

Durchführung: es wurden 10µl Vorwärtsprodukt jeder einzelnen Probe in je ein Well der ersten Spalte einer Mikrotiterplatte (96 Well Cycling Plate; ABGene, AB-1400 AB Gene PCR) gegeben. Für das Rückwärtsprodukt wurde die nächste Spalte der gleichen Mikrotiterplatte gewählt. Nach diesem Prinzip konnte die Platte weiter aufpipettiert werden und somit maximal 48 Probenpaare mit einer Mikrotiterplatte sequenziert werden. Analog dazu wurde am PC eine Arbeitsliste erstellt, die die Zuordnung der jeweiligen Produkte in den Wells zu deren Probenidentitäten in dieser Liste ermöglichte. Zu jeder Probe wurden 10µl CleanSEQ-Beads (Agencourt® CleanSEQ® Dye-Terminator Removal, Produkt A29173) (Lagerung im Kühlschrank bei 4°C) pipettiert, welche vorher auf den Laborrührer kurz geschüttelt wurden, um eine homogene Emulsion zu erhalten. Zum Reinigen der Produkte wurden nun zu jeder Probe 42µl 85% Ethanol hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde auf einem Laborrührer durchgerüttelt, um die einzelnen Substanzen gut zu vermischen. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte auf einer Magnetplatte (Agencourt SPRIPlate® Magnetic Plate: 96 well format: Agencourt SPRIPlate 96R Ring

Magnet Plate) platziert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten haben die magnetischen Beads an das Cycle-Sequencing Produkt gebunden und sich zusammen mit diesem an die Wand der Vertiefungen angelagert. Nun konnte der Überstand mit den kontaminierenden Substanzen abgesaugt werden. Im letzten Schritt erfolgte das Zufügen von 80µl HPLC (115666100 Wasser für Chromatographie, Merck/Darmstadt) zu jeder Probe und nach dem Abnehmen der Wells von der Magnetplatte die Platzierung auf dem Labormixer. Auf diese Weise werden die Beads wieder von den Produkten gelöst. Nach Transfer der Mikrotiterplatte in einem Ständer mit integrierter Magnetplatte erfolgt die Anlagerung der Beads an der Wand der Wells, während die Produkte frei im HPLC schwimmen. So konnte die Mikrotiterplatte in den Sequenzer gestellt werden.

2.3.3.Auswertung

Die Detektion im Sequenzer (3730xl DNA Analyzer, ABI PRISM) erfolgte nach der in 2.3.1 unter „Testprinzip“ beschriebenen Methode und dauerte etwa zwei Stunden. Die Auswertung erfolgte mit der Sequence Pilot Software (JSI Medical Systems, Freiburg).



Abbildung 6 Sequenzer: 3730xl DNA Analyzer, ABI PRISM

Wenn die Software an bestimmten Positionen in der Sequenz eines Produkts z.B. im Rahmen einer Verunreinigung keine eindeutige Base zuordnen konnte, mussten diese nachträglich korrigiert werden. Nach Aufschlüsselung der Sequenz (siehe Abbildung 7) einer DNA-Probe lag der Status des Allelträgers vor.

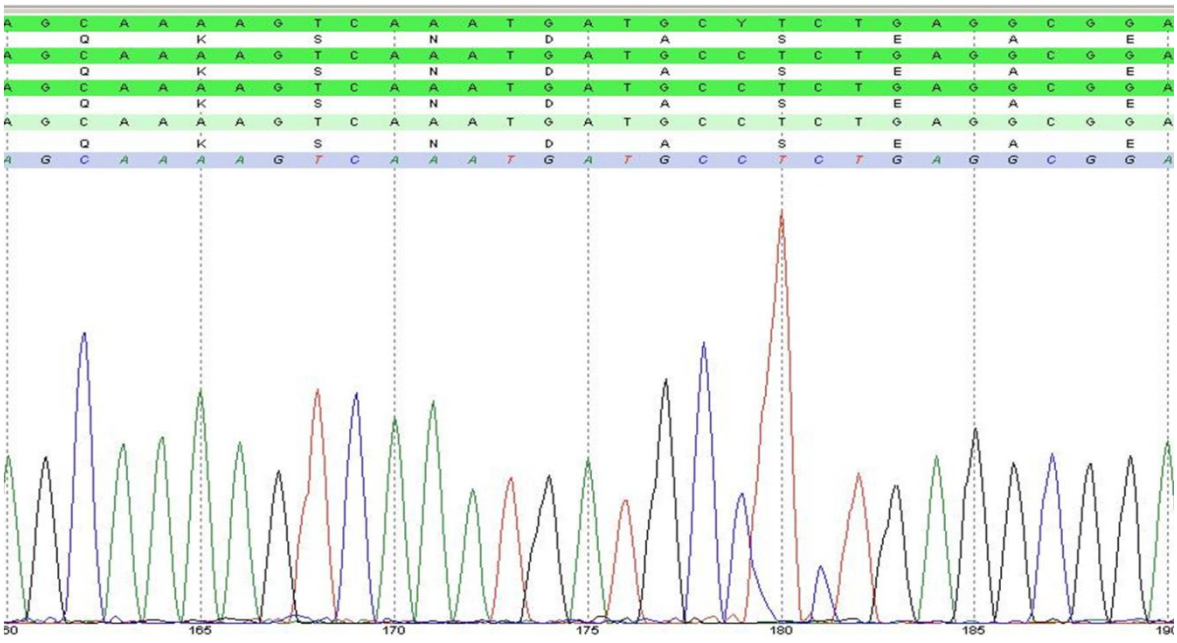

Abbildung 7 Sequenzierungsergebnis mit der Software: *An jeder Position wird der höchste Ausschlag gewertet, daraus lässt sich die Sequenz ablesen. A Adenin (grün), C Cytosin (blau), G Guanin (schwarz), T Thymin (rot).(Abbildung einer HLA-E Sequenz aus unserer Laboranalyse).*

2.4.PCR-SSP (engl.: polymerase chain reaction-sequence-specific priming)

2.4.1.Testprinzip

Die PCR-SSP Methode zur Sequenzierung von HLA wurde erstmals 1991 und 1992 von O. Olerup beschrieben[142,143]. Die PCR-SSP-Methode basiert auf dem Prinzip, dass vollständig oder fast vollständig übereinstimmende Oligonukleotid-Primer durch thermostabile DNA-Polymerasen ohne Eigenschaften zum Korrekturlesen ohne fehlende Übereinstimmungen am 3-‘Ende effizienter bei der PCR-Reaktion verwendet werden als nicht übereinstimmende Primer. Primerpaare sind darauf ausgelegt, dass sie zu einzelnen Allelen oder (einer) Gruppe(n) von Allelen passen. Mit genau kontrollierten PCR-Bedingungen ermöglichen passende oder fast vollständig passende Primerpaare eine Amplifikation, d. h. ein positives Ergebnis, wobei Primerpaare mit fehlenden Übereinstimmungen keine Amplifikation ermöglichen, d. h. ein negatives Ergebnis. Durch Positionierung des 3`-Terminus eines PCR-Primers im Bereich einer polymorphen Basenposition der DNA-Matrize wird im Falle einer Fehlpaarung (engl.: *mismatch*) die Primerelongation durch die *Taq*-Polymerase verhindert. Eine Korrektur unterbleibt, da die *Taq*-Polymerase keine 3`-5`-

Korrektuleseaktivität besitzt. Findet sich am 3`-Terminus eines der beiden PCR-Primer ein Basenmismatch gegenüber der Matrize, unterbleibt die Amplifikation; findet sich eine passende Basenkombination (engl.: *match*) lässt sich anschließend ein spezifisches Produkt nachweisen[201]. Nach dem PCR-Prozess werden die amplifizierten DNA-Fragmente nach Größe getrennt, z.B. durch Agarose-Gelelektrophorese, durch Färbung mit Ethidiumbromid und Exposition gegenüber UV-Licht visualisiert, mittels Fotografie dokumentiert und interpretiert. Die Interpretation von PCR-SSP-Ergebnissen basiert auf dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von (einem) spezifischen PCR-Produkt(en)[73,137,201].

Bei den meisten PCR-basierten Techniken wird der PCR-Prozess nur als Amplifikationsschritt der benötigten Ziel-DNA und als Post-Amplifikationsschritt zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen benötigten Allelen verwendet. Im Gegensatz dazu findet die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Allelen bei der PCR-SSP-Methode während des PCR-Prozesses statt. Dies verkürzt und vereinfacht den Post-Amplifikationsschritt zu einem einfachen Nachweisschritt mittels Gelelektrophorese. Die Ergebnisse des SSP-Tests sind entweder positiv oder negativ und somit ist keine komplizierte Interpretation der Ergebnisse mehr nötig. Zusätzlich ist die Typisierungsauflösung der PCR-SSP höher als für andere PCR-basierte Typisierungstechniken, da jedes Primerpaar zwei Sequenzmotive definiert, die in *cis* liegen, d.h. auf dem gleichen Chromosom.

2.4.2.Durchführung

2.4.2.1.HLA-E SSP-Typisierung

Mit der HLA-E SSP-Typisierung wurde die DNA auf die in der Tabelle 8 und 9 aufgeführten SNPs (engl.: *single nucleotide polymorphism*) untersucht. Die Methodik stammt aus *„Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: Identifying potential errors in existing allele data.“*[73]. Auch in der Durchführung orientierten wir uns an dieser Vorlage. Zuerst wurde für jede Position und jeden möglichen SNP ein Primermix hergestellt. Dabei gibt es für jede Position zwei mögliche Basen und jede Base wird durch eine spezielle Primerkombination erkannt.

Tabelle 8 Primer (Metabion) für die HLA-E Typisierung mit der PCR-SSP-Methode; *A Adenin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin; Jedes (A) einer Position kann entweder mit (B1) oder (B2)dieser Position kombiniert werden, HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, PCR-SSP(engl.) polymerase-chain-reaction-sequence-specific priming*

Primer	Sequenz des Primers (Orientierung)	Position	Base	Allele
104x2N5	TCCTCGCCCCCAGGCTC**C** (vorwärts)	69	C	E*01:01:01:01, E*01:02:01:01, E*01:03:01:01, E*01:03:01:02
69-ALL-as	ATCTGTGCGGTGTCCCTGGC (rückwärts)			
104x2Y5	TCCTCGCCCCCAGGCTC**T** (vorwärts)	69	T	E*01:04
69-ALL-as	ATCTGTGCGGTGTCCCTGGC (rückwärts)			
E25	GATCTCAGCCCCTCCTCG (vorwärts)	294	C	E*01:01:01:01, E*01:02:01:01, E*01:03:01:01, E*01:04
01031x23S	CGCAGCGTCCGCAG**G** (rückwärts)			
E25	GATCTCAGCCCCTCCTCG (vorwärts)	294	T	E*01:03:01:02
01032x23S	CGCAGCGTCCGCAG**A** (rückwärts)			
294-ALL-s	CAGTTCGTGCGCTTCGACAA (vorwärts)	309 - 310	CG	E*01:01:01:01, E*01:03:01:01, E*01:03:01:02, E*01:04
102N3	GCTCTGATTGTAGTAGC**CG** (rückwärts)			
294-ALL-s	CAGTTCGTGCGCTTCGACAA (vorwärts)	309-310	GC	E*01:02:01:01
102Y3b	GCTCTGATTGTAGTAGC**GC** (rückwärts)			
2E-382-A-F	GCGAGCTGGGGCCCGTC**A** (vorwärts)	382	A	E*01:01:01:01, E*01:02:01:01
382-ALL-as	CCGCCTCAGAGGCATCATTTG (rückwärts)			
2E-382-B-F	TGCGAGCTGGGGCCCGGC**G** (vorwärts)	382	G	E*01:03:01:01, E*01:04
382-ALL-as	CCGCCTCAGAGGCATCATTTG (rückwärts)			
532-ALL-s	CCTACGACGGCAAGGATTATCTCA (vorwärts)	532	A	E*01:01:01:01, E*01:02:01:01, E*01:03:01:01, E*01:03:01:02
1043N3	GTCTTCCAGGTAGGCTC**T** (rückwärts)			
532-ALL-s	CCTACGACGGCAAGGATTATCTCA (vorwärts)	532	G	E*01:04
104Y3	GTCTTCCAGGTAGGCTC**C** (rückwärts)			

Tabelle 9 Mastermix, Spezifität und Größe der PCR-Produkte. *V Vorwärtsprimer, R Rückwärtsprimer, bp Basenpaare.*

Mastermix (V/R)	Spezifität	Größe des PCR-Produktes
(104x2N5/69-ALL-as)	C an Position 69	230 bp
(104x2Y5/69-ALL-as)	T an Position 69	230 bp
(E25/01031x23S)	C an Position 294	269 bp
(E25/01032x23S)	T an Position 294	269 bp
(294-ALL-s/102N3)	CG an Position 309/310	171 bp
(294-ALL-s/102Y3b)	GC an Position 309/310	171 bp
(2E-382-A-F/382-ALL-as)	A an Position 382	160 bp
(2E-382-B-F /382-ALL-as)	G an Position 382	160 bp
(532-ALL-s/1043N3)	A an Position 532	137 bp
(532-ALL-s/104Y3)	G an Position 532	137 bp

Alle Primer (Metabion/Martinsried) lagen in 100µM Konzentration vor. Der jeweilige Primermix für jedes Primerpaar wurde auf eine Konzentration von 2,5µM eingestellt. Aus jedem Primermix wurde ein Mastermix zusammengestellt, der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte: 1µl PrimerMix (2,5µM), 1µl Puffer 10X (Qiagen PCR Buffer10X, 15mM $MgCl_2$), 1µl 1mM dNTPs (Illustra™ dNTP Set, 100nM Solutions, 100µmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP, GE Healthcare UK), 1µl Kontrollprimermix (2,5µM) aus HGF fwd control 5`-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3` und HGF rev control 5`-TCA GGC ATT TCT GTT GTG TTT C-3` (Metabion), 0,1µl HotStar-Taq Polymerase (HotStarTaq® 5U/µl, QIAGEN/Hilden) und 4,9µl H_2O (115666100 Wasser für Chromatographie, Merck/Darmstadt). Der allgemeine Reaktionsansatz ist der Tabelle 10 zu entnehmen. Da pro Ansatz 8 Proben typisiert wurden, mussten die einzelnen Komponenten jedes Mastermixes mit dem Faktor 9 (1µl Überschuss) multipliziert werden und wurden daraufhin in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Reaktionsgefäße 3810X, 1,5ml, Eppendorf AG Hamburg) pipettiert. Die HotStar-Taq Polymerase wurde als letzte Komponente hinzugeben. Die ersten 10 Spalten, markiert mit den Zahlen1-10, einer 96-er Mikrotiterplatte wurden jeweils einem Mastermix zugeordnet und ihre 8 Reihen, die mit den Großbuchstaben A-H gekennzeichnet sind, jeweils einer zu typisierenden DNA-Probe. Jeder einzelne Mastermix wurde leicht durchgemischt und auf je eine Spalte mit 9µl pro Well vorsichtig verteilt. Als nächstes wurde in die ersten 10 Wells der Reihe A je 1µl der zugeordneten DNA-Probe pipettiert. Die jeweilige DNA-Probe wurde vorher nochmal gut durchgemischt (Voretex). Die folgende DNA-Probe wurde dann in die darunterliegende Reihe pipettiert. Pro Platte wurden 8 DNA-Proben angelegt. Nach Verschluss der Wells mit Deckeln (Flat Cap Strip, Thermo Scientific, UK) wurden die flüssigen Proben mit bis

zu 800 Umdrehungen herunter zentrifugiert (Multifuge 3 S-R Heraeus). Für die Amplifikation der sequenzspezifischen Produkte wurde ein zweistufiges Thermocyclerprogramm für ein Gesamtvolumen von 10µl pro Reaktion gewählt (siehe Tabelle 10). Die Platte wurde in den Thermocycler (GeneAmp®, PCR System 9700, Applied Biosystem) eingelegt und das Programm gestartet.

Tabelle 10 Allgemeiner Ansatz für die PCR-SSP-Reaktion und deren Thermocyclerbedingungen. *DNA (engl.) DeoxyriboNucleicAcid dNTPs Desoxyribonukleotid Triphosphate, min Minuten, PCR-SSP (engl.) polymerase-chain-reaction-sequence-specific priming, Taq Taq-Polymerase, Temp. Temperatur*

Reaktionsansatz			**Temperaturprofil**			
Mastermix	Puffer 10x	1,0µl	Prozess	Temp.	Zeit	
	Primermix (2,5µM)	1,0µl	**Initiale-Denaturierung**	95°C	15‘00‘‘	
	Kontrollprimermix (0,5µM)	1,0µl	**Denaturierung**	94°C	00‘10‘‘	10 Zyklen
	dNTPs (1mM)	1,0µl	**Annealing/Extension**	65°C	01‘00‘‘	
	HotStar-Taq (5U/µl)	0,1µl	**Denaturierung**	94°C	00‘10‘‘	20 Zyklen
	H_2O	4,9µl	**Annealing**	61°C	01‘00‘‘	
	plus DANN (2-50ng/µl)	1,0µl	**Extension**	72°C	00‘30‘‘	
	Gesamtvolumen	10,0µl	Hold	4°C	∞	

2.4.2.2.Gelelektrophorese

Nach der PCR wird zum Nachweis der Amplifikate eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Amplifikatbanden werden im Anschluss an die Elektrophorese mit UV-Licht (AlphaImager® EP AlphaInnotech) sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationsverfahren (AlphaView™ Imager Software, AlphaView Stand alone Version 1.3.0) fotografiert und archiviert.

Testprinzip: Die klassische Elektrophorese nach Tiselius (1948) ist die Standardmethode zur Trennung und Isolierung von Nukleinsäure, Aminosäuren, Peptiden, Kohlenhydraten u.a. Die elektrophoretische Trennung erfolgt in trägergestützten Medien (Glasplatte mit aufgetragenem Gel oder Folie) oder innerhalb freier Lösung. In einer Elektrophorese-Anlage befinden sich Anode und Kathode an die eine Gleichspannung angelegt werden kann. Das Elektrophorese-Prinzip beruht auf der Wanderung von geladenen Molekülen unter dem Einfluss eines Gleichstromfeldes, wobei sich die Probenspezies in wässriger Lösung befinden. Die anionischen und kationischen Spezies migrieren zu den Polen mit entgegengesetzter Ladung. Neben der Ladung bestimmen als weitere Modalitäten Volumen und Masse die Geschwindigkeit der Auftrennung der verschiedenen Moleküle und lassen einzelnen Substanzzonen entstehen. Bei der Gelelektrophorese nach Hjerten (1961) wird ein Agarosegel als Trennmaterial genutzt[77].

Unser Ansatz für ein 2% Agarosegel lautete wie folgt: für ein Gel wurden 6g Agarose (Biozym LE Agarose, Art.-Nr. 840004, BiozymScientific GmbH D-31833 Hess. Oldendorf) eingewogen und mit 1X TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA Puffer) auf 300g aufgefüllt. Danach wurde dieser Ansatz im Mikrowellenherd aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nachdem diese Mischung auf ca. 60°C abkühlt ist, wurden 8 Tropfen oder ca.3µl Ethidiumbromid (GX12948 0,07% Ethidium Bromid (inno-TRAIN Diagnostik GmbH Kronberg/Taunus) unter einem Abzug dazugegeben. Die Lösung wurde gerührt, bis sich das Ethidiumbromid gut verteilt hatte und dann in den vorbereiteten mit 10 Kämmen aufgesteckten Gelschlitten gegossen. Bei Raumtemperatur konnten die Kämme nach etwa 15 Minuten, sobald das Gel ausgehärtet war, wieder entfernt werden. Jeder Kamm hinterließ dabei 30 Geltaschen (engl.: *slots*) im Gel. Nach dem Aushärten des Gels, dem Entfernen der Kämme und der Seitenteile wurde das Gel in die Gelkammer überführt und mit 1X TBE-Puffer übergossen, so dass die Kammer und die Slots vollständig mit Puffer bedeckt waren. Anschließend wurde zu den Amplifikaten in jedes Well mit einer Multipette 5µl Puffer (loadingbuffer 1:3) hinzugefügt und dann wurden diese aus den Wells der Mikrotiterplatten in die Taschen des Gels übertragen. Zuletzt wurde die Gelkammer an ein Netzgerät (Electrophoresis Power Supply-EPS 300) angeschlossen und man konnte die Elektrophorese bei einer Einstellung von 8V/cm (Elektrodenabstand) hier 180V in 20 Minuten durchführen. Das Gel konnte daraufhin unter UV-Licht mit dem Geldokumentationssystem (Alpha Imager® EP AlphaInnotech) fotografiert und als Ausdruck archiviert werden.

2.4.3. Auswertung der SSP-Typisierung

Um herauszufinden welcher Allelstatus jeder einzelnen DNA-Probe zuzuordnen war, musste man überprüfen für welche Primerpaare die jeweilige Probe positive Banden in der Gelelektrophorese aufwies. Mit Hilfe von den in Tabelle 8 und 9 aufgeführten Daten, konnte man nach dem Ausschlussverfahren aus der Kombination der Banden auf den Allelstatus rückschließen. Eine Auswertung fand nur statt, wenn in allen 10 Slots einer Probe zusätzlich mindestens eine Bande aufleuchtete, die der Positivkontrolle entsprach und als Nachweis für eine fehlerfreie Amplifikation diente. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 8.

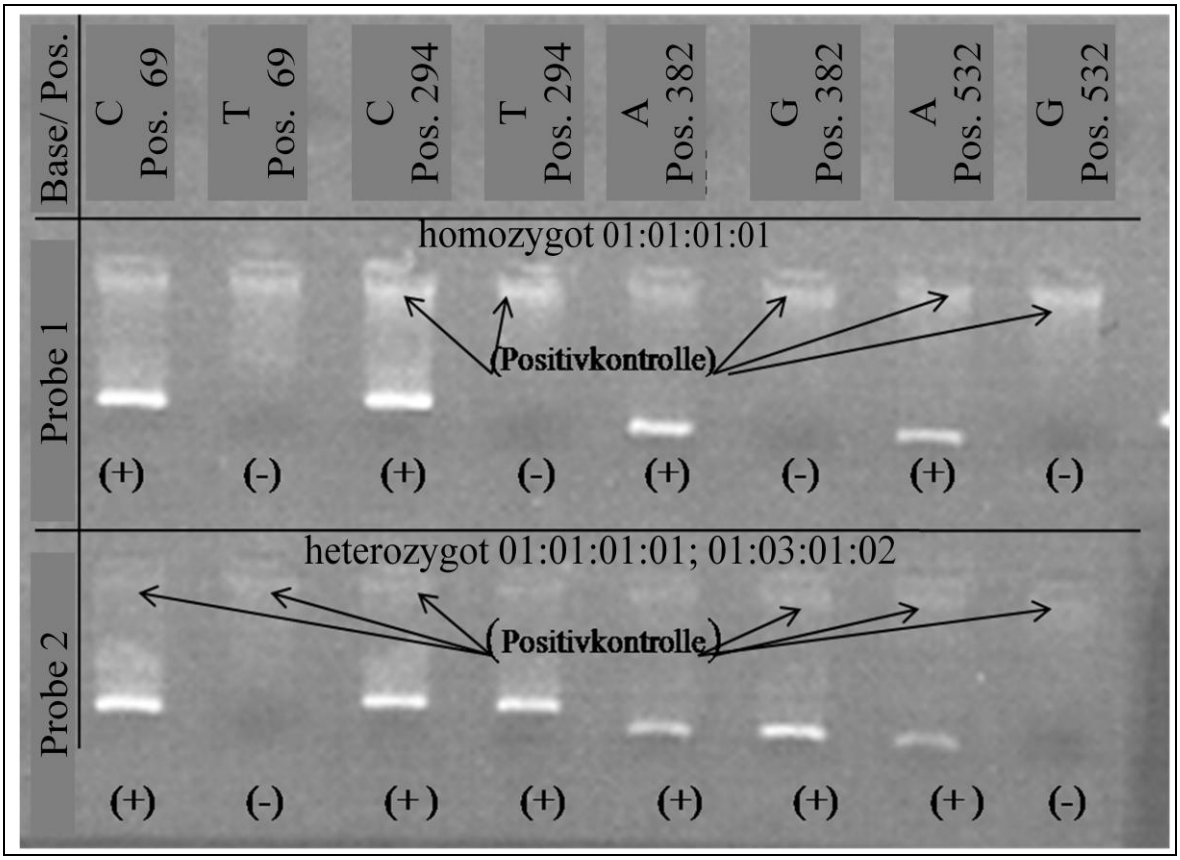

Abbildung 8 Veranschaulichung der PCR-SSP-Ergebnisse in der Gelelektrophorese. *(+) positive Bande, (-) negative Bande, PCR-SSP (engl.) polymerase-chain-reaction-sequence-specific priming, Pos. Position in der Gensequenz.*

2.5.Validierung der SSP-Methode

Zur Validierung der SSP-Methode wurden zuerst 40 Proben des MICA Reference Panels der IHWG Cell and Gene Bank auf HLA-E typisiert (siehe Tabelle 11). Anschließend wurden diese Proben zur Kontrolle der Ergebnisse durch Sequenzierung typisiert.

Tabelle 11 MICA Reference Panel der IHWG Cell and Gene Bank. *IHWG (engl.) International Histocompatibility Working Group, MICA (engl.) MHC class I polypeptide-related sequence A, Nr. Nummer der Referenzprobe*

IHW Nr.	Name	IHW Nr.	Name	IHW Nr.	Name	IHW Nr.	Name
9003	KAS116	0929	WT51	9058	OMW	9107	LKT3
9005	HOM2	9032	BSM	9062	WDV	9108	CAR, ML
9007	DEM	9035	JBUSH	9070	LUY	9141	HOK-KAIDO
9008	D0208915	9037	Sweig	9075	DKB	9215	M7
9009	KAS011	0938	BM16	9079	LWAGS	9219	WEWAK1
9012	WJR076	0940	BM15	9080	EHM	9267	LEO23
0914	MGAR	9041	J0528239	9085	EJ32B	9300	LS40
0915	WT24	9050	MOU	9092	BM92	9380	FH6
0916	RML	9051	PITOUT	9105	FPAF	9382	FH8
9019	DUCAF	9052	DBB	9106	MANIKA	9460	FH71

3 ERGEBNISSE

3.1. HLA-E SSP-Typisierungsergebnisse im untersuchten Studienkollektiv

Die Mitglieder des untersuchten Kollektivs konnten entweder homozygote HLA-E*01:01, 01:01 oder homozygote HLA-E*01:03, 01:03 bzw. heterozygote HLA-E*01:01, 01:03 Merkmalträger sein. Die Allelverteilung in der Empfängergruppe (P-Wert=0,649) verglichen mit der Allelverteilung in der Spendergruppe (P-Wert=0,776) zeigte keine signifikante Abweichung. Die genaue Verteilung der Typisierungsergebnisse in den beiden Gruppen und die Berechnungen zum HWE sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12 HLA-E Typisierungsergebnisse des Empfänger-/Spenderkollektivs und das Hardy-Weinberg-Equilirium (HWE) mit einem Freiheitsgrad. *Wenn der P-Wert <0,05 dann ist das HWE nicht erfüllt, HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E.*

mögliche Genotypen	**Häufigkeit in der Empfängergruppe (absolut)**	**Relative Häufigkeit (%)**	**Häufigkeit in der Spendergruppe (absolut)**	**Relative Häufigkeit (%)**
HLA-E* 01:01, 01:01	33	34,2	34	34,8
HLA-E* 01:01, 01:03	60	57,6	59	57,5
HLA-E* 01:03, 01:03	23	24,2	23	23,8
Gesamt	116	100	116	100
X^2	0,206853739		0,081287049	
P-Wert	0,649245		0,775561	

Auch wenn alle Patienten und Spender auf 10 ihrer jeweiligen HLA-Merkmale identisch waren, befanden sich in dem hier untersuchten Kollektiv 37 für das HLA-E Merkmal nicht kompatible bzw. nicht gematchte Paare. Diese machen mit 31,9% einen signifikanten Anteil am Gesamtkollektiv aus. Daher können in der folgenden statistischen Analyse diese zwei Teilgruppen: kompatibel (gematcht) versus inkompatibel (nicht gematcht) einander gegenübergestellt werden. Unter den Empfängern befanden sich 23 (19,8%) homozygote HLA-E*01:03 Merkmalträger. Davon hatten 14 einen HLA-E identischen Spender. Dieser Allelstatus wird als vermutlich prognostisch günstiger Faktor in der Literatur beschrieben. Das Kollektiv wurde daher in folgende zwei Gruppen eingeteilt: Patienten mit homozygotem HLA-E*01:03 Status und Patienten mit anderem HLA-E Status, und auf signifikante Unterschiede untersucht. Einen Überblick verschafft Tabelle 13. Zusätzlich untersuchten wir den Einfluss des homozygoten HLA-E*01:01 Status des Spenders auf die TRM seines Empfängers. Dieser Status soll sich wiederum negativ auf das Outcome auswirken. Die deskriptive Statistik hierzu wird in Tabelle 14 wiedergegeben.

Tabelle 13 Einteilung des Kollektivs in die Gruppen „Patienten mit prognostisch günstigem homozygoten HLA-E*01:03 Status“ und „Patienten mit anderem HLA-E Status“. *HLA-E Humane Leukozyten Antigen.*

Patienten mit homozygotem HLA-E*01:03 Status	Patient mit anderem HLA-E Status	Gesamt
23 (19,8%)	93 (80,2%)	116 (100%)

Tabelle 14 Einteilung des Kollektivs in die Gruppen Patienten mit „HLA-E*01:01 homozygoten Spendern“ und „Patienten mit Spendern anderer HLA-E Status“. *HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E.*

Patienten mit homozygotem HLA-E*01:01 Spender	Patienten mit Spendern anderer HLA-E Status	Gesamt
34 (34,8%)	82 (65,2%)	116 (100%)

3.2. Die statistische Analyse der Endpunkte OS und DFS mit SPSS

3.2.1.Die univariate Analyse der Endpunkte OS und DFS nach Kaplan-Mayer

Einen Überblick über die univariate statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) und des krankheitsfreien Überlebens (DFS) nach Kaplan-Meier verschafft Tabelle 15.

Tabelle 15 Statistische univariate Auswertung des OS und des DFS in den Gruppen “HLA-E kompatibel“ versus „HLA-E inkompatibel“ und „homozygote HLA-E*01:03 Träger“ versus „ andere Allelkombinationen“ aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit n=116. *DFS krankheitsfreies Überleben (engl. disease-free survival), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, OS Gesamtüberleben (engl. overall survival).*

Faktor (Gruppen)	Status	Freiheits-grade	P-Wert (Log-Rang)
HLA-E Kompatible vs. Inkompatible	Gesamtüberleben August 2008 (OS)	1	0,748
Homozygote HLA-E*01:03 Patienten vs. Andere	Gesamtüberleben August 2008 (OS)	1	0,584
HLA-E Kompatible vs. Inkompatible	Krankheitsfreies Überleben (DFS)	1	0,848
Homozygote HLA-E*01:03 Patienten vs. Andere	Krankheitsfreies Überleben (DFS)	1	0,737

Für das OS nach 5 Jahren der HLA-E kompatiblen Gruppe[OS(5J): 0,46%] gegenüber der inkompatiblen Gruppe [OS(5J): 0,43%] ergab sich mit einem P-Wert von 0,748 im Log-Rang-Test kein signifikanter Vorteil. Die hierzu gehörigen Überlebensfunktionen werden in Abbildung 9 wiedergegeben.

Auch für das OS nach 5 Jahren der homozygoten HLA-E*01:03 Patienten im Vergleich zu den Patienten mit homozygotem HLA-E*01:01 und heterozygotem HLA-E*01:01, 01:03 Status (letztere beiden wurden zu einer Gruppe zusammengefasst) ergab sich statistisch kein bedeutender Unterschied [OS(5J): 0,41% vs. 0,45%]. Hier erreichte der P-Wert 0,584 im Log-Rang-Test. Die Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier werden in der Abbildung 10 veranschaulicht.

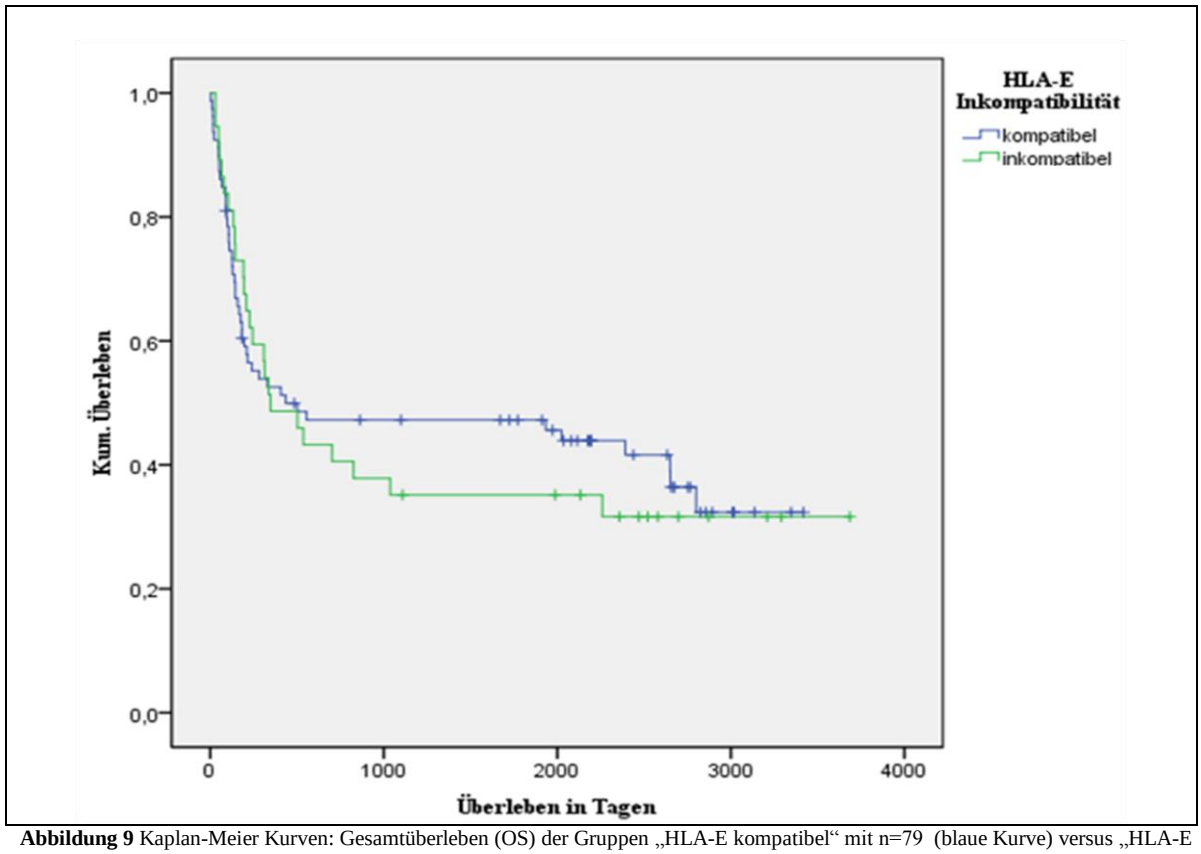

Abbildung 9 Kaplan-Meier Kurven: Gesamtüberleben (OS) der Gruppen „HLA-E kompatibel“ mit n=79 (blaue Kurve) versus „HLA-E inkompatibel“ mit n=37 (grüne Kurve) aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit einem P-Wert von 0,748. *HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, OS (engl.) overall survival, P-Wert signifikant wenn <0,05.*

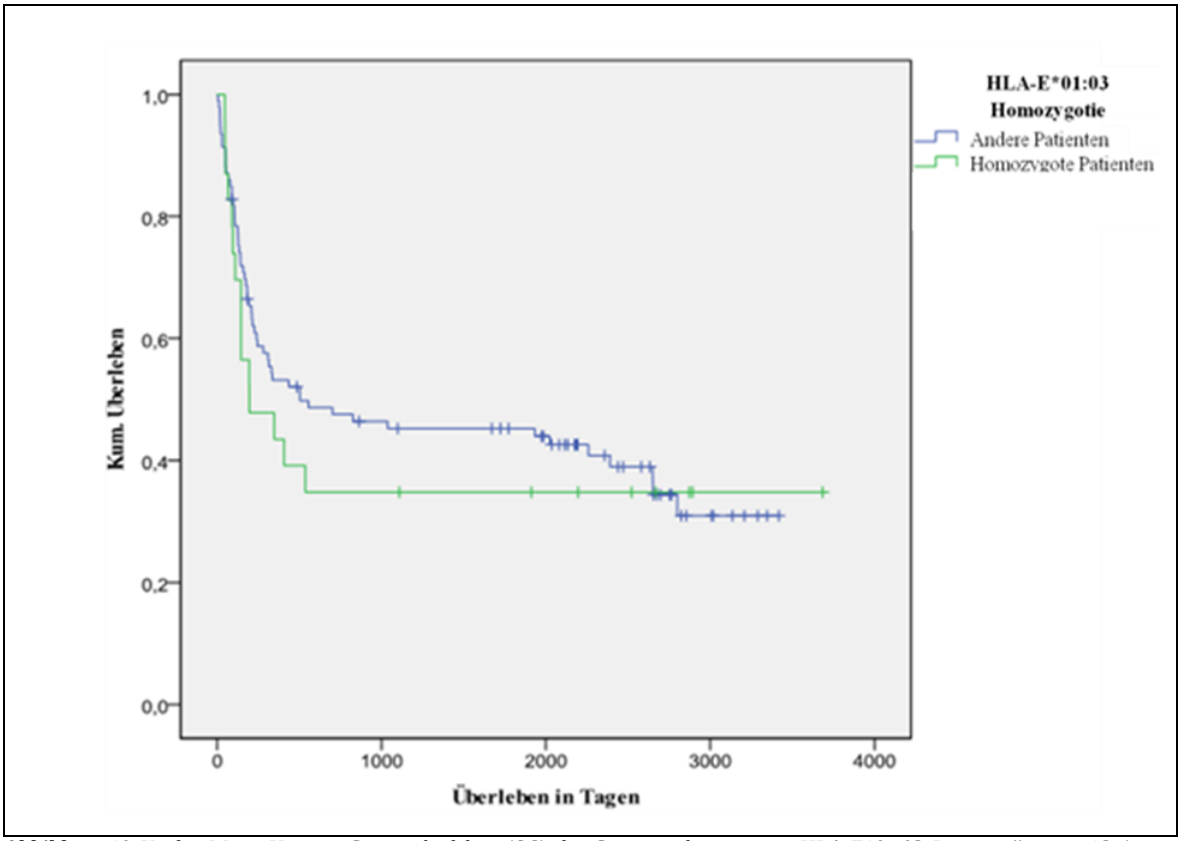

Abbildung 10 Kaplan-Meier Kurven: Gesamtüberleben (OS) der Gruppen „homozygote HLA-E*01:03 Patienten“ mit n=23 (grüne Kurve) versus „Patienten mit anderem HLA-E Status“ mit n= 93 (blaue Kurve) aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit einem P-Wert von 0,584. *HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, OS (engl.) overall survival, P-Wert signifikant wenn <0,05.*

Auch in der univariaten Analyse des DFS nach 5 Jahren lässt sich kein Vorteil für die Empfänger eines HLA-E identischen Transplantats [DFS (5J): 0,41%] gegenüber den Empfängern HLA-E inkompatibler Transplantate [DFS (5J): 0,43%] nachweisen. Im Log-Rang-Test errechnet sich ein P-Wert von 0,848. Die hierzu gehörigen Überlebensfunktionen werden in Abbildung 11 wiedergegeben.

Für das DFS nach 5 Jahren der homozygoten HLA-E*01:03 Merkmalträger [DFS (5J): 41%] vs. andere Merkmalträger [DFS (5J): 37%] errechnete sich im Log-Rang-Test ein nicht signifikanter P-Wert von 0,737, d.h. keine der beiden Gruppen weist einen signifikant längeren Zeitraum bis zum Auftreten des ersten Krankheitsrezidivs auf. Die hierzugehörigen Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 12 dargestellt.

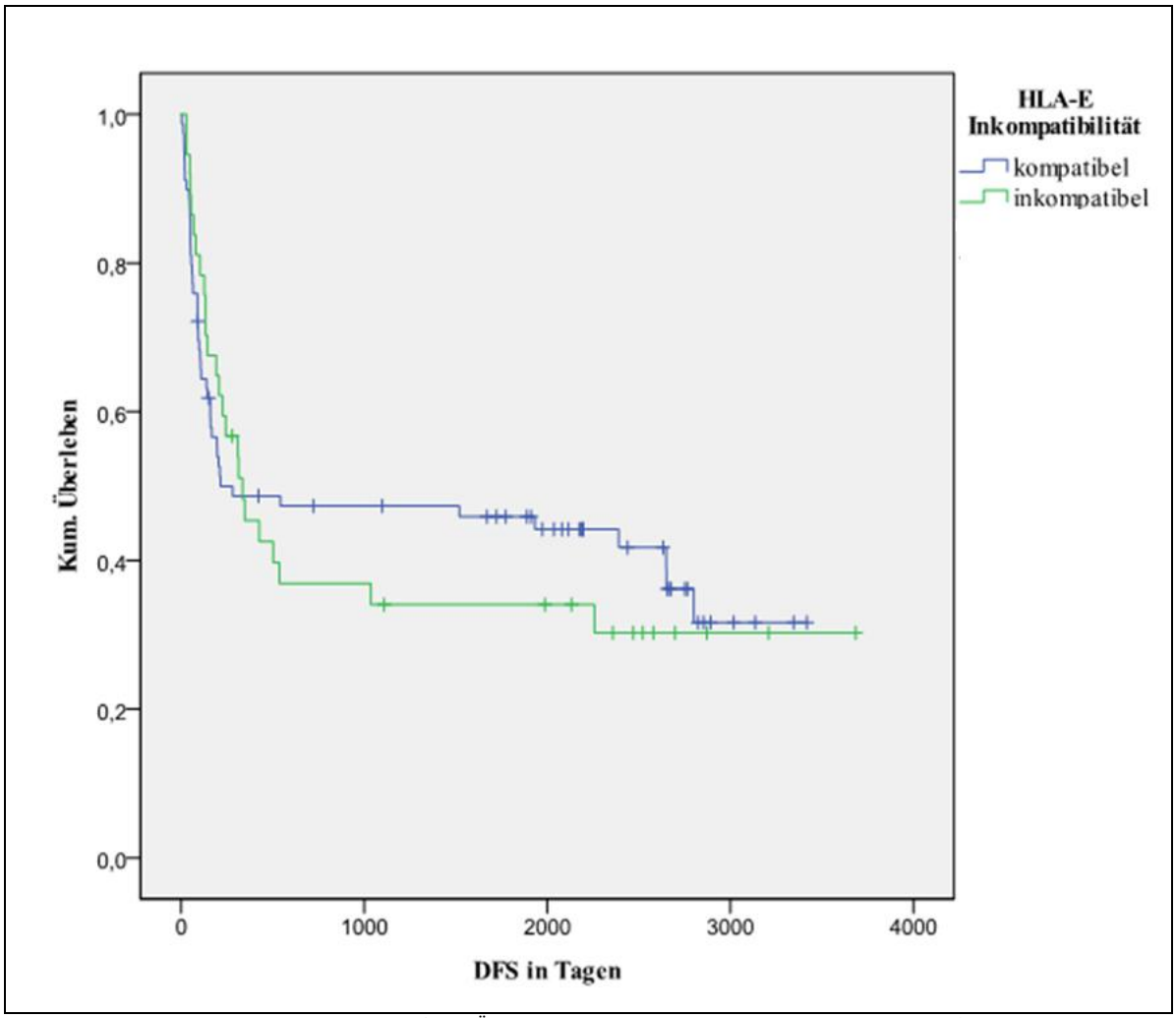

Abbildung 11 Kaplan-Meier Kurven: krankheitsfreies Überleben (DFS) der Gruppen „HLA-E kompatibel“ mit n= 79 (blaue Kurve) versus „HLA-E inkompatibel“ mit n= 37 (grüne Kurve) aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit einem P-Wert von 0,848. *DFS (engl.) disease-free survival, HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, P-Wert signifikant wenn <0,05.*

.

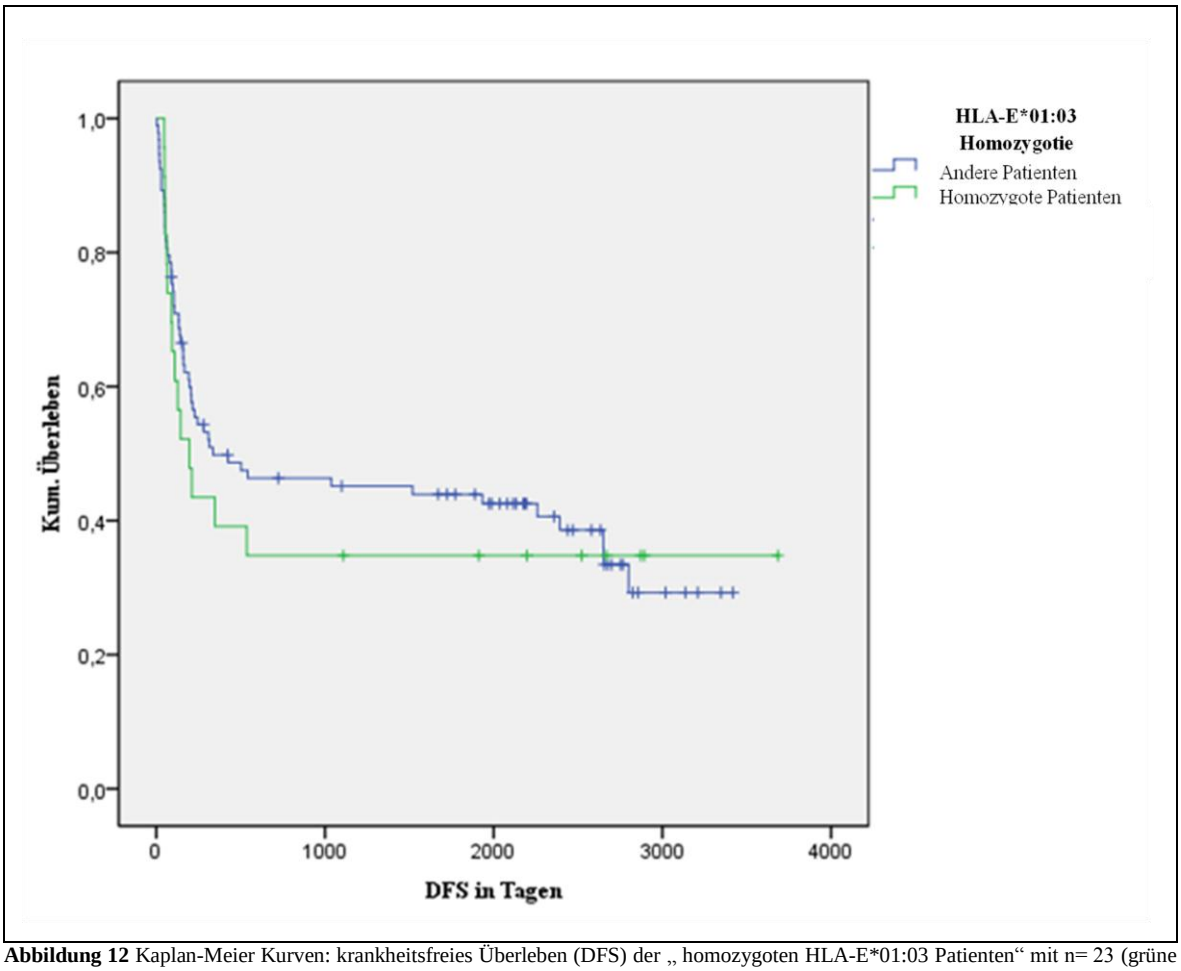

Abbildung 12 Kaplan-Meier Kurven: krankheitsfreies Überleben (DFS) der „ homozygoten HLA-E*01:03 Patienten“ mit n= 23 (grüne Kurve) versus „Patienten mit anderem HLA-E Status“ mit n=93 (blaue Kurve) aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit einem P-Wert von 0,737. *DFS (engl.) disease-free survival, HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, P-Wert signifikant wenn <0,05.*

3.2.2.Die multivariate Analyse der Endpunkte OS und DFS nach Cox

Ähnlich verhielten sich diese beiden Parameter auch in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse mit der schrittweise Rückwärts-Ausschlussmethode, in der zusätzliche Einflussfaktoren wie Stadium der Erkrankung, Diagnose des Patienten, Alter des Empfängers bei Transplantation und Art des Transplantats berücksichtigt wurden. Die deskriptive Statistik hierzu kann der Tabelle 2 aus dem Material- und Methodenteil entnommen werden.

Mit einem P-Wert von 0,644 beeinflusst die HLA-E (In-)Kompatibilität das Gesamtüberleben nicht signifikant. Da sich die Variable HLA-E (In-)Kompatibilität der Spender-/Empfängerpaare im ersten statistischen Modell als nicht signifikant erweist, wird diese aus dem zweiten Modell ausgeschlossen.

Auch die HLA-E*01:03 homozygoten Empfänger weisen keinen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den anderen Empfängern auf. Das relative Risiko früher zu versterben ist für Patienten mit einem anderen HLA-E Status als dem homozygoten HLA-

E*01:03 Status zwar um den Faktor 1,156 [95% KI: 0,587 – 2,278] erhöht, dieser Unterschied ist jedoch mit einem P-Wert von 0,674 in der Cox-Regressionsanalyse nicht signifikant.

Im zweiten Modell der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox stellen die restlichen Parameter „Art der Transplantation“ d.h. PBSC versus KM (P-Wert=0,000), „Stadium der Erkrankung“ (P-Wert=0,016), „Diagnose“ (P-Wert=0,031) und „Alter des Patienten“ (P-Wert=0,014) signifikante Faktoren dar. Die statistischen Ergebnisse, die neben dem P-Wert auch den Regressionskoeffizient B und dessen Standard Error SE, sowie den Wald-Test (je größer die absolute Zahl, desto signifikanter ist diese Variable in diesem Modell) und das Relative Risiko einschließlich dessen 95% Konfidenzintervalles beinhalten werden im Überblick aus der Tabelle 16 ersichtlich.

Tabelle 16 Ergebnisse der multivariaten statistischen Analyse des Gesamtüberlebens (OS) Stammzelltransplantierter aus der hier durchgeführten Multizenterstudie mit n=116 nach schrittweisem Ausschluss von nicht signifikanten Variablen mit P-Wert > 0,05 [HLA-E In-/Kompatibilität, HLA-E 01:03 Homozygote/andere Empfänger]. Hier nur noch signifikante Variablen dargestellt.
ALL Akute lymphatische Leukämie, AML Akute myeloische Leukämie, B Regressionskoeffizient B, CML Chronische myeloische Leukämie, df Freiheitsgrad (engl. degrees of freedom), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, MDS Myelodysplastisches Syndrom, MPS Myeloproliferatives Syndrom, n Anzahl der Probanden, OS (engl.) overall survival, P-Wert Signifikanzniveau <0,05, RR Relatives Risiko, SE Standard Error von B, Wald statistischer Hypothesentest zur Überprüfung, ob eine oder alle unabhängigen Variablen einen signifikanten Beitrag zum Regressionsmodell leisten.

Kovariaten	B	SE	Wald	Df	P-Wert	RR	95% Konfidenz-intervall für RR	
							Unten	Oben
Alter des Patienten	0.032	0.013	6.020	1	0.014	1.032	1.006	1.059
Diagnose			10.623	4	0.031			
ALL	0.868	0.569	2.325	1	0.127	2.381	0.781	7.264
AML	0.613	0.498	1.514	1	0.219	1.845	0.695	4.897
CML	0.010	0.543	0.000	1	0.986	1.010	0.348	2.926
MDS/MPS	-1.134	0.845	1.801	1	0.180	0.322	0.061	1.686
Stadium der Erkrankung	0.504	0.209	5.825	1	0.016	1.655	1.099	2.492
Transplantations-art	-1.130	0.294	15.191	1	0.000	0.318	0.179	0.556

Für das DFS ergab sich in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse unerwarteterweise für die Gruppe der inkompatiblen Spender- und Empfängerpaare im Vergleich zu der Gruppe von kompatiblen Spender- und Empfängerpaaren ein um den Faktor 0,996 verringertes RR früher zu verstreben. Mit einem 95% KI zwischen 0,589 und 1,711 und einem P-Wert von 0,988 besteht statistisch jedoch kein Unterschied zwischen diesen beiden verglichenen Gruppen. Im zweiten Modell ist diese Variable aufgrund ihrer Nichtsignifikanz nicht mehr vorhanden.

Für die Patienten mit einem anderen Allelstatus als dem homozygoten HLA-E*01:03 Status ergab sich in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse des DFS ein auf das 1,062 fache erhöhte RR früher zu versterben. Auch dieses RR ist statistisch nicht signifikant da sich das 95% KI zwischen 0,548 und 2,058 bewegt und der P-Wert 0,859 beträgt.

Die Variable „Diagnose“ stellt sich mit einem P-Wert von 0,057 nur knapp als nicht signifikant heraus. Alle anderen Variablen bleiben im zweiten Modell als signifikante Faktoren erhalten. Weitere statistische Details hierzu sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17 Ergebnisse der multivariaten statistischen Analyse des krankheitsfreien Überlebens (DFS) Stammzelltransplantierter der hier durchgeführten Multizenterstudie mit n=116 nach schrittweisem Ausschluss von nicht signifikanten Variablen mit einem P-Wert > 0,05 [199].
ALL Akute lymphatische Leukämie, AML Akute myeloische Leukämie, B Regressionskoeffizient B, CML Chronische myeloische Leukämie, df Freiheitsgrad (engl. degrees of freedom), DFS (engl.) disease-free survival, HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, MDS Myelodysplastisches Syndrom, MPS Myeloproliferatives Syndrom, n Anzahl der Probanden, P-Wert Signifikanzniveau <0,05, RR Relatives Risiko, SE Standard Error von B, Wald statistischer Hypothesentest zur Überprüfung, ob eine oder alle unabhängigen Variablen einen signifikanten Beitrag zum Regressionsmodell leisten.

Kovariaten	B	SE	Wald	Df	P-Wert	RR	95% Konfidenz-intervall für RR	
							unten	Oben
Alter des Patienten	0.029	0.012	5.718	1	0.017	1.030	1.005	1.054
Diagnose			9.161	4	0.059			
ALL	0.519	0.547	0.900	1	0.343	1.681	0.575	4.912
AML	0.379	0.498	0.580	1	0.446	1.461	0.551	3.877
CML	-0.190	0.531	0.128	1	0.720	0.827	0.292	2.341
MDS/MPS	-1.350	0.844	2.556	1	0.110	0.259	0.050	1.357
Stadium der Erkrankung	0.455	0.197	5.351	1	0.021	1.576	1.072	2.316
Transplantations-art	-0.955	0.274	12.161	1	0.000	0.385	0.225	0.658

3.3. Die statistische Analyse der kumulativen Inzidenzen mit R

3.3.1.Die statistische Analyse des Endpunktes Rezidiv bzw. Relapse

Die kumulative Inzidenz von Rezidiven erreichte 36,6% in der Gruppe der Empfänger mit einem HLA-E-kompatiblen Spender und 30,6% in der Gruppe mit den inkompatiblen Spender-/Empfängerpaaren. Diese Differenz zwischen den Gruppen macht mit einem P-Wert von 0,507 keinen signifikanten Unterschied aus (siehe Tabelle 18).

Auch in der Analyse der kumulativen Inzidenzen der Relapse in den Gruppen HLA-E*01:03 homozygote Träger versus andere Allelkombinationsträger konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bei einem P-Wert von 0,908 festgestellt werden. Hier erreichte die kumulative Inzidenz für Relapse 31,8% in der Gruppe mit den HLA-E*01:03

homozygoten Trägern und 35,3% in der Gruppe mit den übrigen HLA-E Trägern (Tabelle 19).

Tabelle 18 Ergebnisse der univariaten statistischen Analyse der kumulativen Inzidenzen des Rezidivs/Relpases in den Gruppen „HLA-E kompatibel“ versus „HLA-E inkompatibel“ des hier untersuchten Multizenterkollektivs Stammzelltransplantierter mit n=116. *CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden.*

Untersuchte Gruppe	**Zeitpunkt in Tagen**								
	Kumulative Inzidenz		500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
HLA-E kompatibel Relapse		0	0,3112	0,337	0,337	0,366	0,366	**0,366**	-
HLA-E inkompatibel Relapse		0	0,278	0,278	0,306	0,306	0,306	0,306	**0,306**
HLA-E kompatibel CR		0	0,232	0,232	0,232	0,247	0,287	**0,357**	-
HLA-E inkompatibel CR		0	0,333	0,389	0,389	0,389	0,427	0,427	**0,427**

Tabelle 19 Ergebnisse der univariaten statistischen Analyse der kumulativen Inzidenzen des Rezidivs/Relapses in den Gruppen „HLA-E*01:03 homozygote“ versus andere „HLA-E-Träger“ des hier untersuchten Multizenterkollektivs Stammzelltransplantierter mit n=116. *CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden.*

Untersuchte Gruppe	**Zeitpunkt in Tagen**								
	Kumulative Inzidenz		500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
HLA-E*01:03 homozygote Relapse		0	0,3812	0,3812	0,3812	0,3812	0,3812	0,3812	**0,381**
HLA-E andere Relapse		0	0,2963	0,3184	0,3294	0,3531	3,5310	**0,3531**	**-**
HLA-E*01:03 homozygote CR		0	0,3182	0,3636	0,3636	0,3636	0,3636	0,3636	**0,364**
HLA-E andere CR		0	0,2516	0,2626	0,2626	0,2750	0,3104	**0,3917**	**-**

Zur Veranschaulichung der Kumulativen Inzidenzen in den verschiedenen Gruppen dient die folgende Abbildung 13.

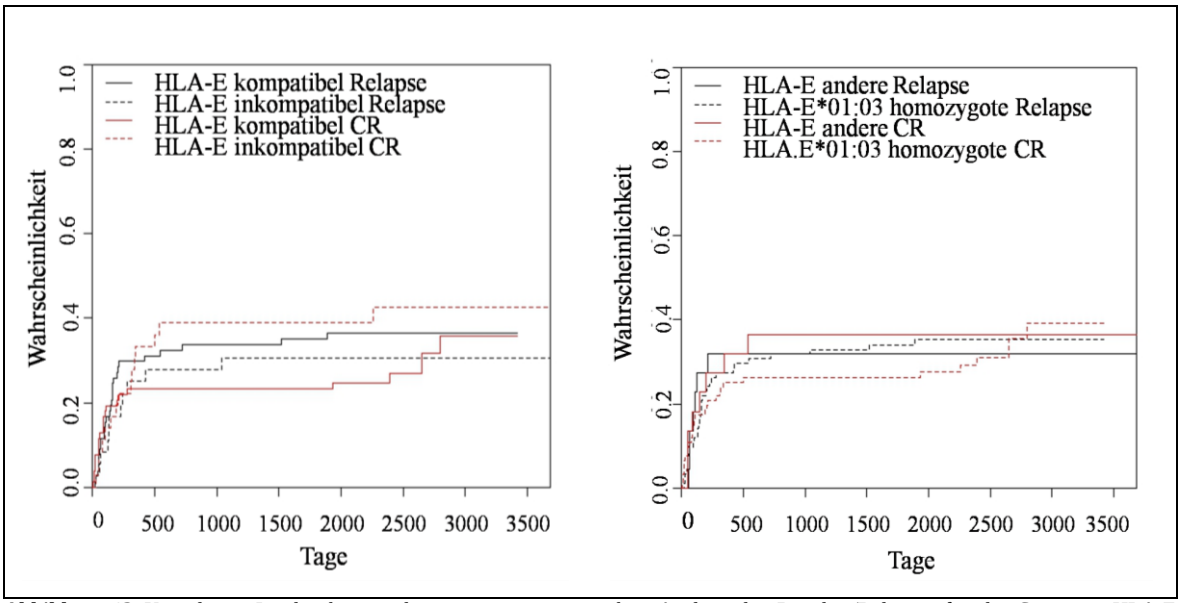

Abbildung 13 Kumulative Inzidenzkurven der univariaten statistischen Analyse des Rezidivs/Relapses für die Gruppen „HLA-E kompatibel" vs. „inkompatibel" (links) und die Gruppen „HLA-E*01:03 homozygote" versus „andere HLA-E-Empfänger" (rechts) des hier untersuchten Multizenterkollektivs Stammzelltransplantierter mit n=116. *CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden.*

In der multivariaten Analyse unter Berücksichtigung folgender Kovariaten:

- „HLA-E-Status",
- „Alter des Empfängers",
- „Art der Transplantation" (Knochenmarktransplantation oder PBSZT) und
- „Konditionierungsregime" (myeloablativ versus reduzierte Intensität)

konnte kein signifikanter Unterschied für die Inzidenz eines Relapse zwischen den Gruppen HLA-E kompatibel versus HLA-E inkompatibel bzw. HLA-E*01:03 homozygote versus HLA-E andere Träger nachgewiesen werden.

Eine Signifikanz ergab sich lediglich für die Kovariate „Konditionierungsregime" und war nach schrittweiser Entfernung nichtsignifikanter Kovariaten im finalen Modell mit lediglich „Konditionierungsregime" als Variable am größten. Es ergibt sich ein P-Wert von 4,4e-06. Für die Empfänger einer Konditionierung mit „geringerer Intensität" errechnete sich ein um den Faktor 4,4 größeres relatives Risiko für einen Relapse als bei denen mit myeloablativer Konditionierung. Das 95% Konfidenzintervall lag dabei zwischen 2,34 und 8,28. Die vollständige statistische Auswertung ist den Tabellen 20 zu entnehmen.

Tabelle 20 Ergebnisse der multivariaten statistischen Analyse des Relaps Stammzelltransplantierter aus der hier durchgeführten Multizenterstudie mit n=116 nach schrittweisem Ausschluss von nicht signifikanten Variablen mit einem P-Wert > 0,05 [HLA-E In-/Kompatibilität, HLA-E 01:03 Homozygote/Andere, Alter des Empfängers, Art der Transplantation]. Einzig signifikante Variable: Konditionierungsregime „geringerer Intensität" im Vergleich zur „myeloablativen Konditionierung".
Coef geschätzter Regressionskoeffizient, HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, RR Relatives Risiko, se(coef) Standartabweichung des geschätzten Koeffizienten, Z-Wert dient der Signifikanztestung zusätzlich zum P-Wert, 2,5%-97,5% 95% Konfidenzintervall.

multivariat Relapse	Coef	se(coef)	Z-Wert	P-Wert	RR	-RR	2,5%	97,5%
Konditionierungsregime	1.48	0,323	4,59	**4,4e-6**	**4,4**	0,227	**2,34**	**8,28**

3.3.2.Die statistische Analyse der transplantationsassoziierten Mortalität (TRM)

Auch die kumulative Inzidenz der transplantationsassoziierten Mortalität wird in diesem Kollektiv weder durch die Kompatibilität der HLA-E Spender-/Empfängerpaare noch durch den HLA-E*01:03 homozygoten Trägerstatus positiv beeinflusst. In der HLA-E kompatiblen Gruppe macht die TRM 28,1% und in der inkompatiblen 29,7% aus. Hierfür ergibt sich ebenfalls keine Signifikanz (p=0,945). Siehe Tabelle 21.

Innerhalb der Gruppe der homozygoten HLA-E*01:03 Merkmalträger macht die TRM einen Anteil von 30,4% aus, während sie in der anderen Gruppe mit den übrigen Allelstatusvarianten 28,3% erreicht. Auch dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (P = 0,890). Im Überblick aus Tabelle 22 ersichtlich.

Tabelle 21 Ergebnisse der univariaten statistischen Analyse der kumulativen Inzidenzen der TRM in den Gruppen „HLA-E kompatibel" versus „HLA-E inkompatibel" aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit n=116.
CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, TRM transplantationsassoziierte Mortalität (engl. transplantat-related mortality).

Untersuchte Gruppe	**Zeitpunkt in Tagen**							
	Kumulative Inzidenz	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
HLA-E kompatibel TRM		0	0,281	0,281	0,281	0,281	0,281	**0,281**	-
HLA-E inkompatibel TRM		0	0,243	0,297	0,297	0,297	0,297	0,297	**0,297**
HLA-E kompatibel CR		0	0,22	0,247	0,247	0,263	0,303	**0,395**	-
HLA-E inkompatibel CR		0	0,270	0,324	0,351	0,351	0,387	0,387	**0,387**

Tabelle 22 Ergebnisse der univariaten statistischen Analyse der kumulativen Inzidenzen der TRM in den Gruppen „HLA-E*01:03 homozygote" versus „andere HLA-E-Träger" aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit n=116.
CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, TRM transplantationsassoziierte Mortalität (engl. transplantat-related mortality).

Untersuchte Gruppe	**Zeitpunkt in Tagen**							
	Kumulative Inzidenz		500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
HLA-E*01:03 Homozygote TRM		0	0,261	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	**0,304**
HLA-E Andere TRM		0	0,272	0,283	0,283	0,283	0,283	**0,283**	-
HLA-E*01:03 Homozygote CR		0	0,348	0,348	0,348	0,348	0,348	0,348	**0,348**
HLA-E Andere CR		0	0,208	0,253	0,265	0,278	0,328	**0,408**	-

Zur Veranschaulichung der Kumulativen Inzidenzen in den verschiedenen Gruppen dient die folgende Abbildung 14.

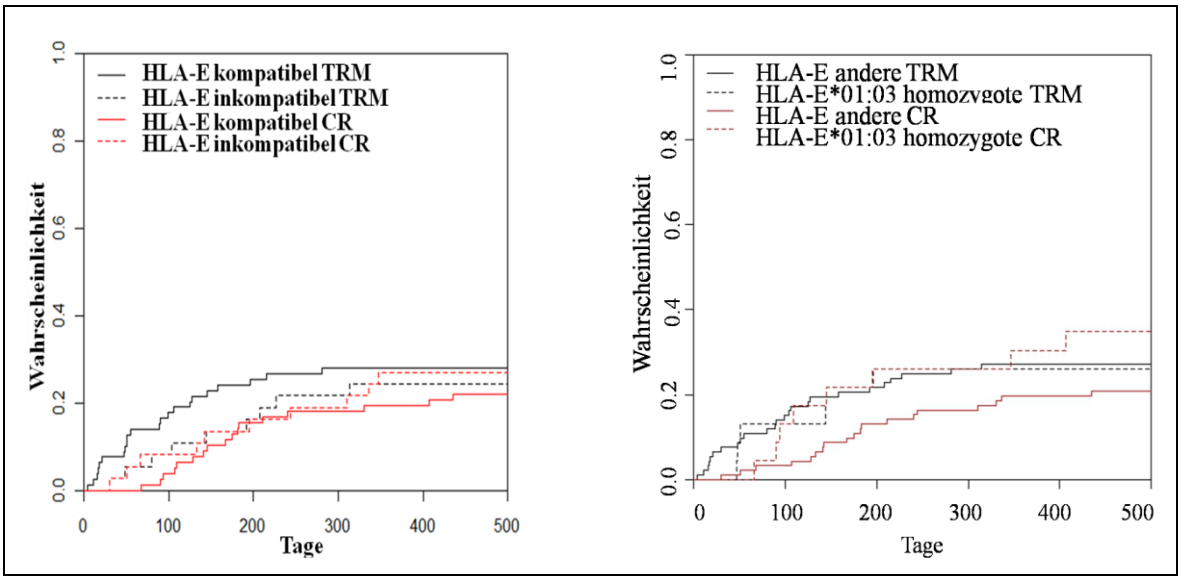

Abbildung 14 Kumulative Inzidenzkurven der univariaten statistischen Analyse der TRM für die Gruppen „HLA-E kompatibel“ vs. „inkompatibel“ (links) und die Gruppen „HLA-E*01:03 homozygote“ vs. „andere HLA-E-Träger“ (rechts) des hier untersuchten Multizenterkollektivs Stammzelltransplantierter mit n=116.
CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, TRM transplantationsassoziierte Mortalität (engl. transplantat-related mortality).

Desweiteren untersuchten wir den Einfluss homozygoter HLA-E*01:01 Spender auf die Inzidenz der TRM bei deren Empfängern in unserer Kohorte. In der univariaten Analyse ergab sich mit einem P-Wert von 0,506 kein signifikanter Unterschied. Die Inzidenz der TRM erreichte 32,4% in der Gruppe mit homozygoten HLA-E*01:01 Spendern und 27,3% in der Empfängergruppe mit Spendern anderer Allele. Hierzu siehe auch Tabelle 23.

Tabelle 23 Ergebnisse der univariaten statistischen Analyse der kumulativen Inzidenzen der TRM von den Gruppen „Empfänger HLA-E*01:01 homozygoter Spender“ versus „Empfänger anderer HLA-E Spender“ aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit n=116.
CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, TRM transplantationsassoziierte Mortalität (engl. transplantat-related mortality).

untersuchte Gruppe	**Zeitpunkt in Tagen**								
	Kumulative Inzidenz		500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
TRM mit HLA-E*01:01 homozygotem Spender		0	0,324	0,324	0,324	0,324	0,324	**0,324**	-
TRM mit HLA-E anderem Spendern		0	0,247	0,273	0,273	0,273	0,273	0,273	**0,273**
HLA-E*01:01 homozygote CR		0	0,177	0,206	0,235	0,235	0,269	**0,439**	-
HLA-E andere CR		0	0,261	0,3	0,3	0,316	0,358	0,358	**0,358**

Zur Veranschaulichung der Kumulativen Inzidenzen in diesen Gruppen dient die folgende Abbildung 15.

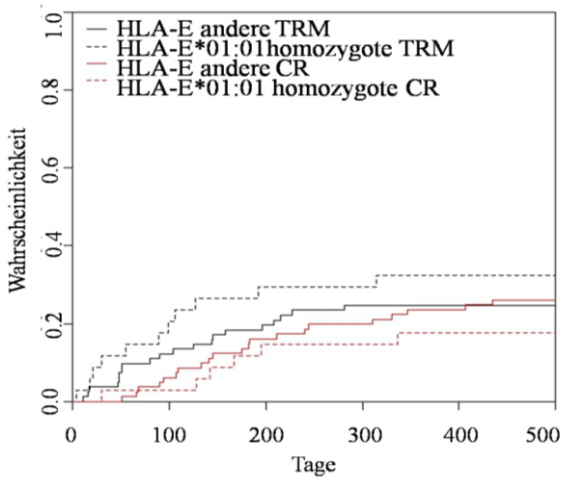

Abbildung 15 Kumulative Inzidenzkurven der univariaten statistischen Analyse der TRM von Empfängern HLA-E* 01:01 homozygoter Spender versus Empfänger anderer HLA-E Spender des hier untersuchten Multizenterkollektivs Stammzelltransplantierter mit n=116. *CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, TRM transplantationsassoziierte Mortalität (engl. transplantat-related mortality).*

In der multivariaten Analyse der TRM unter der Berücksichtigung folgender Kovariaten:

- „HLA-E-Status“,
- „Alter des Empfängers“,
- „Art der Transplantation“ (Knochenmarktransplantation oder PBSZT),
- „GvHD-Prophylaxe“ und
- „Konditionierungsregime“ (myeloablativ versus reduzierte Intensität)

konnte kein signifikanter Unterschied für die Inzidenz der TRM zwischen den Gruppen HLA-E kompatibel versus HLA-E inkompatibel bzw. HLA-E*01:03 homozygote versus HLA-E andere Träger bzw. HLA-E*01:01 homozygote versus andere HLA-E Träger nachgewiesen werden. Von den Kovariaten in diesem Kollektiv ergab sich lediglich für die „Art der Transplantation“ ein signifikanter P-Wert, jedoch lediglich in einem Modell in dem die Variablen „Alter des Empfängers“ und „Konditionierungsregime“ eingeschlossen blieben. Es errechnete sich ein P-Wert von 0,042. Dabei haben die Patienten nach einer PBSZT ein um den Faktor 2,358 größeres relatives Risiko für die Entwicklung der TRM als diejenigen nach KMT. Das 95% KI liegt dabei zwischen 1,032 und 5,39. Siehe Tabelle 24.

Tabelle 24 Ergebnisse der multivariaten statistischen Analyse der TRM Stammzelltransplantierter aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv mit n=116 nach schrittweisem Ausschluss nicht signifikanter Variablen mit P-Wert <0,05 [HLA-E Status, GVHD-Prophylaxe]. Bestes Modell ergibt sich mit Variablen: Alter des Empfängers, Art der Transplantation und Konditionierungsregime. *5% - 95% Konfidenzintervall, Coef geschätzter Regressionskoeffizient, se(coef) Standartabweichung des geschätzten Koeffizienten, GvHD (engl.) graft-versus-host disease, HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden, P-Wert Signifikanzniveau <0,05, RR Relatives Risiko, 2,5%-97, TRM (engl.) transplantat-related mortality. Z-Wert dient der Signifikanztestung zusätzlich zum P-Wert.*

multivariate TRM	Coef	Se (coef)	Z-Wert	P-Wert	RR	-RR	2,5%	97,5%
Alter des Empfängers	0,0167	0,0154	1,085	0,280	1,017	0,983	0,987	1,05
Art der Transplantation	0,8577	0,4217	2,034	**0,042**	**2,358**	0,424	**1,032**	**5,39**
Konditionierungs-Regime	-0,3766	0,4427	-0,851	0,390	0,686	1,457	0,288	1,63

3.3.3.Die statistische Analyse der akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD)

Für die kumulativen Inzidenzen der aGvHD ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen HLA-E kompatibel versus HLA-E inkompatibel. Der P-Wert ergibt 0,698, wobei die kumulative Inzidenz der aGvHD in der HLA-E kompatiblen Gruppe 42,3% erreicht und in der HLA-E inkompatiblen Gruppe 40,5% beträgt. Siehe hierzu Tabelle 25.

Innerhalb der Gruppe der homozygoten HLA-E*01:03 Merkmalträger macht die kumulative Inzidenz der aGvHD 45,5% aus, während die kumulative Inzidenz der aGvHD in der anderen untersuchten Gruppe mit den übrigen Allelstatusvarianten nur 40,7% erreicht. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch mit einem P-Wert von 0,607 nicht signifikant. Hierzu siehe auch Tabelle 26.

Tabelle 25 Ergebnisse der univariaten statistischen Analyse der kumulativen Inzidenzen der aGvHD in den Gruppen „HLA-E kompatibel“ versus „HLA-E inkompatibel“ aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit n=116. *aGvHD akute Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl. acute graft-versus-host disease), CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden.*

untersuchte Gruppe	**Zeitpunkt in Tagen**								
	Kumulative Inzidenz		500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
HLA-E kompatibel aGvHD		0	0,423	0,423	0,423	0,423	0,423	**0,423**	-
HLA-E inkompatibel aGvHD		0	0,405	0,405	0,405	0,405	0,405	**0,405**	-
HLA-E kompatibel CR		0	0,255	0,283	0,283	0,283	0,321	**0,358**	-
HLA-E inkompatibel CR		0	0,243	0,297	0,324	0,324	0,358	**0,358**	-

Tabelle 26 Ergebnisse der univariaten statistischen Analyse der kumulativen Inzidenzen der aGvHD in den Gruppen „ 01:03 homozygote HLA-E-„ versus andere „HLA-E-Träger“ aus dem hier untersuchten Multizenterkollektiv Stammzelltransplantierter mit n=116.
aGvHD akute Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl. acute graft-versus-host disease), CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E: Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden.

untersuchte Gruppe	**Zeitpunkt in Tagen**								
	Kumulative Inzidenz		500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
HLA-E*01:03 homozygote aGvHD		0	0,4545	0,4545	0,4545	0,4545	**0,4545**	-	-
HLA-E andere aGvHD		0	0,4071	0,4071	0,4071	0,4071	0,4071	**0,407**	-
HLA-E*01:03 homozygote CR		0	0,2273	0,2273	0,2273	0,2273	**0,2273**	-	-
HLA-E andere CR		0	0,2577	0,3039	0,3155	0,3155	0,3592	**0,388**	-

Zur Veranschaulichung der Kumulativen Inzidenzen in den verschiedenen Gruppen dient die folgende Abbildung 16.

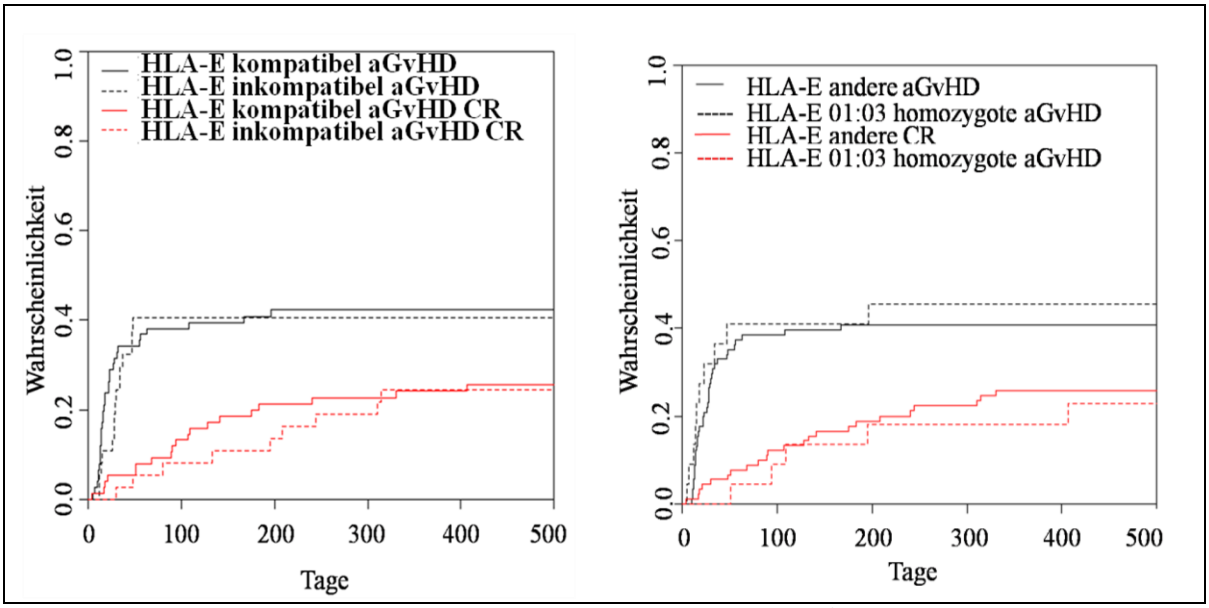

Abbildung 16 Kumulative Inzidenzkurven der univariaten statistischen Analyse der aGvHD für die Gruppen „HLA-E kompatibel“ vs. „inkompatibel“ (links) und die Gruppen „01:03 homozygote HLA-E-„ versus „andere HLA-E-Träger“ (rechts) des hier untersuchten Multizenterkollektivs Stammzelltransplantierter mit n=116.
aGvHD akute Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl. acute graft-versus-host disease), CR kompetitives Risiko (engl. Competitive Risk), HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, n Anzahl der Probanden.

In der multivariate Analyse der aGvHD wird deren Inzidenz vom „Alter des Patienten“ und „Art der Transplantation“ statistisch signifikant beeinflusst. Die übrigen Kovariaten:

- „HLA-E-Status“,
- „GvHD-Prophylaxe“ und
- „Konditionierungsregime“

erweisen sich statistisch als nicht signifikant. Für die signifikanten Variablen lassen sich in einem Modell nach schrittweisem Ausschluss aller nicht signifikanten Faktoren folgende

Parameter errechnen: für die Variable „Alter des Empfängers“ ein P-Wert von 0,014 und eine Zunahme des RR pro Lebensjahr um den Faktor 1,03 mit einem 95% KI zwischen 1,007 und 1,060 und für die Variable „Art der Transplantation“ ein P-Wert von 0,014 mit einem doppelt so großem RR eine aGvHD nach PBSTCT zu entwickeln als nach KMT. Das KI liegt dabei zwischen 1,1 und 3,65. Folgende Tabellen 27 dienen der Zusammenfassung der statistischen Analyse.

Tabelle 27 Ergebnisse der multivariaten statistischen Analyse der aGvHD Stammzelltransplantierter aus der hier durchgeführten Multizenterstudie mit n=116 nach schrittweisem Ausschluss nicht signifikanter Variablen mit einem P-Wert > 0,05 [HLA-E Status, GvHD-Prophylaxe, Konditionierungsregime]. Als signifikante Variablen errechnen sich: Alter des Empfängers, Art der Transplantation. *2,5%-97,5% 95% Konfidenzintervall, aGvHD (engl.) acute graft-versus-host disease, Coef geschätzter Regressionskoeffizient, HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, P-Wert Signifikanzniveau <0,05, RR Relatives Risiko, se(coef) Standartabweichung des geschätzten Koeffizienten, Z-Wert dient der Signifikanztestung zusätzlich zum P-Wert,.*

multivariate aGvHD	Coef	se(coef)	Z-Wert	P-Wert	RR	-RR	2,5%	97,5%
Alter des Empfängers	0,0322	0,0131	2,47	**0,014**	**1,03**	0,969	**1,007**	**1,060**
Art der Transplantation	0,6933	0,3063	2,26	**0,024**	**2,00**	0,5	**1,10**	**3,65**

3.4. Ergebnisse der Validierung der SSP-Methode

Für den HLA-E Status der IHWG-Referenzzellen ergaben sich die in Tabelle 28 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 28 Ergebnisse der IHWG-Referenzzellen im Rahmen der Validierung der SSP-Methode. *HLA-E Humanes Leukozyten Antigen E, IHWG International Histocompatibility Working Group, SSP Sequence specific priming.*

Proben-Identität	HLA-E PCR-SSP- bzw. Sequenzierungsergebnisse		Proben-Identität	HLA-E PCR-SSP- bzw. Sequenzierungsergebnisse	
IHW Nr.	Allel 1	Allel 2	IHW Nr.	Allel 1	Allel 2
9003	01:03	01:03	9058	01:03	01:03
9005	01:01	01:03	9062	01:03	01:03
9007	01:03	01:03	9070	01:03	01:03
9008	01:01	01:01	9075	01:01	01:01
9009	01:01	01:01	9079	01:01	01:01
9012	01:01	01:01	9080	01:03	01:03
9014	01:03	01:03	9085	01:03	01:03
9015	01:01	01:01	9092	01:01	01:01
9016	01:01	01:01	9105	01:01	01:01
9019	01:03	01:03	9106	01:01	01:01
9029	01:01	01:01	9107	01:01	01:01
9032	01:03	01:03	9108	01:03	01:03
9035	01:01	01:01	9141	01:03	01:03
9037	01:01	01:03	9215	01:01	01:03
9038	01:01	01:01	9219	01:03	01:03
9040	01:01	01:01	9267	01:03	01:03
9041	01:01	01:01	9300	01:01	01:03
9050	01:03	01:03	9380	01:01	01:03
9051	01:03	01:03	9382	01:01	01:03
9052	01:01	01:01	9460	01:01	01:01

Bewertung: Die Ergebnisse der PCR-SSP-Methode erreichten eine Übereinstimmung von 100% mit denen der Sequenzierung im Sequenzer.

4 DISKUSSION

4.1.Methodische Aspekte

4.1.1.Wie valide ist die HLA-E Typisierung mit der PCR-SSP Methode?

Zur Typisierung der HLA-Moleküle steht eine Reihe moderner molekulargenetischer Methoden zur Verfügung[201]. Die PCR stellt dabei die Grundlage sämtlicher gängiger HLA-Genotypisierungsmethoden wie z.B. der PCR-SSO (engl.: sequence-specific oligonucleotide) bzw. –SSOP (engl.: sequence-specific oligonucleotide probe), der PCR-SSP (engl.: sequence-specific priming) oder der PCR–SBT (engl.: sequence-based typing) dar[201].

Mit der PCR-SSP Methode, die die Genotypisierung mit Hilfe von Primeranalytik erlaubt, stand eine schnelle Einzelbestimmungsmethode zur Verfügung, die gleichzeitig eine unproblematische Interpretation der erhaltenen PCR-Amplifikatmuster zur Ermittlung des HLA-E-Genotyps gemäß des erwarteten Amplifikationsverhaltens der spezifischen Primerpaare für die bestimmten Allele ermöglichte[31,73]. Im Rahmen der HLA-E Typisierung wurde die PCR-SSP-Methode eingesetzt, um die einzelnen Allele des HLA-E und deren Häufigkeiten zu definieren, sowie um zu untersuchen ob HLA-E eine Rolle als Histokompatibilitätsantigen in der PBSZT spielt[73]. Das PCR-SSP Verfahren ist nicht geeignet, neue Allele zu detektieren. Mögliche Fehlerquellen dieses Verfahrens können in allen drei Teilschritten auftreten. So kann es bei der DNA-Isolierung zur Kontamination mit anderen DNA-Proben oder PCR-Produkten kommen oder zur Anwesenheit von Inhibitoren der DNA-Polymerase kommen. Auch während der PCR können Fehlpaarungen durch thermodynamisch relativ stabile Purin/Pyrimidin-Mismatches (A/C oder G/T) auftreten oder unspezifische (falsch-positive) bzw. ausbleibende (falsch-negative) Amplifikationsreaktionen durch unzureichende PCR-Zyklusbedingungen oder Pufferzusammensetzungen stattfinden. Darüber hinaus kann es zur fehlerhaften Interpretation der Ergebnisse durch identische Reaktionsmuster bei verschiedenen Allelkombinationen kommen. Desweiteren können Fehlklassifikationen (falsch-positiv, falsch-negativ) der Amplifikate auch dann auftreten, wenn die Banden unter mangelnder Reaktionsqualität nicht eindeutig beurteilbar sind[73]. Um sicher zu gehen, dass sich dieses Verfahren für die Typisierung des HLA-E eignet, wurde diese Methode zuerst mit Hilfe eines aus 40 DNA-Proben bestehendem Referenzpanels validiert und daraufhin wurden die Ergebnisse der hochauflösenden PCR-SSP-Methode mit denen der PCR-SBT-Methode verglichen. Die PCR-SBT, oder auch als direkte Sequenzierung nach Sangers

Didesoxy-Methode bezeichnet[179], stellt die Methode der Wahl zur hochauflösenden Genotypisierung im Rahmen der PBSZT dar[181,197]. Die PCR-SSP Methode wurde auch schon in anderen Publikationen zur HLA-E-Typisierung verwendet[44,73,199] und erreichte in der hier durchgeführten Validierung eine 100% Übereinstimmung.

4.2.Statistik

4.2.1.Warum Kaplan-Meier bzw. Cox-Regression?

Für die Ereigniszeitenanalyse (engl.: *survival analysis*) und bei der Suche nach prognostischen Faktoren für ein Ereignis bestehen etablierte statistische Standardmethoden[84]. Die Statistik für das OS bzw. die DFS wurde nach dem folgenden Prinzip durchgeführt:

- zuerst wurden univariate Überlebenskurven nichtparametrisch nach der KM-Methode geschätzt[93,103],
- mit Hilfe des Log-Rang Tests (engl.: *log rank test*) wurden dann mögliche Unterschiede zwischen diesen Kurven nachgewiesen[122],
- im letzten Schritt wurde eine multivariate Cox-Regressions-Analyse, auch als proportionales Hazard Modell bezeichnet, unter Einbeziehung unterschiedlicher Einflussfaktoren[35] durchgeführt[96,104].

Die Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der Zeit t nach Kaplan und Meier erfolgt nichtparametrisch, d.h. es werden keine Verteilungsannahmen getroffen. Einzige Voraussetzung an die Daten ist, dass die Beobachtungen unabhängig und identisch verteilt sind. Kovariaten bleiben unberücksichtigt. In dieser Analyse wurde die Kaplan-Meier Methode benutzt, da diese Methode gut verständlich und leicht zu berechnen ist[96].

Der Log-Rang-Test gehört ebenfalls zu den nichtparametrischen Verfahren und ist das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche[14,103]. Untersucht wird der Unterschied zwischen beobachtetem und erwartetem Ereignis, das der Basisidee der meisten so genannten $\chi 2$-Tests entspricht. Alternative Verfahren stellen der Mantel-Haenszel-Test, der generalisierte Wilcoxon-Test (engl.: *generalised Wilcoxontest*), auch Breslow-Test genannt, und der Tarone-Ware-Test dar, die analog zum Log-Rang-Test die Anzahl erwarteter und beobachteter Ereignisse zu jedem der Zeitpunkte miteinander vergleichen. Während jedoch der Log-Rang-Test alle Ereignisse gleich gewichtet, messen der generalisierte Wilcoxon-Test und der Tarone-Ware-Test die frühen Ereignisse stärker[104]. In dieser Analyse wurde vorranging der Log-Rang-Test benutzt, da die

Ereignisraten in den verschiedenen Gruppen dieser Analyse proportional zueinander waren. In solch einem Fall ist die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich vorhandenen Unterschied zu entdecken, beim Log-Rang-Test am größten. Die Frage, ob die Ereignisraten tatsächlich proportional zueinander sind, entspricht der Frage nach der Normalverteilungsannahme beim t-Test[108]. Einen schnellen Eindruck, ob die Proportionalitätsannahme erfüllt ist, erhält man durch die Kaplan-Meier Kurven[218]. Wenn diese sich kreuzen, ist eindeutig eine Abweichung von der Proportionalität gegeben. Somit stellt dieser nichtparametrisch univariate Ansatz eine einzige Voraussetzung an die Daten, nämlich: dass die Beobachtungen unabhängig und identisch verteilt sind. Nachteil der beschriebenen Verfahren ist, dass sich keine Hazardfunktionen schätzen lassen und damit einhergehend keine Hazard Ratios als Risikomaße berechnet werden können.

Für die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Einflussgrößen auf eine Zielvariable werden multifaktorielle Methoden benötigt[6,128,183]. Hier sollte das Cox-Modell nach Adjustierung mit unterschiedlichen Einflussgrößen des Regressionsmodells eine Schätzung des Effekts der HLA-E Polymorphismen auf das OS bzw. die DFS liefern. Die Cox-Analyse erlaubt es prognostische Kovariaten ausfindig zu machen, die entweder einzeln oder erst in einer bestimmten Kombination das Zielereignis beeinflussen können[183]. Komplementär zu der Überlebenswahrscheinlichkeit erlaubt dieses Modell den Hazard bzw. das unmittelbare Risiko in Hinblick auf den Tod (bzw. das Eintreten einer Erkrankung) zu schätzen, es gibt das Risiko pro Zeiteinheit für das Sterben (bzw. Eintreten einer Erkrankung) zu einem bestimmten Zeitpunkt t innerhalb eines kleinen Zeitintervalls wieder[219]. Zwar illustrieren die Hazardkurven die Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen, jedoch lässt sich aus ihnen im einzelnen nicht schließen wer und warum innerhalb einer Gruppe ein langes Überleben bzw. ein kurzes Überleben aufweist[35]. Entscheidend ist, dass diese semiparametrische Schätzmethode keine bestimmte Verteilungsannahmen für die Baseline-Hazardraten voraussetzt, sondern stattdessen davon ausgeht, dass die Effekte verschiedener Variablen auf das Überleben über die Zeit konstant sind[219]. Damit verschlechtert sich zwar die Prognosesicherheit des Modells, die Schätzung der Effekte bleibt jedoch valide[104]. Diese Proportionalität ist gleichzeitig auch eine Schwäche des Modells, denn es kann nur innerhalb des Zeitraums verwendet werden, in dem auch das relative Risiko tatsächlich konstant bleibt[219]. Ein weiteres Manko liegt darin, dass lediglich das relative Risiko angegeben wird und es somit nicht möglich ist eine absolute Schätzung bzw. eine Prognose darüber zu machen, ob ein

Patient eine gewisse Zeitspanne unter bestimmten gegebenen Bedingungen überleben wird[35].

4.2.2.Warum Kumulative Inzidenzen und Kompetitives Risiko?

Das Competing-Risks-Modell[187], das neben dem Mortality-Modell und dem Illness-Death-Modell[5], zu den Standard-Multistate-Modellen[6,85] gehört, beschreibt einen Prozess, an dessen Ende mehrere konkurrierende absorbierende Ereignisse stehen, von denen nur höchstens eines pro Individuum eintritt. Diese Umstände erfordern besondere Analysemethoden[5,85,128]. Die Cox Regression wurde daher lediglich zur Berechnung der Zielgrößen OS und der DFS eingesetzt, Parameter für die es galt, nur ein Ereignis, nämlich den Tod, unabhängig von dessen Ursache, zu untersuchen[187]. Mit der Annahme der Unabhängigkeit von Ereignissen und Zensierungen wird vorausgesetzt, dass die Hazardrate der Zensierten identisch ist mit der Hazardrate derjenigen Individuen, die im Follow-Up verbleiben. Gelten jedoch einige Individuen als zensiert, da sie vor dem Progress verstorben sind, so ist diese Unabhängigkeitsannahme verletzt[187]: Die Hazardraten der frühzeitig Verstorbenen müssten vielmehr als erhöht für das Ereignis der Progression angenommen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt, ist natürlich auch davon abhängig, wie sich der konkurrierende Prozess verhält. Je häufiger ein konkurrierendes Ereignis auftritt, desto weniger lassen sich die interessierenden Ereignisse beobachten[188]. Ignoriert man diese Tatsache und leitet kumulative Inzidenzen aus den ursachenspezifschen Hazards ab, so werden die kumulativen Ereigniswahrscheinlichkeiten überschätzt[96]. Aus diesem Grund eignet sich, weder die KM-Methode, noch die Cox-Regressionsanalyse für die Berechnung der Inzidenz von Rezidiven beim gleichzeitigen Auftreten von TRM, denn Fälle mit TRM würden zensiert, da Patienten, die in Folge von TRM versterben, nicht weiter dem Risiko für ein Rezidiv ausgesetzt sein können[35,122]. Diese beiden Ereignisse sind unter den Bedingungen der PBSZT nicht unabhängig voneinander, sondern Bestrebungen, die zu einer geringeren TRM führen, beeinflussen gleichzeitig das Risiko für ein Rezidiv[102]. Dies gilt auch für das Auftreten der aGvHD. Daher erfolgte die Analyse dieser konkurrierenden Ereignisse mit dem Modell nach J. Fine und R. Gray [57,58], welches sich auf die kumulative Inzidenz, also auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines bestimmten Ereignisses in einem definierten Zeitraum bezieht[187]. Hierbei handelt es sich um ein Cox-ähnliches semi-parametrisches proportionales Hazardmodel, das im Gegensatz zu anderen Regressionsmodellen zur Berechnung kompetitiver Risikoanalysen, den Effekt von Kovariaten auf die kumulative Inzidenzfunktion (engl.: *cumulative*

incidence function; CIF) über den sogenannten subdistributions Hazard berechnet. Das Modell von Fine und Gray[57] sollte angewendet werden, wenn es um die absoluten Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Ereignisse in einem bestimmten Zeitintervall geht.

4.2.3.Ausblick

Bei der Anwendung der in dieser Analyse geschilderten Methoden[41,93,122] nimmt man stillschweigend hin, dass die Altersstruktur der untersuchten Patientengruppen vergleichbar ist. Man geht davon aus, dass das natürliche, altersbedingte Sterben keinen verzerrenden Einfluss auf die Gruppen ausübt. Mit proportionalen Hazardmodellen ist es möglich den Alterseinfluss zu berücksichtigen und „herauszukorrigieren“[35,104]. Allerdings selbst wenn die dabei angenommenen Gesetzmäßigkeiten gültig wären, kann nur ein Teil des altersbedingten Unterschiedes zwischen den Patienten im Modell erfasst werden. Nimmt man z.B. das Alter als lineare Kovariable in das Modell mit auf, so wird angenommen, dass der Hazard mit dem Erkrankungsalter exponentiell zunimmt[41]. Diese Annahme trifft zwar für das natürliche Sterben des Lebensalters oft sehr gut zu[120], beschreibt jedoch damit einen Hazardunterschied zwischen den Patienten, der nur am Beginn der Erkrankung vorliegt und die weitere Zunahme des Hazards im Verlauf der Erkrankung bzw. Genesung nicht berücksichtigt[184]. Dieser Zielstellung dient die Methodik der relativen Überlebensraten und der Exzeßmortalität[50,51,53]. Eine weitere Alterskomponente, die bei der Analyse von Registerdaten aber auch von Daten klinischer Studien zu einem Bias führen kann, stellt das mit wachsendem Alter sich verändernde Potential des Organismus zur Krankheitsüberwindung dar[184,214]. Für manche Tumorentitäten kann sogar der Fall eintreten, dass mit zunehmendem Alter die Kompensationsmöglichkeiten des Organismus zwar schwächer werden, jedoch gleichzeitig auch die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors abnimmt[28,180]. Durch die Berechnung der relativen Überlebensraten wird dieser Sachverhalt allerdings nicht adäquat berücksichtigt[29]. Die relative Überlebensrate ist vielmehr eine Schätzung derjenigen Überlebensdauerverteilung, die sich bei Berücksichtigung des Tumors als einziger Todesursache ergäbe. Sie bezieht sich allein auf die Patientengruppe und nicht auf eine allgemein fassbare Population[76]. Das liegt daran, dass die von der Gesamthazardrate die mittlere natürliche Hazardrate der Patientengruppe abgezogen wurde und so allein die krankheitsbedingte Exzeßhazardrate übrig bleibt[76,162]. Dennoch eignet sich die relative Überlebensrate zum räumlichen und zeitlichen Vergleich mit anderen Krebsregisterdaten, wenn man von Vergleichbarkeit der Tumorentstehung bezüglich Alters- und Geschlechtsprofil der Erkrankten ausgeht[28].

4.3.Inhaltliche Aspekte

4.3.1.Welche Rolle spielt das HLA-E für das Outcome nach PBSZT?

Das Typisieren der HLA-Merkmale ist der ausschlaggebendste Faktor, wenn es um die Auswahl eines unverwandten Spenders im Rahmen der PBSZT geht[60]. Dabei wird das Outcome der PBSZT vom Kompatibilitätsgrad der HLA-Merkmale zwischen Spender und Empfänger bestimmt[149]. Ursprünglich wurden Spender- und Empfängerpaare lediglich für die Merkmale HLA-A, -B und-DR typisiert, da diese Loci am einfachsten zu identifizieren waren und am stärksten polymorph sind[38]. Mit der Entwicklung moderner Typisierungsmethoden konnte jedoch gezeigt werden, dass auch andere Loci wie z.B. HLA-C, -DQ oder-DP hochpolymorph sind und man fragte sich in wie fern diese in das Geschehen der PBSZT Komplikationen verwickelt seien[121]. Inkompatibilitäten dieser Merkmale zwischen Spender- und Empfängerpaaren waren mit vermehrtem Auftreten von GvHD vergesellschaftet[150,213]. Heute werden Spender- und Empfängerpaare 8/8 d.h. für HLA-A, -B, -C und –DRB1 oder 10/10 d.h. zusätzlich für –DQB1 gematcht[140]. Obwohl unverwandte Spender- und Empfängerpaare für dieselben HLA-Merkmale typisiert werden wie Geschwisterpaare bei einer Verwandten-PBSZT stellt die GvHD die gefürchtetste Komplikation v.a. der unverwandten PBSZT dar und tritt bei der PBSZT von Geschwisterpaaren deutlich seltener auf[7,38]. Auf der Suche nach dem besten unverwandten „Match“ muss man demnach noch weitere transplantationsrelevante Merkmale ausfindig machen. Warum das HLA-E ein solches in Zukunft zu typisierendes Merkmal darstellen könnte, erläutern folgende Überlegungen:

Im Gegensatz zu den oben genannten klassischen MHC-Ia Molekülen sind die nichtklassischen MHC-Ib Moleküle, wie in der Einleitung schon erwähnt, nur sehr wenig polymorph. Das humane HLA-E ist dabei sogar das am wenigsten Polymorphe[73]. So werden derzeit im wesentlichen nur zwei Allelgruppen voneinander unterschieden, das HLA-E*01:01 und HLA-E*01:03, die sich lediglich in einer Aminosäure unterscheiden[73]. Vernachlässigbar sind die zuvor in der Einleitung erwähnten Allelvarianten HLA-E*01:04 und HLA-E*01:02. Bei dem HLA-E*01:04 handelt es sich um ein extrem seltenes Allel, das vor allem in der asiatischen Population aufzutreten scheint (4,5%), während die Existenz von HLA-E*01:02 angezweifelt wird[73]. Diese Aussagen lassen sich durch das hier untersuchte Kollektiv ebenfalls bestätigen. Zusätzlich ist die Expression der MHC-Ib Moleküle auf Oberflächen von Gewebszellen im Allgemeinen deutlich geringer ausgeprägt als die der MHC-Ia Moleküle[111,212]. Das HLA-E nimmt jedoch dabei eine Sonderstellung in der Gruppe der HLA-Ib Moleküle ein,

denn es wird nahezu ubiquitär auf Zellen exprimiert[212]. Zwar ist diese Expression im Vergleich zu den bisher als transplantationsrelevanten identifizierten Molekülen, den MHC Ia Molekülen, schwächer ausgeprägt[111], es liegt jedoch nahe solch eine ubiquitäre Expression eines MHC-Moleküls als transplantationsrelevantes Oberflächenmerkmal zu verdächtigen.

Dass die HLA-E Expression einen Einfluss auf das Outcome von PBSZT haben soll, konnte in einigen bisher erschienenen Publikationen gezeigt werden[44,198,199]. Dabei soll jedoch nicht die Kompatibilität des HLA-E Merkmals zwischen Spender und Empfänger die entscheidende Rolle spielen, sondern die unterschiedlich starke Expression der beiden HLA-E Allelvarianten HLA-E*01:01 und HLA-E*01:03[206]. Dieser Aspekt wird im Einzelnen in dem Abschnitt „Schlussfolgerung“ eingehend diskutiert.

4.3.2.Sind HLA-E*01:01 homozygote Spender eine Gefahr für ihren Empfänger?

Erste Effekte der HLA-E-Polymorphismen auf das Outcome von Stammzelltransplantationen werden von Tamouza et al. 2005 beschrieben[198]. Sie können ein häufigeres Auftreten von bakteriellen Infektionen bei den Empfängern homozygoter HLA-E*01:01 Spender (n=77) nachweisen und führen die in dieser Gruppe ebenfalls erhöhte TRM auf diesen HLA-E Polymorphismus zurück[198].

Da dem in dieser Analyse verwendetem Datenregister keine Angaben über bakteriellen Infektionen bei den Patienten zu entnehmen waren, konnte dieser Parameter auch nicht direkt analysiert werden[63]. Stellvertretend wurde in der hier untersuchten Studie die TRM bei den Empfängern von homozygoten HLA-E*01:01 Spendern analysiert, da eine signifikante Erhöhung der TRM in dieser Gruppe einen indirekten Rückschluss auf die Inzidenz bakterieller Infektionen erlaubt hätte. In diesem Kollektiv konnte jedoch weder mit der univariaten noch mit der multivariaten Analyse eine Beeinflussung der Inzidenz der TRM beim Empfänger durch den homozygoten HLA-E*01:01-Status des Spenders nachgewiesen werden.

Auch wenn das hier untersuchte Kollektiv im Vergleich zum Kollektiv von Tamouza et al. 2005 eine größere Patientenzahl aufweist[198], könnte eine Abweichung von deren Ergebnis dadurch erklärt werden, dass deren Patienten und Datenregister aus einem einzigen Transplantationszentrum stammen, während die hier verwendeten Patientendaten und Proben hingegen aus neun unterschiedlichen Zentren stammen. Durch den „Zentrumseffekt“ bei Tamouza et al. 2005 könnte die Genetik stärker zum Tragen kommen, da deren Therapie uniform ist. In unserer Studie mit „Multizentercharakter“

werden die genetischen Einflüsse hingegen möglicherweise durch Unterschiede zentrumsspezifischer Vorgehensweisen in der Konditionierung und in den supportiven Therapiemaßnahmen abgeschwächt[63]. Insgesamt muss man davon ausgehen, falls hier ein Effekt besteht, dass dieser eher gering sein dürfte und nur durch deutlich höhere Fallzahlen statistisch erfassbar sein wird. Zusätzlich könnten Unterschiede in der TRM Inzidenz bei der Kohorte von Tamouza et al. 2005 auch dadurch beeinflusst worden sein, dass die Empfänger ausschließlich Knochenmark als Stammzellquelle erhielten, von dem bekannt ist, dass es eine längere Engraftmentdauer aufweist und dadurch in dieser Zeitspanne eine erhöhte Infektanfälligkeit resultiert[39,63,119].

4.3.3.HLA-E*01:03 Homozygotie des Patienten als Schutz vor TRM und aGvHD?

In einer anderen Studie zeigt Tamouza et al. 2006, dass der homozygote HLA-E*01:03 Status des Patienten Schutz vor aGvHD bietet und das Auftreten von TRM senkt[199].

In der hier durchgeführten Analyse ließ sich dieser positive Einfluss des homozygoten HLA-E*01:03 Status auf die Inzidenz der aGvHD nicht nachweisen. Bei Tamouza et al. 2006 ist dies zwar an HLA-identischen verwandten Transplantationspaaren untersucht worden, dennoch können solche Einflüsse auch bei unverwandter allogener Stammzelltransplantation eine wichtige Rolle spielen. So ist z.B. denkbar, dass bei HLA-inkompatiblen Transplantationen positive oder negative Effekte sogar noch stärker ausgeprägt auftreten, weil hierbei von einem höheren Aktivierungsgrad der NK-Zellen ausgegangen werden muss und inhibitorische Effekte sich stärker niederschlagen könnten.

Im Gegensatz zum Kollektiv aus dieser Analyse, stammen die Patienten des Kollektivs von Tamouza et al. 2006 abermals aus einem einzelnen Transplantationszentrum[199], d.h. auch hier könnte sich der oben genannte „Zentrumseffekt“ wieder deutlich machen. Andererseits wäre aber auch vorstellbar, dass bei Patienten aus einem einzelnen Zentrum die Homogenität des Kollektivs eher gewährleistet wird und dadurch einzelne kleinere Effekte besser detektiert werden könnten.

Zusätzlich machen bei Tamouza et al 2006 Kinder mit 22% einen großen und signifikanten Anteil am Gesamtkollektiv aus. Diese wiesen zum Zeitpunkt der Transplantation tendenziell ein früheres Erkrankungsstadium (76%) und somit eine bessere Prognose auf, und konnten daher auch mit milderen Konditionierungsschemata (55%) behandelt werden. Um diesem möglicherweise auftretendem Bias auszuweichen wurden Kinder, wie oben schon erwähnt, von vornherein aus dem hier untersuchten Kollektiv ausgeschlossen.

Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen dieser Studie und denen von Tamouza et al. 2006 lassen sich somit durch zwei wesentliche Unterschiede der Kollektive erklären: einerseits durch den Aus- bzw. Einschluss von Kindern aus dem bzw. in das jeweilige Kollektiv und andererseits dadurch, dass es sich bei den hier analysierten Transplantationen überwiegend um nichtverwandte allogene Spender- und Empfängerpaare handelt, während Tamouza et al. 2006 die Analyse von 187 HLA-identischen verwandten Transplantationspaaren vornahmen, die von vornherein eine bessere Prognose aufweisen.

Desweiteren weist das in dieser Analyse untersuchte Kollektiv einen größeren Anteil an Patienten mit myeloablativer Konditionierung (77,6%) auf, während bei Tamouza et al 2006 die Patienten überwiegend (55%) eine Konditionierung „geringerer Intensität“ erhielten und gleichzeitig auch in früheren Krankheitsstadien (76%) therapiert wurden[199]. Das bedeutet, dass sich die Patienten des hier untersuchten Kollektivs einer aggressiveren Therapie unterzogen, die im Allgemeinen mit höheren Komplikationsraten einhergeht. Dosisreduzierte Konditionierung geht mit erhöhtem Risiko für aGvHD einher[147] und somit könnte die erhöhte Inzidenz der aGvHD bei den für das HLA-E*01:03 nicht homozygoten Patienten auch auf die Art der Konditionierung zurückzuführen sein und nicht durch den HLA-E Status bedingt worden sein.

In der Zusammenschau lassen sich somit die Ergebnisse aus der Studie von Tamouza et al. 2006 nur begrenzt übertragen.

Auch Danzer et al. 2009 stellt für homozygote HLA-E*01:03 Patienten (n=83) fest, dass diese im Vergleich zu den Patienten mit Spendern anderer Allelkombinationen ein besseres Gesamtüberleben, eine längere DFS und eine niedrigere TRM aufwiesen[44]. Keine dieser Beobachtungen konnte in dem hier untersuchten Kollektiv mit größerer Fallzahl nachgewiesen werden.

Zwar ist das Kollektiv von Danzer et al. 2009 in Bezug auf die Diagnosen und die Stammzellquelle homogen. Bei den Spender-/Empfängerpaaren handelt es sich jedoch nur teilweise um nichtverwandte Paare, so dass dadurch die Vergleichbarkeit der beiden Kollektive eingeschränkt wird. Da verwandte allogene Stammzelltransplantationen ein besseres Outcome haben als unverwandte wäre es denkbar[164], dass das verlängerte Gesamtüberleben, das längere DFS und die niedrigere TRM der homozygoten HLA-E* 01:03 Patienten bei Danzer et al. 2009 auf diesem Effekt der verwandten allogenen Stammzelltransplantation beruhen, wenn diese Gruppe einen signifikanten Anteil an verwandten Beteiligten aufweist. Desweiteren fanden die untersuchten Transplantationen

innerhalb einer sehr großen Zeitspanne, nämlich von 1995 bis 2007 statt[44]. Dies führt zu Unterschieden im Follow-Up und in der Art der Therapiemaßnahmen innerhalb der verschiedenen Zeiträume der einzelnen Kollektive[63]. Seit 1995 haben sich nicht nur die Therapieoptionen, sondern auch die Spenderauswahlkriterien stark verändert. Bei einer eher geringen Patientenzahl könnten sich diese Effekte stärker auswirken.

4.3.4.HLA-E-Polymorphismus: Doch kein Einfluss auf das Outcome?

Analog zu den Ergebnissen dieser Analyse kann auch in der Veröffentlichung von Ludajic et al. 2009 keine Beeinflussung der Endpunkte durch die HLA-E Allele in der Überlebensanalyse festgestellt werden[119].

Deren Kollektiv umfasst 124 erwachsene Patienten. Zwar können sie bei Empfängern mit homozygotem HLA-E*01:03 Status ein geringeres Auftreten sowohl der aGvHD, als auch der cGvHD nachweisen, jedoch treten bei diesen Patienten im Gegenzug dazu auch gleichzeitig Rezidive und TRM häufiger auf. Diese Ergebnisse stammen dabei aus der multivariaten Regressionsanalyse. Die einzelnen Patientencharakteristika ihrer Studie werden nicht detailliert aufgeführt. Aus den Daten wird jedoch ersichtlich, dass es sich auch hier -ähnlich wie bei Danzer et al. 2009- um Transplantationsdaten aus den Jahren 1995 bis 2005 handelt und daraus eben auf eine gewisse Heterogenität in den Behandlungsstrategien und den supportiven Therapiemaßnahmen zu schließen ist.

Um tatsächlich Effekte auf das Outcome im Rahmen der PBSZT dem HLA-E zuschreiben zu können, müssen vorerst noch andere zum Teil auch bisher unbekannte Faktoren, die ebenfalls im Verdacht stehen, das Outcome der PBSZT beeinflussen zu können, eindeutig definiert und in die Analyse mit einbezogen werden. Solch einen Faktor soll z.B. das MICA-Antigensystem darstellen. Das MICA codiert, wie in der Einleitung schon erwähnt, für das hochpolymorphe MHC class I chain-related gene A und das Proteinprodukt wird im Gegensatz zu den klassischen MHC-I Molekülen nicht in Assoziation mit der ß2-Mikroglobulinkette auf der Zelloberfläche exprimiert[8,115]. Es handelt es sich dabei um ein stressinduziertes Antigen, dass von NK-Zellen und den meisten T-Zell Subtypen erkannt wird[115]. Die MICA-Gene sind Liganden des aktivierenden CD94/NKG2D NK-Zellrezeptors[193]. Der ausgeprägte Polymorphismus in diesem Gen (derzeit sind 80 Allele bekannt) könnte aufgrund unterschiedlicher Bindungsaffinität zum korrespondierenden Rezeptor den Aktivierungsgrad von NK-Zellen beeinflussen und hierdurch das Ausmaß von GvHD und GvL mitbestimmen. Die Rolle des MICA im Rahmen von Stammzelltransplantationen wurde erstmals in einer kleinen Studie aus

Thailand untersucht[99]. Dabei wurden 44 Spender/Empfängerpaare analysiert und für diese konnte ein signifikanter ($p<0.05$) Überlebensvorteil nachgewiesen werden, wenn zusätzlich zu klassischen HLA-Merkmalen auch die MICA Gene kompatibel waren[99]. Diese Erkenntnisse wurden in der Studie von S. Parmar et al. erneut aufgegriffen und auf die Endpunkte Relapse, TRM und aGvHD untersucht. Sie konnten an einem Kollektiv aus 236 unverwandten Stammzelltransplantierten zeigen, dass die Inkompatibilität der MICA-Gene in Richtung GvH mit einer signifikanten Steigerung der GvHD Grad II-IV einhergeht[147]. Auch diese Erkenntnisse sollten allerdings an einer größeren Kohorte überprüft werden.

4.3.5.Limitationen

In bisher erschienenen Publikationen gab es gegensätzliche Hypothesen zum Einfluss von HLA-E auf die Ergebnisse der Therapie durch Stammzelltransplantation[44,119,199]. Die Motivation dieser Analyse bestand darin die diskrepante Datenlage in Bezug auf den Einfluss von HLA-E im Rahmen der Stammzelltransplantation zu analysieren. Das hier untersuchte Kollektiv erreichte trotz mehrerer Ausschlusskriterien eine Anzahl an Spender-/Empfängerpaaren, die größer ist als die meisten bisher zu diesem Thema Analysierten[44,199].

Ein Ausschlusskriterium waren HLA-A, -B, -C, -DR, und HLA-DQ nichtkompatible Spender-und Empfängerpaare, da man von diesen HLA-Merkmalen weiß, dass sie das Outcome einer Transplantation stark beeinflussen[2,72] und somit mögliche Unterschiede in den untersuchten Gruppen der Analyse nicht mehr eindeutig auf das HLA-E Merkmal zurückzuführen wären.

Ein weiteres Ausschlusskriterium für das hier analysierte Kollektiv war der Status Kind (Alter unter 18 Jahren) bei den Empfängern, da sich bei Kinder im Allgemeinen sowohl andere Häufigkeiten der einzelnen auftretenden Diagnosen als auch andere Verläufe der jeweiligen Tumorerkrankungen verzeichnen lassen[68]. Desweiteren ist das Ansprechen der Kinder auf die Therapien und die supportiven bzw. begleitenden Therapiemaßnahmen von dem der Erwachsenen zu unterscheiden.

Das hier untersuchte Kollektiv mit seinen letztlich 116 gültigen Spender-Empfängerpaaren ist zwar für eine abschließende Beurteilung der Rolle der HLA-E Polymorphismen im Rahmen der Stammzelltransplantation zu klein, jedoch im Vergleich zu den bisher analysierten Kollektiven der vorherigen Publikationen größer als die meisten [44,198,199] und somit in der Gesamtschau informativ.

Ein weiteres Problem in der Auswertung der Ergebnisse dieser und der anderen bisher untersuchten Studien zu diesem Thema wird unter anderem durch Unterschiede in den Charakteristika der einzelnen Kollektive, aber auch allein schon durch die Natur der retrospektiven Analyse verkörpert[104,105]. Speziell in diesem Fall führt die retrospektive Analyse der gesammelten Daten unter anderem nämlich dazu, dass es Patienten innerhalb der Kollektive gibt, die nicht durch die hochauflösende HLA-Sequenzierung typisiert wurden, da diese zum Zeitpunkt der Transplantation nicht als Standardverfahren zur Verfügung stand. Retrospektiv kommt es so zu einer Unterrepräsentation seltener HLA-Haplotypen, da diese rückblickend eine höhere Wahrscheinlichkeit für Mismatche haben[68,113]. Daraus lässt sich erschließen, dass diese Art der Analyse nicht die tatsächliche klinische Situation widerspiegelt, denn bei solch einer Selektion weisen Patient und Spender häufiger kompatible, sogenannte konservierte HLA-Haplotypen auf, die an noch mehr als den getesteten Loci kompatibel sein dürfen, im Vergleich zu solchen in denen diese Situation nicht vorliegt. Diese Patienten sind also sozusagen „supergematcht“. Dieser Effekt könnte sich durchaus auf das klinische Outcome der PBSZT auswirken. Da nun schon seit einigen Jahren die hochauflösende Sequenzanalyse der HLA-Haplotypen eingeführt wurde und die Gesamtzahl an Transplantationen stetig zunimmt, liegt es nahe, dass in Zukunft größere und in sich geschlossene Patientenkollektive zur Analyse zur Verfügung stehen werden[63], die die Rolle des HLA-E in Bezug auf die Stammzelltransplantation endgültig klären können.

Auch wenn im Allgemeinen multizentrische Studien eine höhere wissenschaftliche Aussagekraft im Vergleich zu „Single-center“-Studien haben, ist dies auf unserer Studie nicht direkt übertragbar. Eine multizentrische Studie kann dem sogenannten „Zentrumseffekt“ der Singlecenterstudie entgegen wirken, wenn ihre Teilnehmerzahl ausreichend hoch ist. In unserem Fall jedoch wird die Aussagekraft unserer multizentrischen Studie durch die geringe Patientenzahl eher limitiert. Hier ist der Zentrumseffekt erwünscht, denn durch die daraus resultierende uniforme Therapie kommt die Genetik stärker zum Tragen. Im Umkehrschluss kann man allerdings auch sagen, dass spezielle Ergebnisse, die an Kollektiven mit individuellen Charakteristika erzielt wurden, nicht auf die Stammzelltransplantation im Gesamten übertragen werden können. Ein Vorteil von multizentrischen Studien ist nämlich, dass Zentrumseffekte herausgemittelt werden.

Eine weitere Möglichkeit Unterschiede in den Kollektiven zu verringern könnte die getrennte Untersuchung von Patienten nach KMT bzw. PBSZT bieten[15,39]. Diese

unterschiedlichen Verfahren führen auch zu unterschiedlichen Verläufen. Durch die PBSZT kommt es zur schnelleren Rekonstitution der hämatopoetischen Zellen und daraus resultiert ein geringeres Potential für den Relapse der Grunderkrankung[89]. Da das periphere Blut mehr Progenitorzellen und Lymphozyten enthält, kann es dadurch zu einem verbesserten Engraftment bzw. GvL Effekt kommen und gleichzeitig aber auch zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer GvHD[89]. Die GvL Reaktion soll sogar durch die gezielte Auswahl von Spendern, die ein KIR Repertoire aufweisen, von dem für die inhibierenden Rezeptoren ein oder mehrere Liganden im Empfänger fehlen, durch das iatrogene Erzeugen sogenannter KIR Alloreaktivität, verstärkt und therapeutisch genutzt werden[177]. Allerdings ist dieser Ansatz umstritten und die KIR-Rezeptoren scheinen nicht allein für den GvL-Effekt verantwortlich zu sein. Das erhöhte Risiko für die Entwicklung einer GvHD bei Patienten mit PBSZT wird auf die Vorbehandlung mit G-CSF, welches bevorzugt ein Typ 2 Zytokinprofil bestehend aus IL-4, -5 und -6 in T-Helferzellen induziert und eine erhöhte Zahl an T.Lymphozyten im Stammzelltransplantat zurückgeführt[107]. Gleichzeitig soll die PBSZT einem Rezidiv präventiv vorbeugen[42].

In Experimenten mit Mäusen lässt sich die Pathogenese der GvHD auf eine abnormale Selektion von T-Zellen im Thymus zurückführen. Das Versagen der negativen Selektion im Thymus könnte eine Erklärung dafür sein, dass T-Zellen entstehen, die Spender- bzw. Empfängerantigene erkennen und zu klinischen Manifestationen führen, die denen von Autoimmunerkrankungen ähneln[148]. Auch die NK-Zellen werden in einem Prozess, den man im Englischen als Licensing bezeichnet, im Thymus dazu befähigt körpereigene Strukturen zu tolerieren[216]. Wie in der Einleitung schon erwähnt, exprimieren sie an ihrer Oberfläche inhibitorische Rezeptoren, die durch Bindung an körpereigene MHC-Klasse-I Moleküle die Aktivierung der NK-Zelle verhindern[97]. Wird dieses Licensing gestört, kommt es zur Autoreaktivität. Unter diesem Aspekt kann man sich vorstellen, dass auch die NK-Zellen die GvHD beeinflussen können, zumal sie für ihre Aktivierung bei der Reifung von T-Zellen abhängen[56].

Unreife NK-Zellen weisen nach einer PBSZT eine veränderte Expression der Rezeptoren an ihrer Oberfläche auf. Es überwiegt der CD94/NKG2A Rezeptor, der durch Bindung an HLA-E die Autoreaktivität verhindert und möglicherweise ein Ausbleiben der GvL Reaktion bedingt[97]. Deswegen ist es durchaus denkbar, dass durch Matche oder Mismatche von HLA-E bei Spender-/Empfängerpaaren, das Auftreten der GvHD bzw. der TRM beeinflusst wird. Warum die NK-Zellen nach der PBSZT vorerst unreif bleiben ist nicht geklärt[139]. Dies könnte auf den Untergang der Stromazellen im Knochenmark nach

intensiver Konditionierung mit TBI und nach myeloablativen Behandlungen zurückführen zu sein, da diese für die Reifung der NK-Zellen essentiell sind[175]. Desweiteren stellt die geringe Anzahl an T-Zellen, wie eben schon erwähnt, sicher ebenfalls einen entscheidenden Faktor für die gestörte Reifung der NK-Zellen nach PBSZT dar. So konnte gezeigt werden, dass im gesunden Spender vornehmlich die $CD3^{-}CD56^{bright}$ NK-Zellen auftreten und durch die T-Zellen im peripheren Lymphknoten aktiviert werden[56]. Diese Aktivierung fehlt bei T-Zell depletierter PBSZT zunächst.

Im Kollektiv dieser Studie wurde lediglich die TRM signifikant durch die Art des Transplantats, d.h. PBSZT versus KMT (P-Wert <0,05), beeinflusst. Dieser Effekt ist in unserer Analyse jedoch am ehesten auf folgende zwei Faktoren zurückzuführen: 1. Die durch PBSZT transplantierten Patienten (Mittelwert: 40,8 Jahre) waren im Schnitt etwas älter als die Patienten (Mittelwert 38,8 Jahre), die durch KMT behandelt wurden, 2. PBSC transplantierte Patienten hatten eher schwerere Erkrankungen bzw. Erkrankungen in weiter fortgeschritten Stadien. Darüber hinaus könnte man sich auch vorstellen, dass die behandelnden Kliniker bei schlechter Prognose bzw. höherem Rezidivrisiko eher zu einer PBSZT gegriffen haben. Letzteres lässt sich anhand der Daten jedoch nicht beweisen und ist spekulativ. Im Allgemeinen kann der Sachverhalt über den möglicherweise signifikanten Einfluss der Art des Transplantats auf die Ergebnisse eines Follow-Ups nach dem Stand heutiger Studiendaten nicht eindeutig geklärt werden.

4.3.6.Schlussfolgerung

Nicht nur durch seine ubiquitäre Expression als Oberflächenmerkmal könnte das HLA-E einen bedeutenden Einfluss auf das Outcome der PBSZT haben, sondern auch durch seine breitgefächerte Funktion im Immunsystem, die sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität betrifft[195].

Als Ligand des CD94/NKG2 Rezeptors der NK-Zellen reguliert das HLA-E deren Aktivität und ist somit Teil der angeborenen Immunität[152]. Es gibt Studien, die eine verschlechterte Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen im Rahmen der allogenen PBSZT beobachtet haben und dies auf eben genau diese Interaktion zwischen NK-Zellen und dem HLA-E zurückführen[139]. Auf diese Weise könnte das HLA-E im Rahmen der GvL, die die Möglichkeit bietet die Rezidivrate einer malignen Erkrankung zu vermindern[139], eine wichtige Rolle bezüglich des Outcomes der PBSZT spielen. Dieser GvL Effekt wird zwar maßgeblich durch T-Zellen vermittelt, theoretisch ist allerdings auch vorstellbar, dass GvL zusätzlich durch die NK-Zellen bedingt wird, denn diese differenzieren nämlich

schon innerhalb der ersten 2-3 Wochen nach PBSZT, während die T-Zellen erst nach Monaten zum ersten Mal erscheinen[92]. Ein möglicher Mechanismus auf dem der GvL Effekt beruhen könnte, stellt die Inkompatibilität zwischen KIR-Rezeptor der Spender-NK-Zellen und dem fehlenden inhibitorischen KIR-Liganden des Empfängers dar, was zur Aktivierung der NK-Zellen gegenüber noch vorhandenen Tumorzellen führen soll [65,176]. Die Datenlage dazu ist jedoch diskrepant und es gibt Studien, in denen für KIR inkompatiblen Spender-/Empfängerpaare ein schlechteres Outcome berichtet wird[18]. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die ersten sich erholenden NK-Zellen nach PBSZT sich als eine spezielle, unreife Form mit einem veränderten Rezeptorstatus präsentieren[139], und diese NK-Zellen kaum KIR auf deren Oberfläche exprimieren, sondern überwiegend den inhibitorischen NKG/2A Rezeptoren. Über diesen Rezeptor können passende HLA-E Moleküle inhibitorische Signale an die NK-Zelle vermitteln und auf diese Weise könnten sie den durch die KIR Inkompatibilität vermittelten GvL Effekt stark abschwächen[139]. In unserer Studie konnten wir jedoch keine erhöhte Relapsrate und somit auch keine verschlechterte GvL in Abhängigkeit vom HLA-E Status feststellen. Dennoch spricht folgende Beobachtung auch dafür, dass das HLA-E zu einer verschlechterten Lyse von Tumorzellen führen könnte: im Rahmen der autologen PBSZT konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen die Lyse durch NK-Zellen umgehen, indem sie körpereigene HLA-Merkmale an ihrer Oberfläche exprimieren, die von den NK-Zellen als körpereigen erkannt werden[161] und dabei eine ungewöhnlich hohe Expression von HLA-E, vermutlich zur Umgehung der immunologischen Abwehr, aufweisen[47,132].

Während die Funktion des HLA-E in der angeborenen Immunität als Ligand des CD94/NKG2 Rezeptors[27], der überwiegend auf NK-Zellen[152] aber auch auf einigen Subpopulationen der CTLs exprimiert wird[26], schon längerfristig gut bekannt ist, konnten aktuelle Studien zeigen, dass HLA-E auch in der erworbenen Immunität, ähnlich den klassischen MHC-Ia Molekülen[19,169], durch $\alpha\beta$ TCR-vermittelte Antigenpräsentation von Bakterien und Viren eine wichtige Rolle spielt[114,170]. Am Beispiel von *Mycobacterium tuberculosis* und *Salmonella enterica* serovar Typhi GroEL konnte gezeigt werde, dass HLA-E in der Lage ist, bakterielle Peptidfragmente „professionell“ über den jeweiligen HLA-E/Peptid restringierten TCR CD8+ T-Zellen zu präsentieren[75,178]. Anhand dieser Tatsache könnte man sich vorstellen, dass unterschiedliche HLA-E Allele Unterschiede in der Antigenpräsentation bedingen. Und so gibt es Studien die zeigen konnten, dass z.B. Empfänger von homozygoten HLA-E*01:01 Spendern nach PBSZT eine erhöhte TRM aufwiesen, die sie auf bakterielle Infektionen

zurückführten[198]. In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied in der TRM der miteinander verglichenen Gruppen festgestellt werden.

Auch bezüglich der Abwehr viraler Erreger konnte gezeigt werden, dass die HLA-E-restringierte $CD8^+$ T-Zell-Subpopulation eine signifikante Komponente der adaptiven Immunantwort speziell auf die CMV-Infektion ausmacht[126,173]. In der hier vorliegenden Studie gab es keine Daten zu den CMV-Infektionsraten des Studienkollektivs, dennoch hätte man auch hier indirekt über die Beeinflussung der TRM in den verschiedenen HLA-E Gruppen des Kollektivs einen Rückschluss ziehen können. Da die CMV Infektion eine häufige und gleichzeitig gefürchtete Komplikation nach PBSZT darstellt und gezeigt werden konnte[54,110], dass das HLA-E nicht nur an der adaptiven Immunabwehr gegen das CMV beteiligt ist[154,173], sondern dass sich aus der Kombination „CMV und spezieller HLA-E Status“ sogar eine ganz besondere Bedrohung im Rahmen der Transplantation ergeben soll[126,135], wird an dieser Stelle auf diesen Mechanismus näher eingegangen: Die Subpopulation der HLA-E restringierten CD8+ cytotoxischen T-Zellen, auch NK-CTLs (engl.: *Natural killer cytotoxic T lymphocytes*) genannt, erkennen über ihren TCR das nichtklassische HLA-E Molekül[135,155], das neben den Peptiden aus unterschiedlichen Leitsequenzen der klassischen MHC I Moleküle[194] auch einige andere Peptide z.B. bakteriellen oder viralen Ursprungs bindet[75,126,130,138,170,178,186]. Eine starke Avidität weisen die NK-CTLs dabei für das aus dem CMV stammende UL40-Peptid auf[154,173]. Nach Bindung und Präsentation des CMV-Peptides durch HLA-E folgt die Aktivierung der NK-CTLs, woraus sich Zytotoxizität, IFN-γ Ausschüttung und Zellproliferation ergeben[154]. Die HLA-E restringente Erkennung des CMV durch die NK-CTLs könnte eine wichtige immunologische Strategie gegen dieses Virus darstellen. Denn während das CMV die Lyse durch die gewöhnlichen CTLs umgehen kann, indem es die Antigenpräsentation über die klassischen MHC-I Moleküle durch deren Down-Regulation verhindert[211], bleibt die Erkennung durch NK-CTLs von diesem Mechanismus unbeeinflusst. Als immunologische Antwort darauf wird das HLA-E auf der Zelloberfläche stärker exprimiert und so kann dennoch eine zur MHC-Ia komplementäre HLA-E vermittelte adaptive Immunantwort gegen das CMV erfolgen[78,126,173]. Es gibt auch Studien, die diese Up-Regulation des HLA-E im Rahmen einer CMV-Infektion in erster Linie als Escape-Mechanismus des CMVs deuten, indem es dadurch zu einem verstärkten inhibitorischen Signal für die klassischen NK-Zellen via CD94/ NKG2A kommt und dass das CMV auf diese Weise der Lyse durch die klassischen NK-Zellen entgeht[27,202,211]. Geht man nun davon aus, dass

sich je nach HLA-E Status eine unterschiedlich gute Antigenpräsentation ergibt und daraus im Rahmen einer CMV-Infektion auch eine jeweils unterschiedlich gute Immunabwehr, könnte man schlussfolgern, dass Empfänger von Spendern mit solch einem in der Antigenpräsentation „schlechterem“ HLA-E Status auch stärkere oder häufigere CMV-Infektionen aufweisen und somit ein schlechteres Outcome. Dieser Mechanismus ist theoretisch auch auf bakterielle Infektionen übertragbar und es gibt Studien, die zeigen, dass der homozygote HLA-E*01:01 Status der Spender zu erhöhter Infektionsrate bei deren Empfängern führen soll[198]. In der hier untersuchten Studie ließ sich durch den homozygoten HLA-E*01:01 Status keine TRM Beeinflussung nachweisen.

Auch von den HLA-E restringierten NK-CTLs selbst könnte andererseits eine besondere Gefahr im Rahmen von Transplantationen ausgehen[135,174], denn es konnte gezeigt werden, wie diese HLA-E vermittelte Peptiderkennung sowohl zur Lyse allogener „normaler“ Körperzellen als auch von Tumorzellen, im englischen auch als „*NK-like activity*“ bezeichnet, führen kann[155]. So wurde das Auftreten monoklonal expandierter, HLA-E restringierter NK-CTLs in CMV-seropositiven Personen beobachtet[154]. Da das aus der CMV-Prozessierung stammende UL40 Peptid (VMAPRTLIL) identisch zu einem Peptid aus der Leitsequenz bestimmter HLA-C-Allele ist, folgt daraus dass solche NK-CTLs in der Lage wären, eine „HLA-E vermittelte Alloreaktivität“ gegenüber eigenen Körperzellen, die das entsprechende HLA-C an ihrer Oberfläche exprimieren, zu entwickeln[155] und somit im Rahmen der PBSZT das Auftreten einer GvHD zu begünstigen[154].

Der molekulare Mechanismus, auf dem der Einfluss von HLA-E in der Transplantation von peripheren Stammzellen beruhen soll, wird aus der Tatsache geschlussfolgert, dass die Oberflächenexpression von HLA-E*01:03 höher ist als die des HLA-E*01:01 Moleküls. Diese Beobachtung wurde von Ulbrecht et al. 1999 publiziert[206], eine Erkenntnis, die aus der Untersuchung transfizierter Zellen gewonnen wurde und in vivo bisher nicht bestätigt wurde. Wie in der Einleitung schon erwähnt, führen ursächliche Unterschiede in der Affinität der zu bindenden Peptide und die Stabilität der gebildeten Komplexe zu veränderten Oberflächenexpressionen[194]. Besonders zu betonen ist, dass es bis heute immer noch keinen tatsächlichen Beweis dafür gibt, dass die höhere Oberflächenexpression von HLA-E*01:03 auch tatsächlich für eine effizientere Antigenpräsentation oder für eine veränderte Signaltransduktion verantwortlich ist. Ganz im Gegenteil, es wird sogar eine verminderte Effektivität der HLA-E*01:03 Allele in der Präsentation von mHags (Minor-Histokompatibilitäts-Antigene) und der daraus

resultierenden Stimulation von T-Lymphozyten postuliert[20,199]. Minor H Antigene sind Zellpeptide, die die Expression von HLA-Molekülen stabilisieren und dabei selbst zum Antigen werden können. Sie können von MHC-restringierten T-Lymphozyten erkannt und dadurch immunogen wirken. Hierdurch ist ebenfalls ein Einfluss auf den Verlauf bei KMT denkbar, besonders im Hinblick auf GvH-Reaktionen. Folgende der beiden Erklärungen für die ineffiziente T-Zell Stimulation durch HLA-E*01:03 ist denkbar: 1. HLA-E*01:03 bindet neben den klassischen mHags-präsentierenden HLA-Molekülen noch weitere Peptide. In dieser Hinsicht sollte das Augenmerk noch einmal auf die Tatsache gerichtet werden, dass mit einer einzigen Ausnahme, nämlich dem HLA-A*02 Allel, das eine bedeutende Rolle in der Präsentation von wichtigen mHags (HA-1, HA-2, HA-Y) übernimmt, die meisten klassischen HLA-Allele und das HLA-E Allel an Position 107 ein Glycin aufweisen, über welches die Bindung erfolgt. So dass man, auch wenn zuvor in Studien von synergistischen Effekten der klassischen und nicht-klassischen HLA-Moleküle in der Antigenpräsentation die Rede ist[172], postulieren könnte, dass HLA-E*01:03 kompetitiv zu den klassischen HLA-Molekülen mHags bindet und daraus eine verschlechterte T-Zell-Präsentation resultiert. Auch denkbar, jedoch weniger wahrscheinlich ist 2.: HLA-E*01:03 präsentiert mHags, die speziell den GvL-Effekt und nicht die GvHD vermitteln. Der aus dem GvL-Effekt bzw. der GvHD resultierende Gewebeschaden kann, wie in der Einleitung schon erwähnt, sowohl T-Zell- als auch NK-Zell-vermittelt sein. Da die Oberflächenexpression der HLA-E Moleküle von der Expression der klassischen HLA-Moleküle einer Zelle, dem zellulären Stress dieser Zelle und dem jeweiligen HLA-E Allelstatus dieser Zelle abhängig ist, könnte man folgende Hypothese aufstellen: Zellen, die hochinflammatorischen Signalen, wie sie in einer Posttransplantationsphase gegeben sind, ausgesetzt sind und HLA-E stark exprimieren, werden von dem NK-Zell-vermittelten Gewebeschaden verschont, während Zellen die HLA-E nur schwach exprimieren den Hauptangriffspunkt der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität darstellen[199]. Diese Hypothese wird auch durch die kürzlich in einer Studie nachgewiesene vermehrte CD94/NKG2A-Expression auf NK-Zellen nach haploidentischer allogener PBSZT unterstützt[139].

Dennoch konnte in dieser Analyse keine der Beobachtungen aus den bisher erschienenen Veröffentlichungen in Bezug auf den Einfluss des HLA-E Polymorphismus auf die Endpunkte PBSZT statistisch nachvollzogen werden. Über diese Tatsache hinaus, kann man sogar im Rückblick auf die bisher erschienen Veröffentlichungen eine mangelnde Konsistenz derer Ergebnisse untereinander nachweisen, so dass ein Einfluss von HLA-E

Polymorphismen in diesem Setting gering bzw. unwahrscheinlich erscheint. In der Zusammenschau der bisherigen Publikationen beobachtet man eine mangelnde Übereinstimmung der Ergebnisse, so dass man keine klare Aussage über den Einfluss von HLA-E Polymorphismen auf das Outcome von Patienten, die durch PBSZT therapiert wurden, machen kann. Auch wenn sich diese Diskrepanzen der einzelnen Publikationsergebnisse auf die unterschiedlichen Charakteristika ihrer jeweils untersuchten Kollektive – wie oben schon diskutiert- zurückführen ließen, muss man feststellen, dass bisher kein Einfluss von HLA-E auf die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen wiederholt und mit ausreichender statistischer Sicherheit nachgewiesen wurde. Die Beobachtungen im Rahmen dieser Studie legen nahe, dass sich Ergebnisse aus mittelgroßen und uneinheitlichen Kollektiven nur schwer auf das Transplantationssetting im Allgemeinen transferieren lassen. Um die tatsächliche Bedeutung des HLA-E-Polymorphismus in der PBSZT herauszufinden sind neben größeren Fallzahlen, homogeneren Kollektiven und einheitlicheren Therapiekonzepten in den Studien vor allem spezifischere Erkenntnisse über die multiplen Funktionen des HLA-E sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem von Nöten, um klarer definierte Hypothesen zu formulieren. Um spezifische Effekte im Outcome der PBSZT eindeutig auf den HLA-E Polymorphismus zurückführen zu können, müssen erst noch die Einflüsse zahlreicher weitere (Ko-)Faktoren wie zum Beispiel die KIR-Kompatibilität, die mHags oder der MICA-Polymorphismus geklärt werden und in ein funktionelles Gesamtkonzept integriert werden.

4.3.7.Ausblick

Aktuell konnte eine Serie relevanter Entdeckungen über zahlreiche wichtige Funktionen des bisher wenig untersuchten MHC-Ib Moleküls HLA-E des Menschen gemacht werden. Durch seine breitgefächerte Funktion im Immunsystem stellt das HLA-E neben seiner Rolle im Rahm der PBSZT, in zahlreichen anderen medizinischen Gebieten Gegenstand heutiger Forschung dar:

Eine ähnliche immunologische Situation, wie sie im Rahmen der allogenen (haploidenten) PBSZT besteht, kann man auch in einer physiologischen Situation wiederfinden: nämlich während einer Schwangerschaft. Die balancierte Regulation von angeborener und erworbener Immunität erlaubt die Entwicklung des semi-allogenen Embryos und gewährleistet gleichzeitig dennoch effektiven immunologischen Schutz der Mutter vor exogen-pathogenen Keimen[109]. Während man vom HLA-G schon lange weiß, dass es von allen Zellen der Plazenta exprimiert wird[106], wurde dies für das HLA-E nur indirekt

geschlussfolgert und dessen Vorkommen in der Plazenta musste erst noch vollständig eruiert werden[88]. Es konnte die Koexpression von HLA-E und HLA-G auf den Zellen der Plazenta nachgewiesen werden. Gleichzeitig bindet und präsentiert das HLA-E das Nonamer aus der Leitsequenz des HLA-G in einem besonders festen Komplex, so dass dem HLA-E eine besondere Rolle in der feto-maternalen Immuntoleranz zugestanden wurde[74,87,165]. Während die fetalen Trophoblasten die polymorphen MHC-Ia und II Moleküle weitgehend nicht exprimieren und auf diese Weise der Erkennung durch die maternalen CTLs entgehen können[86,125], exprimieren sie jedoch HLA-E, -F und -G und können so durch NK-Zellen erkannt und gegebenenfalls lysiert werden[87,98,117]. Die Lyse bleibt jedoch bei einer erfolgreichen Schwangerschaft aus. Multiple Mechanismen werden für die feto-maternale Immuntoleranz verantwortlich gemacht[1,129,157,159,207] unter anderem soll das HLA-E über die Interaktion mit dem NKG2/CD94 Rezeptor die Lyse durch die NK-Zellen verhindern[209]. Nur ein tieferes Verständnis dieser zahlreichen Mechanismen der physiologischen feto-maternalen Immuntoleranz, wird es in Zukunft ermöglichen durch Manipulation dieser auch Fortschritte im Rahmen von Transplantationen und Autoimmunreaktionen zu erzielen[74].

Ein weiteres wichtiges Forschungsgebiet bezüglich des HLA-E stellen die HLA-E restringierten NK-CTLs dar: Neben der oben diskutierten adaptiven Immunantwort gegen Viren können NK-CTLs ähnlich den NK-Zellen auch allogene Tumorzellen erkennen und lysieren[153,155,186]. Dies wird im Englischen auch als *„NK-like activity“* bezeichnet. Besonders in Hinblick auf die weitverbreitete HLA-E Expression in nahezu allen Geweben, sollte dabei das Augenmerk darauf gerichtet werden, dass HLA-E restringierte CTLs im Rahmen der Immunabwehr von Tumoren, die HLA-Ia nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren eine wesentliche Rolle spielen könnten. So kann es dazu kommen, dass Tumorzellen, die keine HLA-Ia Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren oder diese zumindest herunter regulieren, den klassischen NK-Zellen entgehen können, jedoch nicht der durch HLA-E bedingten Induktion der HLA-E restringierten $CD8^+$ T-Zell Antwort gegen tumorzelleigene Antigene und auf diese Weise dennoch erkannt und lysiert werden[153]. In einem Tierversuch konnte kürzlich gezeigt werden wie in Mäusen, das nichtklassische Qa-1^b Molekül, das dem HLA-E des Menschen entspricht, als Restriktionselement für die $CD8^+$ T Zellen in der adaptiven Immunabwehr TAP-defizienter Tumore dient[144]. Diese Erkenntnisse erfordern weitere Untersuchungen über die zahlreichen Funktionen des HLA-E im Immunsystem.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das nichtklassische HLA-E (engl.: *human leukocyte antigene*), von dem bisher 10 Allele bekannt sind, wird als membrangebundenes Protein auf nahezu allen Zellen exprimiert. Über die Bindung und Präsentation von Signalpeptiden klassischer HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, -B, -C) hinaus, scheint HLA-E als Ligand der C-Typ-Lektinrezeptoren CD94/NKG2A und CD94/NKG2C der NK-Zellen (engl.: *natural killer cells*) eine wichtige Funktion auch in der Regulation von NK-Zellen zu übernehmen. Da im Rahmen der PBSZT (dtsch: *periphere Blutstammzelltransplantation*) NK-Zellen des Donors wichtige Effektorzellen in der Entwicklung der GvHD (engl.: *graft-versus-host disease*) und der GvL (engl.: *graft-versus-leukemia*) darstellen, ist es denkbar, dass die Polymorphismen im HLA-E Lokus auf diese Weise einen direkten Einfluss auf diese beiden Phänomene nehmen können. Bisherige, publizierte Studien haben inkonsistente Ergebnisse hinsichtlich eines Einflusses von HLA-E auf den Erfolg der hämatopoetischen Stammzell-transplantation gezeigt.

Zielsetzung dieser Analyse war es daher folgende drei Fragen eindeutig zu klären:

- Beeinflusst die HLA-E Kompatibilität zwischen Spender- und Empfängerpaaren die Ergebnisse der PBSZT?
- Geht der homozygote HLA-E*01:03 Status des Patienten mit erniedrigter Gefahr für die Entwicklung einer aGvHD (engl.: *acute graft-versus-host disease*) einher?
- Führen HLA-E*01:01 homozygote Spenderstammzellen zu einem erhöhte Risiko für das Auftreten von TRM (engl.: *transplantation-related-mortality*) bei ihren Empfängern?

Zur Ermittlung des jeweiligen HLA-E Status wurde die DNA (engl.: *desoxyribonucleic acid*) von 116 nichtverwandten, 10/10 HLA kompatiblen Spender-/Empfängerpaaren mit Hilfe der PCR-SSP-Methode (engl.: *polymerasechainreaction-sequence-specific-priming*) genotypisiert. Bei diesem Verfahren erfolgt die Genotypisierung durch Primeranalytik, das heißt die Differenzierung von Allelen bzw. Allelgruppen wird durch den Einsatz spezifischer allel- bzw. gruppenspezifischer Primerkombinationen möglich. Es stellt eine schnelle Einzelbestimmungsmethode dar und kann alternativ zur Sequenzierung genutzt werden. Zuvor wurde im Rahmen der Validierung der PCR-SSP-Methode die Genotypisierung von 40 Referenz-DNA-Proben mit beiden Verfahren durchgeführt. Dabei erreichte die Übereinstimmung der beiden Methoden 100%. Die PBSZTs erfolgten zwischen 1997 und 2002. Letzte Follow up Daten über Gesamtüberleben bzw. OS (engl.:

overall survival), Dauer des krankheitsfreien Intervalls bzw. DFS (engl.: *disease-free-survival*), transplantatassoziierten Mortalität bzw. TRM (engl.: *transplantation-related-mortality*), Auftreten von Rezidiven, aGvHD (engl.; *acute graft-versus-host-disease*) wurden im August 2008 vom DRST (dtsch: *deutsches Register für Stammzelltransplantation*) zur Verfügung gestellt.

In der statistischen Analyse wurden zunächst HLA-E kompatible Spender-/Empfängerpaare nicht kompatiblen gegenüber gestellt, dann folgte der Vergleich von homozygoten HLA-E*01:03 Patienten und Patienten mit anderem HLA-E Status. Desweiteren wurden die Ergebnisse nach PBSZT bei den Empfängern von homozygoten HLA-E*01:01 Spendern mit denen der Übrigen verglichen. In keiner dieser Gruppen war ein Einfluss der jeweiligen HLA-E Polymorphismen auf die oben festgelegten Endpunkte der PBSZT nachweisbar, weder in der univariaten Analyse nach Kaplan-Meier, noch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse. Selbst unter Berücksichtigung der kumulativen Inzidenzen für Rezidive, TRM oder aGvHD konnte auch unter Einbeziehung kompetitiver Risikofaktoren nach der Methode von Fine und Gray kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen festgestellt werden. Es konnte keine der oben genannten Beobachtungen in Bezug auf den HLA-E Polymorphismus und dessen Rolle in der PBSZT in dem hier untersuchten Kollektiv nachgewiesen werden.

Da im Rückblick auf die bisher veröffentlichten Daten eine deutliche Inkongruenz der Ergebnisse zu vermerken ist, gibt es neben unseren Analysen weitere Arbeiten, die ebenfalls keinen signifikanten Einfluss des HLA-E Polymorphismus auf die Ergebnisse der PBSZT hervorbrachten. Die geringe Fallzahl und die zahlreichen Diversitäten innerhalb der in den einzelnen Studien untersuchten Kollektive limitieren die Aussagekraft und Vergleichbarkeit bisheriger Studien. In Zusammenschau aller Daten ist ein starker Einfluss von HLA-E im Rahmen der Stammzelltransplantation unwahrscheinlich. Nur durch größere Fallzahlen in den Studien und homogenere Zusammensetzung der analysierten Patientenkollektive wird es in Zukunft möglich sein, diesen Einfluss endgültig zu klären. Innerhalb dieses Settings gibt es neben dem HLA-E weitere (Ko-)Faktoren wie zum Beispiel die KIR-Kompatibilität (engl.: *killer-cell immunglobulin-like receptor*), die mHags (Minor H Antigene) oder der MICA-Polymorphismus (engl.: *MHC class I polypeptide-related sequence A*), die alle Gegenstand heutiger Forschung sind. Es ist wichtig die Rolle all dieser Faktoren im Rahmen der allogenen PBSZT zu klären, um zukünftig weitere Parameter explizit für eine ideale Spenderauswahl bestimmen zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

[1]Aluvihare V R, Kallikourdis M, Betz A G: Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol 5: 266-271 (2004)

[2]Anasetti C, Hansen J A: Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA-mismatched related donors. Transfus Sci 15: 221-230 (1994)

[3]Anasetti C, Beatty P G, Storb R, Martin P J, Mori M, Sanders J E, Thomas E D, Hansen J A: Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. Hum Immunol 29: 79-91 (1990)

[4]Anasetti C, Amos D, Beatty P G, Appelbaum F R, Bensinger W, Buckner C D, Clift R, Doney K, Martin P J, Mickelson E: Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. N Engl J Med 320: 197-204 (1989)

[5]Andersen P K: Survival analysis 1982-1991: the second decade of the proportional hazards regression model. Stat Med 10: 1931-1941 (1991)

[6]Andersen P K, Abildstrom S Z, Rosthoj S: Competing risks as a multi-state model. Stat Methods Med Res 11: 203-215 (2002)

[7]Arora M, Weisdorf D J, Spellman S R, Haagenson M D, Klein J P, Hurley C K, Selby G B, Antin J H, Kernan N A, Kollman C, Nademanee A, McGlave P, Horowitz M M, Petersdorf E W: HLA-identical sibling compared with 8/8 matched and mismatched unrelated donor bone marrow transplant for chronic phase chronic myeloid leukemia. J Clin Oncol 27: 1644-1652 (2009)

[8]Bahram S, Bresnahan M, Geraghty D E, Spies T: A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 6259-6263 (1994)

[9]Ball L M, Egeler R M: Acute GvHD: pathogenesis and classification. Bone Marrow Transplant 41 Suppl 2: S58-S64 (2008)

[10]Barton-Burke M, Dwinell D M, 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 (Williston Park) 22: 31-45 (2008)

[11]Beatty P G, Mori M, Milford E: Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. Transplantation 60: 778-783 (1995)

[12]Beatty P G, Clift R A, Mickelson E M, Nisperos B B, Flournoy N, Martin P J, Sanders J E, Stewart P, Buckner C D, Storb R: Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. N Engl J Med 313: 765-771 (1985)

[13]Beckmann C: Agencourt AMPure XP - PCR Purification (http://www.beckmangenomics.com/products/dna_purification_and_cleanup/agencourt_cleanseq html). (2010)

[14]Bender R, Lange S, Ziegler A: Common significance tests. Dtsch Med Wochenschr 132 Suppl 1: 24-25 (2007)

[15]Bensinger W I, Martin P J, Storer B, Clift R, Forman S J, Negrin R, Kashyap A, Flowers M E, Lilleby K, Chauncey T R, Storb R, Appelbaum F R: 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)

[16]Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A, Moretta L: The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. J Exp Med 183: 645-650 (1996)

[17]Biron C A, Nguyen K B, Pien G C, Cousens L P, Salazar-Mather T P: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol 17: 189-220 (1999)

[18]Bishara A, De S D, Witt C C, Brautbar C, Christiansen F T, Or R, Nagler A, Slavin S: The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. Tissue Antigens 63: 204-211 (2004)

[19]Bjorkman P J, Parham P: Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. Annu Rev Biochem 59: 253-288 (1990)

[20]Bleakley M, Riddell S R: Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. Nat Rev Cancer 4: 371-380 (2004)

[21]Bodmer W F: The HLA system: structure and function. J Clin Pathol 40: 948-958 (1987)

[22]Bogunia-Kubik K, Wysoczanska B, Lange A: Non-HLA gene polymorphisms and the outcome of allogeneic hemato-poietic stem cell transplantation. Curr Stem Cell Res Ther 1: 239-253 (2006)

[23]Borrego F, Kabat J, Sanni T B, Coligan J E: NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes. J Immunol 169: 6102-6111 (2002)

[24]Borrego F, Masilamani M, Marusina A I, Tang X, Coligan J E: The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. Immunol Res 35: 263-278 (2006)

[25]Borrego F, Kabat J, Kim D K, Lieto L, Maasho K, Pena J, Solana R, Coligan J E: Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. Mol Immunol 38: 637-660 (2002)

[26]Braud V M, Aldemir H, Breart B, Ferlin W G: Expression of CD94-NKG2A inhibitory receptor is restricted to a subset of CD8+ T cells. Trends Immunol 24: 162-164 (2003)

[27]Braud V M, Allan D S, O'Callaghan C A, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg G S, Lazetic S, Young N T, Bell J I, Phillips J H, Lanier L L, McMichael A J: HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature 391: 795-799 (1998)

[28]Brenner H, Hakulinen T: On crude and age-adjusted relative survival rates. J Clin Epidemiol 56: 1185-1191 (2003)

[29]Brenner H, Hakulinen T: Substantial overestimation of standard errors of relative survival rates of cancer patients. Am J Epidemiol 161: 781-786 (2005)

[30]Brooks A G, Boyington J C, Sun P D: Natural killer cell recognition of HLA class I molecules. Rev Immunogenet 2: 433-448 (2000)

[31]Browning M J, Krausa P, Rowan A, Bicknell D C, Bodmer J G, Bodmer W F: Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 2842-2845 (1993)

[32]Bryceson Y T, March M E, Ljunggren H G, Long E O: Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. Immunol Rev 214: 73-91 (2006)

[33]Campbell K S, Colonna M: Human natural killer cell receptors and signal transduction. Int Rev Immunol 20: 333-370 (2001)

[34]Chang C, Rodriguez A, Carretero M, Lopez-Botet M, Phillips J H, Lanier L L: Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. Eur J Immunol 25: 2433-2437 (1995)

[35]Christensen E: Multivariate Survival Analysis Using Cox's Regression Model. Hepatology 7: 1346-1358 (1987)

[36]Cooper M A, Fehniger T A, Turner S C, Chen K S, Ghaheri B A, Ghayur T, Carson W E, Caligiuri M A: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood 97: 3146-3151 (2001)

[37]Copelan E A: Hematopoietic stem-cell transplantation. N Engl J Med 354: 1813-1826 (2006)

[38]Corell A, Little A-M, Marsh S G E, Madrigal J A: HLA matching in unrelated stem cell transplantation: what to type for? immunologia 21: 169-177 (2002)

[39]Couban S, Simpson D R, Barnett M J, Bredeson C, Hubesch L, Howson-Jan K, Shore T B, Walker I R, Browett P, Messner H A, Panzarella T, Lipton J H: A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. Blood 100: 1525-1531 (2002)

[40]Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K: Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. Cancer 101: 1936-1946 (2004)

[41]Cox DR: Regression models and life tables (with discussion). J R Statist Soc B 34: 187-220 (1972)

[42]Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin J H: Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. J Clin Oncol 19: 3685-3691 (2001)

[43]Dahl M, Hviid T V: Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. Hum Reprod Update 18: 92-109 (2012)

[44]Danzer M, Polin H, Proll J, Haunschmid R, Hofer K, Stabentheiner S, Hackl C, Kasparu H, Konig J, Hauser H, Binder M, Weiss R, Gabriel C, Krieger O: Clinical significance of HLA-E*0103 homozygosity on survival after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. Transplantation 88: 528-532 (2009)

[45]De M A, Ferraris A, Guastella M, Pilia S, Cantoni C, Polero L, Mingari M C, Bassetti D, Fauci A S, Moretta L: Expression of HLA class I-specific inhibitory natural killer cell receptors in HIV-specific cytolytic T lymphocytes: impairment of specific cytolytic functions. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 10285-10288 (1997)

[46]Deeg H J, Antin J H: The clinical spectrum of acute graft-versus-host disease. Semin Hematol 43: 24-31 (2006)

[47]Derre L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, Jotereau F, Gervois N: Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. J Immunol 177: 3100-3107 (2006)

[48]Dickinson A M: Non-HLA genetics and predicting outcome in HSCT. Int J Immunogenet 35: 375-380 (2008)

[49]Dickinson A M, Middleton P G, Rocha V, Gluckman E, Holler E: Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. Br J Haematol 127: 479-490 (2004)

[50]Dickman P W, Adami H O: Interpreting trends in cancer patient survival. J Intern Med 260: 103-117 (2006)

[51]Dickman P W, Sloggett A, Hills M, Hakulinen T: Regression models for relative survival. Stat Med 23: 51-64 (2004)

[52]Dudley W N, Benuzillo J G, Carrico M S: SPSS and SAS programming for the testing of mediation models. Nurs Res 53: 59-62 (2004)

[53]Ederer F, Axtell L M, Cutler S J: The relative survival rate: a statistical methodology. Natl Cancer Inst Monogr 6: 101-121 (1961)

[54]Engels E A, Ellis C A, Supran S E, Schmid C H, Barza M, Schenkein D P, Koc Y, Miller K B, Wong J B: Early infection in bone marrow transplantation: quantitative study of clinical factors that affect risk. Clin Infect Dis 28: 256-266 (1999)

[55]Fausther-Bovendo H, Wauquier N, Cherfils-Vicini J, Cremer I, Debre P, Vieillard V: NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. AIDS 22: 217-226 (2008)

[56]Fehniger T A, Cooper M A, Nuovo G J, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri M A: CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. Blood 101: 3052-3057 (2003)

[57]Fine J P, Gray R J: A proportinal hazards model for the subdistribution of a competing risk. JASA 94: 496-509 (1999)

[58]Fine J P: Regression modeling of competing crude failure probabilities. Biostatistics 2: 85-97 (2001)

[59]Fishman J A, Rubin R H: Infection in organ-transplant recipients. N Engl J Med 338: 1741-1751 (1998)

[60]Flomenberg N, Baxter-Lowe L A, 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)

[61]Freishtat R J, Mojgani B, Nazemzadeh M, Nagaraju K, Hoffman E P: NKG2A inhibits TH2 cell effector function in vitro. BMC Pulm Med 7: 14 (2007)

[62]French A R, Sjolin H, Kim S, Koka R, Yang L, Young D A, Cerboni C, Tomasello E, Ma A, Vivier E, Karre K, Yokoyama W M: DAP12 signaling directly augments proproliferative cytokine stimulation of NK cells during viral infections. J Immunol 177: 4981-4990 (2006)

[63]Furst D, Bindja J, Arnold R, Herr W, Schwerdtfeger R, Muller C H, Recker K, Schrezenmeier H, Mytilineos J: HLA-E polymorphisms in hematopoietic stem cell transplantation. Tissue Antigens (2012)

[64]Gambelunghe G, Brozzetti A L, Ghaderi M, Tortoioli C, Falorni A: MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. Hum Immunol 67: 1005-1007 (2006)

[65]Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Maccario R, Bonetti F, Wojnar J, Martinetti M, Frassoni F, Giorgiani G, Bacigalupo A, Holowiecki J: Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. Blood 102: 814-819 (2003)

[66]Giebel S, Labopin M, Holowiecki J, Labar B, Komarnicki M, Koza V, Masszi T, Mistrik M, Lange A, Hellmann A, Vitek A, Pretnar J, Mayer J, Rzepecki P, Indrak K, Wiktor-Jedrzejczak W, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Kyrcz-Krzemien S, Rocha V: Outcome of HLA-matched related allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute leukemia in first complete remission treated in Eastern European centers. Better results in recent years. Ann Hematol 88: 1005-1013 (2009)

[67]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)

[68]Gluckman E, Wagner J E: Hematopoietic stem cell transplantation in childhood inherited bone marrow failure syndrome. Bone Marrow Transplant 41: 127-132 (2008)

[69]Gould D S, Gould D B: Venous air embolism retrieval catheters cannot capture bubbles; an air lock is required. Acta Anaesthesiol Scand 40: 272-274 (1996)

[70]Gray R J: The cmprsk Package. Subdistribution analysis of competing risks. Stata Press (2007)

[71]Greinix H T, Loddenkemper C, Pavletic S Z, Holler E, Socie G, Lawitschka A, Halter J, Wolff D: Diagnosis and Staging of Chronic Graft-versus-Host Disease in the Clinical Practice. Biol Blood Marrow Transplant (2010)

[72]Greinix H T, Fae I, Schneider B, Rosenmayr A, Mitterschiffthaler A, Pelzmann B, Kalhs P, Lechner K, Mayr W R, Fischer G F: Impact of HLA class I high-resolution mismatches on chronic graft-versus-host disease and survival of patients given hematopoietic stem cell grafts from unrelated donors. Bone Marrow Transplant 35: 57-62 (2005)

[73]Grimsley C, Kawasaki A, Gassner C, Sageshima N, Nose Y, Hatake K, Geraghty D E, Ishitani A: Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: Identifying potential errors in existing allele data. Tissue Antigens 60: 206-212 (2002)

[74]Guleria I, Sayegh M H: Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. J Immunol 178: 3345-3351 (2007)

[75]Heinzel A S, Grotzke J E, Lines R A, Lewinsohn D A, McNabb A L, Streblow D N, Braud V M, Grieser H J, Belisle J T, Lewinsohn D M: HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8+ T cells. J Exp Med 196: 1473-1481 (2002)

[76]Henson D E, Ries L A: The relative survival rate. Cancer 76: 1687-1688 (1995)

[77]Hjerten S: Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis. Biochim Biophys Acta 53: 514-517 (1961)

[78]Hoare H L, Sullivan L C, Pietra G, Clements C S, Lee E J, Ely L K, Beddoe T, Falco M, Kjer-Nielsen L, Reid H H, McCluskey J, Moretta L, Rossjohn J, Brooks A G: Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response. Nat Immunol 7: 256-264 (2006)

[79]Holler E: Progress in acute graft versus host disease. Curr Opin Hematol 14: 625-631 (2007)

[80]Holler E: Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: GvHD prevention and treatment. Best Pract Res Clin Haematol 20: 281-294 (2007)

[81]Holler E: The role of innate immunity in graft-versus-host disease and complications following allogeneic stem cell transplant. Biol Blood Marrow Transplant 15: 59-61 (2009)

[82]Horowitz M M, Gale R P, Sondel P M, Goldman J M, Kersey J, Kolb H J, Rimm A A, Ringden O, Rozman C, Speck B: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood 75: 555-562 (1990)

[83]Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering R C, Bruford E A, Khodiyar V K, Lush M J, Povey S, Talbot C C, Jr., Wright M W, Wain H M, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S: Gene map of the extended human MHC. Nat Rev Genet 5: 889-899 (2004)

[84]Hougaard P: Fundamentals of survival data. Biometrics 55: 13-22 (1999)

[85]Hougaard P: Multi-state models: a review. Lifetime Data Anal 5: 239-264 (1999)

[86]Hunt J S, Andrews G K, Wood G W: Normal trophoblasts resist induction of class I HLA. J Immunol 138: 2481-2487 (1987)

[87]Ishitani A, Sageshima N, Hatake K: The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. J Reprod Immunol 69: 101-113 (2006)

[88]Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, Geraghty D E: Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. J Immunol 171: 1376-1384 (2003)

[89]Jansen J, Hanks S, Thompson J M, Dugan M J, Akard L P: Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. J Cell Mol Med 9: 37-50 (2005)

[90]Kaiser B K, Pizarro J C, Kerns J, Strong R K: Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 6696-6701 (2008)

[91]Kaiser B K, Barahmand-Pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty D E, Strong R K: Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. J Immunol 174: 2878-2884 (2005)

[92]Kalwak K, Moson I, Cwian J, Gorczynska E, Toporski J, Turkiewicz D, Latos-Grazynska 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)

[93]Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc 53: 81 (1958)

[94]Karre K: Immunology. A perfect mismatch. Science 295: 2029-2031 (2002)

[95]Kawamura H, Yagita H, Nisizawa T, Izumi N, Miyaji C, Vance R E, Raulet D H, Okumura K, Abo T: Amelioration of acute graft-versus-host disease by NKG2A engagement on donor T cells. Eur J Immunol 35: 2358-2366 (2005)

[96]Kim H T: Cumulative incidence in competing risks data and competing risks regression analysis. Clin Cancer Res 13: 559-565 (2007)

[97]Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott S M, Lybarger L, Song Y J, Yang L, French A R, Sunwoo J B, Lemieux S, Hansen T H, Yokoyama W M: Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. Nature 436: 709-713 (2005)

[98]King A, Burrows T D, Hiby S E, Bowen J M, Joseph S, Verma S, Lim P B, Gardner L, Le B P, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, Loke Y W: Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. Placenta 21: 376-387 (2000)

[99]Kitcharoen K, Witt C S, Romphruk A V, Christiansen F T, Leelayuwat C: MICA, MICB, and MHC beta block matching in bone marrow transplantation: relevance to transplantation outcome. Hum Immunol 67: 238-246 (2006)

[100]Klein J, Sato A: The HLA system. First of two parts. N Engl J Med 343: 702-709 (2000)

[101]Klein J, Sato A: The HLA system. Second of two parts. N Engl J Med 343: 782-786 (2000)

[102]Klein J P, Rizzo J D, Zhang M J, Keiding N: Statistical methods for the analysis and presentation of the results of bone marrow transplants. Part 2: Regression modeling. Bone Marrow Transplant 28: 1001-1011 (2001)

[103]Kleinbaum D G, Klein M: Survival Analysis: A Self-Learning Text. Third Edition. Springer Verlag, New York London Heidelberg, S45-82 (2005)

[104]Kleinbaum D G, Mitchel K: Survival analysis: A Self-learning Text. Third Edition. Springer Verlag, New York London Heidelberg, S83-129 (2005)

[105]Korn E L, Dodd L E, Freidlin B: Measurement error in the timing of events: effect on survival analyses in randomized clinical trials. Clin Trials (2010)

[106]Kovats S, Main E K, Librach C, Stubblebine M, Fisher S J, DeMars R: A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. Science 248: 220-223 (1990)

[107]Krenger W, Ferrara J L: Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. Immunol Res 15: 50-73 (1996)

[108]Lange S, Bender R: What is a significance test? General issues. Dtsch Med Wochenschr 132 Suppl 1: e19-e21 (2007)

[109]Laskarin G, Kammerer U, Rukavina D, Thomson A W, Fernandez N, Blois S M: Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. Am J Reprod Immunol 58: 255-267 (2007)

[110]Leather H L, Wingard J R: Infections following hematopoietic stem cell transplantation. Infect Dis Clin North Am 15: 483-520 (2001)

[111]Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, Geraghty D E: HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 5199-5204 (1998)

[112]Lee S J: Have we made progress in the management of chronic graft-vs-host disease? Best Pract Res Clin Haematol 23: 529-535 (2010)

[113]Lee S J, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe L A, Confer D L, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley C K, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams T M, Anasetti C: High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. Blood 110: 4576-4583 (2007)

[114]Lenfant F, Pizzato N, Liang S, Davrinche C, Le B P, Horuzsko A: Induction of HLA-G-restricted human cytomegalovirus pp65 (UL83)-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-G transgenic mice. J Gen Virol 84: 307-317 (2003)

[115]Li P, Morris D L, Willcox B E, Steinle A, Spies T, Strong R K: Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. Nat Immunol 2: 443-451 (2001)

[116]Ljunggren H G, Karre K: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. Immunol Today 11: 237-244 (1990)

[117]Ljunggren H G, Ohlen C, Hoglund P, Franksson L, Karre K: The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection. Int J Cancer Suppl 6: 38-44 (1991)

[118]Lu L, Cantor H: Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. Cell Mol Immunol 5: 401-406 (2008)

[119]Ludajic K, Rosenmayr A, Fae I, Fischer G F, Balavarca Y, Bickeboller H, Kalhs P, Greinix H T: Association of HLA-E polymorphism with the outcome of hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors. Transplantation 88: 1227-1228 (2009)

[120]Luy M.: Lebenserwartung.info. Die Internetseiten mit vielfältigen Informationen zur Lebenserwartung in Deutschland von Marc Luy. (2011)

[121]Madrigal J A, Scott I, Arguello R, Szydlo R, Little A M, Goldman J M: Factors influencing the outcome of bone marrow transplants using unrelated donors. Immunol Rev 157: 153-166 (1997)

[122]Mantel N: Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. Cancer Chemother Rep 50: 163-170 (1966)

[123]Marsh S G: Nomenclature for factors of the HLA system, update February 2010. Tissue Antigens (2010)

[124]Martin P J, Counts G W, Jr., Appelbaum F R, Lee S J, Sanders J E, Deeg H J, Flowers M E, Syrjala K L, Hansen J A, Storb R F, Storer B E: Life expectancy in patients surviving more than 5 years after hematopoietic cell transplantation. J Clin Oncol 28: 1011-1016 (2010)

[125]Mattsson R: The non-expression of MHC class II in trophoblast cells. Am J Reprod Immunol 40: 383-384 (1998)

[126]Mazzarino P, Pietra G, Vacca P, Falco M, Colau D, Coulie P, Moretta L, Mingari M C: Identification of effector-memory CMV-specific T lymphocytes that kill CMV-infected target cells in an HLA-E-restricted fashion. Eur J Immunol 35: 3240-3247 (2005)

[127]Megret F, Prehaud C, Lafage M, Moreau P, Rouas-Freiss N, Carosella E D, Lafon M: Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. Hum Immunol 68: 294-302 (2007)

[128]Meira-Machado L, de Una-Alvarez J, Cadarso-Suarez C, Andersen P K: Multi-state models for the analysis of time-to-event data. Stat Methods Med Res 18: 195-222 (2009)

[129]Mellor A L, Munn D H: IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol 4: 762-774 (2004)

[130]Michaelsson J, Teixeira de M C, Achour A, Lanier L L, Karre K, Soderstrom K: A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. J Exp Med 196: 1403-1414 (2002)

[131]Middleton D, Curran M, Maxwell L: Natural killer cells and their receptors. Transpl Immunol 10: 147-164 (2002)

[132]Mittelbronn M, Simon P, Loffler C, Capper D, Bunz B, Harter P, Schlaszus H, Schleich A, Tabatabai G, Goeppert B, Meyermann R, Weller M, Wischhusen J: Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8+ cells. J Neuroimmunol 189: 50-58 (2007)

[133]Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari M C, Moretta L: Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. Immunol Today 21: 228-234 (2000)

[134]Moretta A, Bottino C, Pende D, Tripodi G, Tambussi G, Viale O, Orengo A, Barbaresi M, Merli A, Ciccone E: Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. J Exp Med 172: 1589-1598 (1990)

[135]Moretta L, Romagnani C, Pietra G, Moretta A, Mingari M C: NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset. Trends Immunol 24: 136-143 (2003)

[136]Mullis K B, Faloona F A: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350 (1987)

[137]Mytilineos J, Lempert M, Scherer S, Schwarz V, Opelz G: Comparison of serological and DNA PCR-SSP typing results for HLA-A and HLA-B in 421 Black individuals: a Collaborative Transplant Study report. Hum Immunol 59: 512-517 (1998)

[138]Nattermann J, Nischalke H D, Hofmeister V, Kupfer B, Ahlenstiel G, Feldmann G, Rockstroh J, Weiss E H, Sauerbruch T, Spengler U: HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. Antivir Ther 10: 95-107 (2005)

[139]Nguyen S, Dhedin N, Vernant J P, Kuentz M, Al J A, Rouas-Freiss N, Carosella E D, Boudifa A, Debre P, Vieillard V: NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. Blood 105: 4135-4142 (2005)

[140]Novota P, Zinocker S, Norden J, Wang X N, Sviland L, Opitz L, Salinas-Riester G, Rolstad B, Dickinson A M, Walter L, Dressel R: Expression profiling of major histocompatibility and natural killer complex genes reveals candidates for controlling risk of graft versus host disease. PLoS One 6: e16582 (2011)

[141]O'Callaghan C A, Bell J I: Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. Immunol Rev 163: 129-138 (1998)

[142]Olerup O, Zetterquist H: HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. Tissue Antigens 37: 197-204 (1991)

[143]Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 39: 225-235 (1992)

[144]Oliveira C C, van Veelen P A, Querido B, de R A, Sluijter M, Laban S, Drijfhout J W, van der Burg S H, Offringa R, van H T: The nonpolymorphic MHC Qa-1b mediates CD8+ T cell surveillance of antigen-processing defects. J Exp Med 207: 207-221 (2010)

[145]Pappworth I Y, Wang E C, Rowe M: The switch from latent to productive infection in epstein-barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. J Virol 81: 474-482 (2007)

[146]Parham P: MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. Nat Rev Immunol 5: 201-214 (2005)

[147]Parmar S, Del L M, Zou Y, Patah P A, Liu P, Cano P, Rondon G, Pesoa S, de Padua S L, Qazilbash M H, Hosing C, Popat U, Kebriaei P, Shpall E J, Giralt S, Champlin R E, 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)

[148]Perreault C, Decary F, Brochu S, Gyger M, Belanger R, Roy D: Minor histocompatibility antigens. Blood 76: 1269-1280 (1990)

[149]Petersdorf E W: Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. Curr Opin Immunol 20: 588-593 (2008)

[150]Petersdorf E W, Longton G M, Anasetti C, Mickelson E M, Smith A G, Martin P J, Hansen J A: Definition of HLA-DQ as a transplantation antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 15358-15363 (1996)

[151]Petersdorf E W, Gooley T A, Anasetti C, Martin P J, Smith A G, Mickelson E M, Woolfrey A E, Hansen J A: Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. Blood 92: 3515-3520 (1998)

[152]Petrie E J, Clements C S, Lin J, Sullivan L C, Johnson D, Huyton T, Heroux A, Hoare H L, Beddoe T, Reid H H, Wilce M C, Brooks A G, Rossjohn J: CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. J Exp Med 205: 725-735 (2008)

[153]Pietra G, Romagnani C, Manzini C, Moretta L, Mingari M C: The emerging role of HLA-E-restricted CD8+ T lymphocytes in the adaptive immune response to pathogens and tumors. J Biomed Biotechnol 2010: 907092 (2010)

[154]Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P, Falco M, Millo E, Moretta A, Moretta L, Mingari M C: HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 10896-10901 (2003)

[155]Pietra G, Romagnani C, Falco M, Vitale M, Castriconi R, Pende D, Millo E, Anfossi S, Biassoni R, Moretta L, Mingari M C: The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. Eur J Immunol 31: 3687-3693 (2001)

[156]Pittari G, Fregni G, Roguet L, Garcia A, Vataire A L, Wittnebel S, Amsellem S, Chouaib S, Bourhis J H, Caignard A: Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. Bone Marrow Transplant 45: 862-871 (2010)

[157]Polanczyk M J, Hopke C, Vandenbark A A, Offner H: Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. J Neurosci Res 84: 370-378 (2006)

[158]Prober J M, Trainor G L, Dam R J, Hobbs F W, Robertson C W, Zagursky R J, Cocuzza A J, Jensen M A, Baumeister K: A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science 238: 336-341 (1987)

[159]Qiu Q, Yang M, Tsang B K, Gruslin A: Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal-fetal interface. J Reprod Immunol 65: 121-132 (2005)

[160]Ramzi M, Nourani H, Zakerinia M, Dehghani M, Vojdani R, Haghshenas M: Results of hematopoietic stem cell transplant in Shiraz: 15 years experience in southern Iran. Exp Clin Transplant 8: 61-65 (2010)

[161]Raulet D H, Vance R E, McMahon C W: Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. Annu Rev Immunol 19: 291-330 (2001)

[162]Raum E, Rothenbacher D, Stegmaier C, Ziegler H, Brenner H: Fünf Jahre ESTHER-Studie - eine erste Zwischenbilanz. Saarländisches Ärzteblatt 2/2006 (2013)

[163]Reisner Y, Martelli M F: Stem cell escalation enables HLA-disparate haematopoietic transplants in leukaemia patients. Immunol Today 20: 343-347 (1999)

[164]Ringden O, Remberger M, Runde V, Bornhauser M, Blau I W, Basara N, Holig K, Beelen D W, Hagglund H, Basu O, Ehninger G, Fauser A A: Peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. Blood 94: 455-464 (1999)

[165]Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer J G, Marsh S G: IMGT/HLA database: a sequence database for the human major histocompatibility complex. Tissue Antigens 55: 280-287 (2000)

[166]Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh S G: The IMGT/HLA database. Nucleic Acids Res 39: D1171-D1176 (2011)

[167]Robinson J, Waller M J, Fail S C, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh S G: The IMGT/HLA database. Nucleic Acids Res 37: D1013-D1017 (2009)

[168]Robinson J, Waller M J, Parham P, de G N, Bontrop R, Kennedy L J, Stoehr P, Marsh S G: IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. Nucleic Acids Res 31: 311-314 (2003)

[169]Rock K L, Goldberg A L: Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. Annu Rev Immunol 17: 739-779 (1999)

[170]Rodgers J R, Cook R G: MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. Nat Rev Immunol 5: 459-471 (2005)

[171]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)

[172]Rolph M S, Raupach B, Kobernick H H, Collins H L, Perarnau B, Lemonnier F A, Kaufmann S H: MHC class Ia-restricted T cells partially account for beta2-microglobulin-dependent resistance to Mycobacterium tuberculosis. Eur J Immunol 31: 1944-1949 (2001)

[173]Romagnani C, Pietra G, Falco M, Mazzarino P, Moretta L, Mingari M C: HLA-E-restricted recognition of human cytomegalovirus by a subset of cytolytic T lymphocytes. Hum Immunol 65: 437-445 (2004)

[174]Romagnani C, Pietra G, Falco M, Millo E, Mazzarino P, Biassoni R, Moretta A, Moretta L, Mingari M C: Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 11328-11333 (2002)

[175]Roth C, Carlyle J R, Takizawa H, Raulet D H: Clonal acquisition of inhibitory Ly49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC. Immunity 13: 143-153 (2000)

[176]Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Aversa F, Martelli M F, Velardi A: Natural killer cells as a therapeutic tool in mismatched transplantation. Best Pract Res Clin Haematol 17: 427-438 (2004)

[177]Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik W D, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli M F, Velardi A: Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science 295: 2097-2100 (2002)

[178]Salerno-Goncalves R, Fernandez-Vina M, Lewinsohn D M, Sztein M B: Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. J Immunol 173: 5852-5862 (2004)

[179]Sanger F, Nicklen S, Coulson A R: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 5463-5467 (1977)

[180]Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R: EUROCARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. Eur J Cancer 45: 931-991 (2009)

[181]Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F: Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. N Engl J Med 339: 1177-1185 (1998)

[182]Schirrmann T: Tumorspezifisches Targeting der humanen Natürlichen Killerzellinie YT durch Gentransfer chimärer Immunglobulin-T-Zellrezeptoren. (2005)

[183]Schlichting P, Christensen E, Andersen P K, Fauerholdt L, Juhl E, Poulsen H, Tygstrup N: Prognostic factors in cirrhosis identified by Cox's regression model. Hepatology 3: 889-895 (1983)

[184]Schön D, Betz J, Görsch B, Haberland J, Ziegler H, Stegmaier Ch, Eisinger B, Stabenow R: Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland. Robert-Koch-Institut (1999)

[185]Schreuder G M, Hurley C K, Marsh S G, Lau M, Fernandez-Vina M A, Noreen H J, Setterholm M, Maiers M: HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. Hum Immunol 66: 170-210 (2005)

[186]Schulte D, Vogel M, Langhans B, Kramer B, Korner C, Nischalke H D, Steinberg V, Michalk M, Berg T, Rockstroh J K, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J: The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. J Infect Dis 200: 1397-1401 (2009)

[187]Scrucca L, Santucci A, Aversa F: Competing risk analysis using R: an easy guide for clinicians. Bone Marrow Transplant 40: 381-387 (2007)

[188]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)

[189]Shawar S M, Vyas J M, Rodgers J R, Rich R R: Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. Annu Rev Immunol 12: 839-880 (1994)

[190]Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek M J, Storb R F, von Bergwelt-Baildon M S: The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. Blood 114: 4919-4927 (2009)

[191]Socie G, Blazar B R: Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. Blood 114: 4327-4336 (2009)

[192]Spellman S, Warden M B, Haagenson M, Pietz B C, Goulmy E, Warren E H, Wang T, Ellis T M: Effects of mismatching for minor histocompatibility antigens on clinical outcomes in HLA-matched, unrelated hematopoietic stem cell transplants. Biol Blood Marrow Transplant 15: 856-863 (2009)

[193]Steinle A, Li P, Morris D L, Groh V, Lanier L L, Strong R K, 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)

[194]Strong R K, Holmes M A, Li P, Braun L, Lee N, Geraghty D E: HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. J Biol Chem 278: 5082-5090 (2003)

[195]Sullivan L C, Clements C S, Rossjohn J, Brooks A G: The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. Tissue Antigens (2008)

[196]Sullivan L C, Clements C S, Beddoe T, Johnson D, Hoare H L, Lin J, Huyton T, Hopkins E J, Reid H H, Wilce M C, Kabat J, Borrego F, Coligan J E, Rossjohn J, Brooks A G: The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition. Immunity 27: 900-911 (2007)

[197]Symons H J, Fuchs E J: Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. Bone Marrow Transplant 42: 365-377 (2008)

[198]Tamouza R, Rocha V, Busson M, Fortier C, El Sherbini S M, Esperou H, Filion A, Socie G, Dulphy N, Krishnamoorthy R, Toubert A, Gluckman E, Charron D: Association of HLA-E polymorphism with severe bacterial infection and early transplant-related mortality in matched unrelated bone marrow transplantation. Transplantation 80: 140-144 (2005)

[199]Tamouza R, Busson M, Rocha V, Fortier C, Haddad Y, Brun M, Boukouaci W, Bleux H, Socie G, Krishnamoorthy R, Toubert A, Gluckman E, Charron D: Homozygous status for HLA-E*0103 confers protection from acute graft-versus-host disease and transplant-related mortality in HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. Transplantation 82: 1436-1440 (2006)

[200]Tiercy J M: Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. Transpl Immunol 9: 173-180 (2002)

[201]Tinckam K: Histocompatibility methods. Transplant Rev (Orlando) 23: 80-93 (2009)

[202]Tomasec P, Braud V M, Rickards C, Powell M B, McSharry B P, Gadola S, Cerundolo V, Borysiewicz L K, McMichael A J, Wilkinson G W: Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. Science 287: 1031 (2000)

[203]Tomasello E, Vivier E: KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. Eur J Immunol 35: 1670-1677 (2005)

[204]Toubai T, Paczesny S, Shono Y, Tanaka J, Lowler K P, Malter C T, Kasai M, Imamura M: Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Curr Stem Cell Res Ther 4: 252-259 (2009)

[205]Turpeinen H, Volin L, Partanen J: Domestic and foreign donor candidates result in differential probability of matching minor histocompatibility antigens--relevance of selection for hematopoietic stem cell transplantation. Tissue Antigens 73: 236-241 (2009)

[206]Ulbrecht M, Couturier A, Martinozzi S, Pla M, Srivastava R, Peterson P A, Weiss E H: Cell surface expression of HLA-E: interaction with human beta2-microglobulin and allelic differences. Eur J Immunol 29: 537-547 (1999)

[207]Vacchio M S, Hodes R J: Fetal expression of Fas ligand is necessary and sufficient for induction of CD8 T cell tolerance to the fetal antigen H-Y during pregnancy. J Immunol 174: 4657-4661 (2005)

[208]van Rood J J, Oudshoorn M: Eleven million donors in Bone Marrow Donors Worldwide! Time for reassessment? Bone Marrow Transplant 41: 1-9 (2008)

[209]Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Niokou D, Keramitsoglou T, Darlamitsou A, Tsekoura C, Papadimitropoulos M, Lepage V, Balafoutas C, Stavropoulos-Giokas C: Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. Am J Reprod Immunol 49: 183-191 (2003)

[210]Vitale C, Chiossone L, Morreale G, Lanino E, Cottalasso F, Moretti S, Dini G, Moretta L, Mingari M C: Human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation: analysis of the surface expression and function of activating NK receptors. Mol Immunol 42: 405-411 (2005)

[211]Wang E C, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz L K, Braud V M, Wilkinson G W: UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 7570-7575 (2002)

[212]Wei X H, Orr H T: Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. Hum Immunol 29: 131-142 (1990)

[213]Woolfrey A, Klein J P, Haagenson M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M, Gajewski J, Hale G A, Horan J, Battiwalla M, Marino S R, Setterholm M, Ringden O, Hurley C, Flomenberg N, Anasetti C, Fernandez-Vina M, Lee S J: HLA-C Antigen Mismatch Is Associated with Worse Outcome in Unrelated Donor Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant (2010)

[214]Yancik R, Ries L A: Cancer in older persons: an international issue in an aging world. Semin Oncol 31: 128-136 (2004)

[215]Yokoyama W M, Plougastel B F: Immune functions encoded by the natural killer gene complex. Nat Rev Immunol 3: 304-316 (2003)

[216]Yokoyama W M, Kim S: Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. Immunol Rev 214: 143-154 (2006)

[217]Zeiser R, Marks R, Bertz H, Finke J: Immunopathogenesis of acute graft-versus-host disease: implications for novel preventive and therapeutic strategies. Ann Hematol 83: 551-565 (2004)

[218]Ziegler A, Lange S, Bender R: Survival analysis: properties and Kaplan-Meier method. Dtsch Med Wochenschr 132 Suppl 1: 36-38 (2007)

[219]Ziegler A, Lange S, Bender R: Survival analysis: Cox regression. Dtsch Med Wochenschr 132 Suppl 1: 42-44 (2007)

DANKSAGUNG

Mit der Fertigstellung der Dissertationsschrift ist es an der Zeit nochmals denjenigen zu danken, die mich begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank gilt dabei zunächst Herrn Prof. H. Schrezenmeier und Herrn PD. J. Mytilineos. Sie gaben mir die Möglichkeit in der Abteilung des IKT meine Doktorarbeit zu absolvieren.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. H. Schrezenmeier, Herrn PD. J. Mytilineos, Herrn Dr. D. Fürst und bei *den Gutachtern* für die Begutachtung und Korrektur dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht insbesondere an Herrn Dr. Fürst D. für die sehr gute Betreuung bei den Laborarbeiten, die vielen Anregungen, Hilfestellungen und konstruktiven Kritiken beim Erstellen dieser Dissertation und für das immer offene Ohr, das er für mich hatte.

Mein Dank gilt auch Kirsten Recker und all den anderen Labormitarbeitern, die sich bei meiner Laborarbeit so hilfsbereit zeigten.

Als nächstes möchte ich meiner Schwester für die technische Unterstützung und insbesondere für den seelischen Beistand danken.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern für die unentwegte, gleichermaßen moralische wie tatkräftige Unterstützung sowohl während meines Studiums, als auch während meiner Dissertation zu tiefstem Dank verpflichtet. Ohne Ihre Hilfe läge diese Schrift sicher nicht vor. Ihnen sei die vorliegende Arbeit von ganzem Herzen gewidmet.

Ein liebes Dankeschön auch an meinen Hund Balko.

Lebenslauf

Name	Bindja Jovana	
geboren am	07. September 1983 in Stuttgart	
Schulbildung	1990-1994	Grundschule Raitelsberg Stuttgart
	1994-2003	Zeppelin-Gymnasium Stuttgart (Abitur:2,0)
	WS 2005	Beginn des Medizinstudiums Universität Szeged (Ungarn)
	Juni 2007	Ablegung des Physikums an der Universität Szeged (Ungarn)
	WS 2007	Beginn des klinischen Abschnitt des Studiums Humanmedizin an der Universität Ulm
	SS2011	2.Staatsexamen (Ulm)
Berufsausbildung	Januar 2012	Assistenzärztin in der Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitätsklinik Ulm
	Januar 2013	Assistenzärztin in der Inneren Medizin im Kreisklinikum Kirchheim unter Teck
Forschungsarbeit	SS 2009	Beginn der Dissertation Abteilung Transfusionsmedizin Ulm Leitung: Prof. Dr. H. Schrezenmeier
	Januar 2014	Promotionsabschluss
Famulaturen	Feb./März 2008	Unfallchirurgie Marienhospital Stuttgart(5 Wochen)
	Sept./Okt. 2008	Innere Medizin (Kardiologie/Pulmonologie) Universitätsklinikum Ulm Eselsberg (4 Wochen)
	Aug./Sept. 2009	Onkologie/Palliativmedizin-Gastroenterologie Tagesklinik Dr. M Respondek, Stuttgart (3 Wochen)

	Sept. 2009	Hals-Nasen-Ohren Praxis A. Nowack, Stuttgart (2 Wochen)
	März 2010	Anästhesiologie Tagesklinik Dres. A. Schäuffelen/H. Treiber (3 Wochen)
Wahlfächer	Anästhesie bei Herzoperationen – Narkoseführung und Monitoiring, Spezielle Pädiatrie – Blockwoche auf der Onkologiestation, Transfusionsmedizin – Herstellung von Blutprodukten u.a., Sonographie – Praktikum	
Praktika	Nov.2004 – Feb.2005	Innere Medizin (Pflegepraktikum) Kreiskrankenhaus Schorndorf (3 Monate)
	März 2005 – Mai 2005	Unfallchirurgie (Pflegepraktikum) Marienhospital Stuttgart (3 Monate)
Sonstiges	Okt. 2003 – Okt. 2004 Nov.2009 Dez.2009 - März 2010 Okt.2007 – Dez.2010	Kellnerin, Café MP, Willi-Bleicher-Str. 20, 70174 Stuttgart, (Vollzeit); wissenschaftl. Hilfskraft in der Abteilung Neurologie der Universität Ulm; wissenschaftl. Hilfskraft in der Abteilung Pathologie der Universität Ulm; Verkäuferin, Brezelbäckerei Ditsch, Blautalcenter Ulm, (Teilzeit)

Datum und Unterschrift