

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	3
1.1	STAMMZELLTRANSPLANTATION	3
1.1.1	<i>Konditionierungsregime</i>	5
1.2	GRAFT VERSUS HOST DISEASE	6
1.2.1	<i>Akute-Graft-versus-Host-Reaktion</i>	7
1.2.2	<i>Chronische-Graft-versus-Host-Reaktion</i>	9
1.2.3	<i>Bekannte Risikofaktoren für das Auftreten einer Graft versus Host Disease</i>	10
1.2.4	<i>Möglichkeiten der Prävention der Graft versus Host Disease durch Immunsuppressive Therapie</i>	11
1.3	DAS INTERLEUKIN 10	11
1.4	ZIELSETZUNG	15
2	MATERIAL	15
2.1	CHEMIKALIEN UND ENZYME	15
2.2	VERBRAUCHSMATERIAL	16
2.3	GERÄTE	16
2.4	KITS	17
2.5	SONDENASSAYS	17
2.6	PRIMER	17
2.6.1	<i>Primer für SNaPshot und SNP IL 10 -7400</i>	17
2.6.2	<i>Primer für Taqman Genotyping Assay</i>	18
2.7	PUFFER	18
2.8	SOFTWARE	19
2.9	DATENBANKEN	19
3	PATIENTENGUT UND METHODEN	20
3.1	PATIENTENGUT	20
3.1.1	<i>Patientenauswahl</i>	20
3.1.2	<i>Erfasste Daten</i>	20
3.1.3	<i>Einteilung in die Schweregrade der akuten Graft versus Host Disease</i>	21
3.1.4	<i>Einteilung in die Schweregrade der chronischen Graft versus Host Disease</i>	22
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	23
3.2.1	PCR	23
3.2.2	<i>Analyse des IL10 -7400-Genabschnittes mittels PCR</i>	26
3.2.3	<i>SNaPshotTM-Analyse</i>	28
3.2.4	<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays</i>	31
3.3	STATISTISCHE METHODEN	33
3.3.1	<i>Deskriptive Statistik</i>	33
3.3.2	<i>Anpassung des Parameters Spenderalter</i>	34
3.3.3	<i>Analytische Statistik</i>	35
4	ERGEBNISSE	39
4.1	DESKRIPTIVE STATISTIK	39
4.2	KLINISCHE VARIABLEN MIT EINFLUSS AUF DAS AUFTRETEN VON AGVHD UND CGVHD UND DIE ÜBERLEBENSZEIT	44
4.3	EINFLUSS VON SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS AUF DEN VERLAUF DER AGVHD UND DER CGVHD	48
4.4	HAPLOTYPENANALYSE UND KOMBINIERTER SNP-ANALYSE	56
4.5	EINFLUSS DER GENETISCHEN VARIABLEN AUF DIE ÜBERLEBENSZEIT	57
5	DISKUSSION	65
5.1	NEGATIVER EINFLUSS DER KLINISCHEN VARIABLEN HLA-MISMATCH, GESCHLECHT UND BEZIEHUNG ZUM SPENDER AUF DAS AUFTRETEN EINER SCHWEREN AKUTEN GVHD	66

5.2	STARK ERHÖHTES RISIKO FÜR EINE AKUTE GVHD DURCH DIE SPENDER-GENVARIANTE <i>IL 10 RA G351R AA</i>	68
5.3	PROTEKTIVER EFFEKT AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN DURCH DEN EMPFÄNGER-GENOTYP <i>RA G351R AA</i>	71
5.4	PROTEKTIVER EFFEKT DURCH DEN GENOTYP <i>-597 A</i> -ALLEL IM PATIENTEN IN KOMBINATION MIT DEM <i>RβK47E G</i> -ALLEL IM SPENDER.....	72
5.5	ERHÖHTES RISIKO FÜR EINE CHRONISCHE GVHD BEI VORHANDENSEIN DES DISTALEN HAPLOTYPS <i>A-A (-3538 (AT) UND -2763 (AC))</i>	74
5.6	NEGATIVER EINFLUSS DES GENOTYPS <i>-1087 GG</i> (PATIENT UND SPENDER) AUF DAS AUFTRETEN EINER CHRONISCHEN GVHD UND GEGENSÄTZLICHER EFFEKT DES GENOTYPS <i>-824 T</i> -ALLEL IM SPENDER	75
5.7	ERHÖHTE GVHD-ASSOZIIERTE MORTALITÄT DURCH DEN GENOTYP <i>-7400 DELINS</i> IM SPENDER BEI T-ZELL-DEPLETIERTEN PATIENTEN.....	77
5.8	AUSBLICK.....	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	78
7	ANHANG	81
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	81
7.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	82
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	83
7.4	GVHD-FRAGEBOGEN FÜR DIE KLINISCHE DATENERHEBUNG	86
7.5	SIGNIFIKANTE ERGEBNISSE IN TABELLENFORM	87
8	LITERATURVERZEICHNIS	93

1 Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation

Stammzelltransplantation (SZT) bedeutet die Übertragung von Stammzellen von einem Spender in einen Empfänger. Bei der autologen Stammzelltransplantation spendet der Patient vor einer Hochdosistherapie selber Stammzellen, die ihm nach der Therapie zurück infundiert werden. Bei der allogenen Stammzelltransplantation werden von einer anderen Person (Fremdspender oder aus der eigenen Familie) Stammzellen gespendet und dem Patienten ebenfalls nach einer Hochdosistherapie übertragen.

Die Indikation zu einer allogenen Stammzelltransplantation stellt sich zum Beispiel bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) in der ersten Remission bei Patienten mit einem Standard- oder Hochrisikokaryotyp (Schmid und Kolb 2007). Eine weitere Indikation stellt ein Rezidiv nach autologer SZT oder eine Akute Lymphatische Leukämie (ALL) in der zweiten Remission dar. Bei malignen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) stellt sich die Indikation zur allogenen STZ bei jüngeren Patienten mit aggressiven oder mehrfach rezidierten NHL (Buchholz 2009).

Nach der Indikationsstellung erfolgt die Suche eines passenden Spenders. Ein Familienspender (matched related donor, MRD), z.B. ein Geschwister, wird gegenüber einem Fremdspender (matched unrelated donor, MUD) bevorzugt. Die HLA-Typisierung überprüft 10 Loci (HLA-A, -B, -C und DRB1 und DQB1 mit jeweils 2 Allelen), die bei Spender und Empfänger übereinstimmen müssen. Wird für einen Patienten nur ein Spender mit 9 übereinstimmenden Loci anstatt 10 gefunden (HLA-mismatch), wird bei dringender Indikation auch diese Transplantation durchgeführt. Vor allem ein Mismatch des HLA-A-Lokus geht mit einem erhöhten Risiko für die nach der Stammzelltransplantation auftretenden Komplikationen der schweren akuten Graft versus Host Disease (GvHD), der chronischen GvHD und einer erhöhten Mortalität einher. Ein Mismatch auf DQ dagegen ist weder mit einer erhöhten Rate an akuter GvHD (aGvHD) noch mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Flomenberg et al. 2004).

Die Stammzellen des Spenders können direkt mittels Knochenmarkspunktion aus dem Knochenmark oder nach Stimulation durch die Gabe des Hormons G-CSF aus dem peripheren Blut des Spenders mittels Stammzellapherese gewonnen werden. Aufgrund der geringeren Morbidität für die Spender und der subjektiv geringeren Belastung wird meistens

die Gewinnung peripherer Blutstammzellen bevorzugt (Heldal et al. 2002). Prinzipiell sind auch andere Methoden wie z.B. die Verwendung von Stammzellen aus Nabelschnurvenenblut möglich. Bei diesem Verfahren wird ein Mismatch von bis zu 4 von 6 Antigenen (HLA-A, -B, -DR) toleriert (Jacobsohn et al. 2004).

Vor der Infusion der Stammzellen, erfolgt zur Vorbereitung (Konditionierung) des Empfängers eine Hochdosistherapie, wobei Protokolle der alleinigen intensiven Chemotherapie oder kombinierte Strahlen- und Chemotherapieprotokolle eingesetzt werden. Diese Therapie dient der Vernichtung der noch verbliebenen pathologischen Zellen und ist mit der Eradikation des hämatopoetischen Systems des Empfängers (Myoablation) verbunden. Bei älteren Patienten oder Patienten mit multiplen Begleiterkrankungen kann eine dosisreduzierte Konditionierung mit geminderter Toxizität durchgeführt werden (Welniak et al. 2007).

Nach Infusion der fremden Stammzellen wandern diese in die Knochenmarksräume ein und beginnen dort einzuwachsen. Der Patient befindet sich in dieser Phase in der Aplasie, da die eigene Blutbildung durch die Konditionierung zerstört wurde. Es besteht eine erhöhte, agranulozytosebedingte Anfälligkeit für bakterielle und mykotische Infekte bis hin zur Sepsis. Im Anschluss an die Aplasie erfolgt die Regeneration der Blutbildung und des Immunsystems.

Alloreaktive CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen sowie Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) des Spenders erkennen Zellen des Empfängers als fremd und haben zytolytische Effekte. Der Angriff auf die pathologischen Zellen des Empfängers wird als Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL-Effekt) bezeichnet und ist neben dem zytoreduktiven Effekt der Chemotherapie und Bestrahlung in der Konditionierung die immuntherapeutische Komponente der Therapie (Slavin et al. 1998). Der GvL-Effekt senkt wesentlich die Rezidivrate im Vergleich mit der autologen Stammzelltransplantation, bei der dieser Effekt fehlt (15% vs. 40%) (Bornhauser und Kienast 2008). Im Falle eines drohenden Rezidivs (Abfall des Spenderchimärismus) kann eine Infusion von Spenderlymphozyten den GvL-Effekt verstärken und eventuell das Auftreten eines klinisch apparenten Rezidivs verhindern. Die Erkennung von gesundem Gewebe als fremd und daraus folgend dessen inflammatorische Störung bezeichnet man als Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft versus Host Disease, GvHD). Diese Reaktion kann sehr schwer verlaufen und bis zum Tode des Patienten führen.

1.1.1 Konditionierungsregime

Die Hochdosistherapie (Konditionierungstherapie) zur Vernichtung der noch vorhandenen pathologischen Zellen wird üblicherweise nach einem der folgenden Schemata durchgeführt (Socié et al. 2001):

1 TBI/Cy

Ganzkörperbestrahlung	12	Gy
Cyclophosphamid	120	mg/kg KG

2 Bu/Cy

Busulfan	16	mg/kg KG
Cyclophosphamid	120	mg/kg KG

3 BEAM

BCNU	300	mg/m ²
Etoposid	200	mg/m ²
Cytabarin	200	mg/m ²
Melphalan	140	mg/m ² .

Der immuntherapeutische Effekt der allogenen Stammzelltransplantation beruht im Wesentlichen auf der Abtötung der verbliebenen bösartigen Zellen durch die T-Lymphozyten und NK-Zellen des Spenders. Deshalb ist es möglich, auch eine dosisreduzierte, weniger aggressive Konditionierungstherapie, das heißt eine Konditionierungstherapie mit reduzierter Intensität (reduced intensity conditioning, RIC) oder auch eine nicht myoablative Konditionierung (non myoablative conditioning, NMA) durchzuführen, und trotzdem den Effekt der allogenen Immunisierung zu nutzen (Slavin et al. 1998; Luger et al. 2008).

Diese Form der Konditionierung wird vor allem bei Patienten durchgeführt, die für eine Stammzelltransplantation mit einer myoablative Konditionierung auf Grund ihres höheren Alters, multipler Vortherapien oder vorhandener Komorbiditäten nicht in Frage kämen. Um diesen Patienten die Chance auf den Graft-versus-Leukemia-Effekt nicht vorzuenthalten, wurden 1997 und 1998 die ersten Studien mit einer dosisreduzierten Konditionierung durchgeführt (Slavin et al. 1998; Giral et al. 1997).

Es zeigte sich eine reduzierte extramedulläre Toxizität (wie zum Beispiel Mukositis, Sepsis, Venenverschlusskrankheit der Leber) sowie eine reduzierte transplantationsbedingte Frühsterblichkeit (Giral et al. 1997; Slavin et al. 1998; Hegenbart et al. 2006).

Schemata für die dosisreduzierte Konditionierung:

- 1 TBI 8 Gy fraktioniert + Fludarabin 120-150 mg/m² KOF (Stelljes et al. 2005)
- 2 Busulfan 8mg/kgKG + Fludarabin 150 mg/m² KOF (Slavin et al. 1998)
- 3 FLAMSA + TBI 4 Gy (Schmid et al. 2005).

Schemata für die nicht-myoablative Konditionierung:

- 1 TBI 2 Gy (Hegenbart et al. 2006)
- 2 TBI 2 Gy + Fludarabin 90mg/ m² KOF.

1.2 Graft versus Host Disease

Die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft versus Host Disease; GvHD) tritt als Komplikation der Stammzelltransplantation auf. Die immunkompetenten T-Zellen des Spenders, die im Transplantat enthalten sind, reagieren auf genetisch definierte Oberflächenproteine des Empfängers. Erstmals hat R.E. Billingham drei Voraussetzungen für das Entstehen der GvHD formuliert: Es müssen immunkompetente Zellen im Transplantat enthalten sein, der Empfänger muss Oberflächenantigene exprimieren, die der Spender nicht hat, und der Empfänger darf nicht in der Lage sein eine effektive Immunantwort zu generieren, um die transplantierten Zellen abzutöten (Billingham 1966).

Die wichtigsten Oberflächenmerkmale auf den Zellen sind die humanen Leukozyten-Antigene (HLA), von denen es zwei Klassen gibt: HLA-Klasse-1-Moleküle (HLA-A,-B und -C) werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während sich die HLA-Moleküle der Klasse 2 (HLA-DR,-DQ und -DP) nur auf den Oberflächen der hämatopoetischen Zellen befinden (zum Beispiel B-Zellen, Monozyten, etc.). Die Expression kann allerdings auch auf anderen Zellen durch Entzündungsreaktionen oder Verletzungen induziert werden. Heutzutage werden fast alle Transplantationen mit identischen Oberflächenmolekülen im HLA-System (Situation der HLA-Kompatibilität) durchgeführt. Über die Antigene im HLA-System hinaus gibt es allerdings zwischen zwei genetisch nicht identischen Individuen eine Vielzahl von genetischen Polymorphismen, die teilweise noch nicht bekannt sind. Diese Unterschiede können als immunologisch fremd erkannt werden und für eine Reaktion der Spender-T-Zellen auf die Zellen des Empfängers verantwortlich sein (Ferrara et al. 2009). Daraus resultiert, dass eine klinisch relevante akute GvHD im Schweregrad II-IV bei ca. 40% aller Patienten nach Transplantation mit Zellen eines HLA-kompatiblen Familienspenders

(matched related donor, MRD) oder eines HLA-identen Fremdspenders (matched unrelated donor, MUD) auftritt, wobei die Häufigkeit in bisher klinisch definierten Risikokonstellationen bis zu 80% betragen kann (Tiercy 2008; Edinger et al. 2009).

Eine milde Form der akuten Graft versus Host Disease (Grad I bis II) kann Ausdruck des gewünschten Therapieeffektes sein. Die T-Zellen im Transplantat greifen neben den gesunden Zellen des Empfängers auch die entarteten Zellen an und helfen so die Grunderkrankung (z.B. die Leukämie) zu bekämpfen. Dies nennt man Graft-versus-Leukemia-Effekt. Ein Problem entsteht dann, wenn diese Reaktion zu stark auftritt und mit ausgeprägten Organschädigungen verbunden ist (Grad III bis IV). Eine akute GvHD vom Schweregrad IV ist mit einer Mortalität von > 80% assoziiert (Jacobsohn und Vogelsang 2007).

Man unterteilt die GvHD in eine akute und eine chronische Form, die jeweils wieder in mehrere Schweregrade unterteilt werden. Die akute Form ist definiert als GvHD, die innerhalb von hundert Tagen nach der Transplantation auftritt. Die chronische Form manifestiert sich erst mehr als hundert Tage nach der Transplantation. Diese Einteilung kann allerdings nicht immer so klar getroffen werden. Das National Institute of Health hat deswegen in seine Klassifikation auch die Formen „Late onset acute GvHD“ (mehr als hundert Tage nach Transplantation) und „overlap syndrome“ (akute und chronische Elemente enthalten) mit aufgenommen (Filipovich et al. 2005). Ich habe mich in dieser Arbeit aufgrund der insgesamt geringen Fallzahlen und den daraus resultierenden kleinen Gruppengrößen, auf die alte Einteilung beschränkt.

1.2.1 Akute-Graft-versus-Host-Reaktion

Die akute GvHD tritt innerhalb der ersten hundert Tage nach der Stammzelltransplantation auf. Sie wird in vier Schweregrade unterteilt. Bei den Graden eins und zwei handelt es sich um milde bzw. moderate Formen der akuten GvHD. Die Schweregrade drei und vier gehen jedoch mit einer ausgeprägten, ggf. tödlich verlaufenden Reaktion einher. Der übergreifende Schweregrad setzt sich aus den Schweregraden der einzelnen betroffenen Organe zusammen. Klinisch manifestiert sich die akute Reaktion hauptsächlich an den drei Organen Haut, Darm und Leber.

Die Haut ist bei fast allen Patienten, die eine akute GvHD entwickeln, mitbetroffen. Cooke et al. haben einen Anteil von 81% Hautbeteiligung zu Beginn der GvHD beschrieben (Cooke et al. 1996). Die Haut ist meist auch das erste betroffene Organ und das Auftreten der Hautreaktion trifft gehäuft mit dem Anwachsen der Spenderzellen im Empfänger zusammen.

Charakteristisch ist ein makulopapulöser Ausschlag, der mit einem Juckreiz einhergeht und sich über den ganzen Körper ausbreiten kann (meist mit Ausnahme der Kopfhaut). In schwerwiegenden Fällen (akute GvHD Grad IV) kann es zu Ulzerationen und Blasenbildung der Haut kommen (Jacobsohn und Vogelsang 2007).

Die akute GvHD des Darmes manifestiert sich meist als wässrige, sekretorische Diarrhö mit über 500 ml Stuhl pro Tag. Blutige Diarrhöen sind ein Hinweis auf Schleimhautulzera und gehen mit einer schlechteren Prognose einher. Außerdem kann es zu Erbrechen und abdominellen Schmerzen bis hin zur Ileussyndromatik (Grad IV) kommen. Die Darmbeteiligung lässt sich am besten mit einer Darmbiopsie nachweisen, um andere Ursachen wie zum Beispiel bakterielle oder virale Infektionen auszuschließen. In der Biopsie lassen sich histologisch apoptotische Zellen an der Kryptenbasis und eine Abflachung bzw. ein Verlust des Oberflächenepithels nachweisen.

Die Veränderungen an der Leber durch die GvHD können schwer von anderen Ursachen der Leberschädigung, zum Beispiel durch die Lebervenen-Verschlusskrankheit (Veno-occlusive Disease, VOD), zu unterscheiden sein. Es kommt zu einer Cholestase-bedingten Hyperbilirubinämie, deren Höhe auch als Einteilungsmarker für die Schweregrade verwendet wird (Bilirubin > 15mg/dl bei Grad IV). Des Weiteren kann die GvHD-Reaktion auch mit Lymphozyten-Infiltration und Pericholangitis einhergehen (Jacobsohn und Vogelsang 2007).

Pathophysiologisch handelt es sich bei der akuten GvHD um eine normale, aber überschießende Immunreaktion, angetrieben durch die infundierten Spender-Lymphozyten, die in der fremden Umgebung unangemessen funktionieren. Die Entstehung der aGvHD kann in drei Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase kommt es zur Aktivierung der Antigen präsentierenden Zellen (Antigen Presenting Cells, APC) zum einen durch die Grunderkrankung und zusätzlich durch die Konditionierung vor der Stammzelltransplantation (SZT). Zerstörtes Gewebe im Empfänger reagiert mit bestimmten Gefahrensignalen, zum Beispiel der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α) und einer vermehrten Expression von costimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von Empfänger-APCs. Die Stärke der Zytokinausschüttung kann von entsprechenden genetischen Variationen des Empfängers abhängen. Fehlende antiinflammatorische Faktoren würden hier fatal sein.

In der zweiten Phase der aGvHD kommt es zur Proliferation und Differenzierung der Spender-Lymphozyten als Reaktion auf die APC des Empfängers. Regulatorische T-Zellen sind in der Lage die Proliferation der T-Zellen zu unterdrücken, und haben in Tiermodellen

sogar zu einer Unterdrückung der aGvHD geführt. Regulatorische T-Zellen produzieren anti-inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin 10 (IL 10), welches eine wichtige Rolle in der Suppression der Immunantwort spielt.

In der Phase drei der akuten GvHD kommt es zu einer komplexen Kaskade von zellulären Mediatoren (v.a. zytotoxische T-Zellen und Natural Killer Cells) und löslichen inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL 1, etc.), die sich ergänzen und zu einer gesteigerten Zerstörung von Gewebe im Empfänger führen (Ferrara et al. 2009).

Die GvHD ist also auf ein dereguliertes Zytokinnetzwerk zurückzuführen, das vereinfacht aus Typ I-Zytokinen (Interleukin-2 (IL 2), Interferon- γ (IFN- γ)) und den Typ II-Zytokinen (IL 4, IL 10, IL 13) besteht und sowohl die Art als auch die Intensität der Zell-vermittelten Immunantwort und systemischen Entzündungsreaktion nach allogener Transplantation hämatopoetischer Zellen mitbestimmt. Die erwähnten Typ II-Zytokine hemmen im Wesentlichen die Produktion sogenannter proinflammatorischer Zytokine (IL 1, IL 6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)). Eine nicht ausreichende Typ II-Zytokinantwort nach allogener Transplantation hämatopoetischer Zellen könnte mitverantwortlich sein, dass die initiale T-Zell-Antwort gegen Empfängeralloantigene zu intensiv abläuft und der oben erwähnte Zytokinsturm nicht unterbunden werden kann.

1.2.2 Chronische-Graft-versus-Host-Reaktion

Die Chronische GvHD tritt im Allgemeinen zwischen 3 und 24 Monaten nach der allogenen Stammzelltransplantation auf. Sie ist in ihrer Pathophysiologie sehr viel schlechter verstanden als die akute GvHD. Dennoch sind 30-70 % der mit allogenen Stammzellen transplantierten Patienten davon betroffen und müssen über einen langen Zeitraum immunsuppressive Medikamente erhalten. Auch können schwere Verläufe der chronischen GvHD bei Beteiligung kritischer Organe wie insbesondere der Lunge mit erheblicher Morbidität und Mortalität verbunden sein (Filipovich et al. 2005). Neben den negativen Effekten wie zum Beispiel einer schlechteren Lebensqualität und längerer medikamentöser Therapie (und somit erhöhter Therapie-assoziiertes Mortalität) ist die cGvHD aber auch mit einer geringeren Leukämie-Rezidiv-Rate assoziiert. Die cGvHD kann sich zum einen aus einer akuten GvHD heraus entwickeln (fließender Übergang oder mit einer Phase der kompletten Genesung von der aGvHD dazwischen) oder de novo, ohne eine vorangehende aGvHD, entstehen. Die klinische Manifestation der cGvHD ist sehr variabel und ähnelt einer systemischen

Autoimmunerkrankung, die potentiell jedes Organ betreffen kann. Häufig betroffen sind die Haut (Lichen-Planus-Symptome, Hyperkeratose, Poikiloderma, Depigmentation, Fibrose, Sklerose), die Leber (Cholestase, Zirrhose), die Augen (Sicca-Syndrom, Konjunktivitis), der Mund (Xerostomie, Ulzerationen, Hyperkeratotische Plaques), der obere Respirationstrakt (Husten, Dyspnoe, Pneumothorax, Bronchiolitis obliterans), der Ösophagus (Strikturen) und seltener der untere Gastrointestinaltrakt (Malabsorption, chronische Diarrhö), die Haare (Alopezie), das weibliche Genitale (vaginale Sklerose, Ulzerationen), die Hämatopoese (Thrombozytopenie, Lymphopenie, Eosinophilie, Autoantikörper) und die Muskeln und Gelenke (Arthritis, Gelenkversteifungen, Myositis, Tendinitis) (Ferrara et al. 2009). Die Chronische GvHD wird in zwei Schweregrade unterteilt, die limitierte und die extensive Form. Diese Unterteilung wurde bereits 1980 entwickelt und dient als Entscheidungshilfe für oder gegen eine ausgedehnte Immunsuppressive Therapie. Bei der limitierten Form treten nur lokalisierte Beschwerden an der Haut zum Beispiel im Sinne einer Lichen Planus-Symptomatik oder diskrete Leberveränderungen auf, die ausreichend mit einer lokalen Therapie behandelt werden können. Die extensive Form beinhaltet einen generalisierten Hautbefall oder die Beteiligung eines anderen Organs außer der Leber und bedarf einer intensiven immunsuppressiven Therapie (Filipovich et al. 2005).

1.2.3 Bekannte Risikofaktoren für das Auftreten einer Graft versus Host Disease

Aus den Konstellationen von Spender und Empfänger sind aus empirischen Analysen eine Reihe von klinischen Parametern bekannt, die mit dem Risiko für das Auftreten einer GvHD assoziiert sind: auf Seiten des Spenders das Lebensalter, das Geschlecht (weiblicher Spender bei männlichem Empfänger als Risikofaktor), Alloimmunisierung und die Art der gespendeten Zellen (KM versus PBSZT): auf Seiten des Empfängers ebenfalls das Lebensalter, die Intensität der Konditionierungstherapie (myoablativ versus dosisreduziert) und die Form der Immunsuppression nach allogener SZT (Hahn et al. 2008; Tseng et al. 2009). Trotz dieser Erkenntnisse ist allerdings auch heute eine verlässliche Vorhersage zum Auftreten einer GvHD nicht möglich.

1.2.4 Möglichkeiten der Prävention der Graft versus Host Disease durch Immunsuppressive Therapie

Die GvHD-Prophylaxe der Patienten unseres Kollektivs erfolgte einheitlich mit einem Calcineurin-Antagonisten (Ciclosporin oder Tacrolimus) sowie Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil für einen definierten Zeitraum nach Transplantation. In der Situation der MUD Transplantation erhielt die Mehrzahl der Patienten zusätzlich ATG zur T-Zell-Depletion (139 der 225 MUD-transplantierten erhielten ATG). Patienten mit einem Multiplen Myelom erhielten ATG-F, Patienten mit einer anderen Grunderkrankung erhielten Thymoglobulin. Der weitere Verlauf und insbesondere die Medikation nach Transplantation sind, in Abhängigkeit vom Auftreten von GvHD oder anderweitiger Komplikationen, unterschiedlich.

1.3 Das Interleukin 10

Das Interleukin 10 gehört innerhalb der Zytokine (Botenstoffe des Immunsystems) zu der Familie der Interleukine. Es zählt zusammen mit TGF- β zu den wichtigsten antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Modulation eines Entzündungsgeschehens, indem es eine überschießende Immunantwort verhindert. Interleukin 10 spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Immuntoleranz. Seine Produktion erfolgt überwiegend durch Monozyten und in geringeren Maßen durch TH2- und regulatorische Lymphozyten (Mosser und Zhang 2008).

Durch IL 10 kommt es zu einer Herunterregulation von MHC Klasse 2 und Kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche, womit die Fähigkeit antigenpräsentierender Zellen zur Antigenpräsentation supprimiert wird. Interleukin 10 bewirkt außerdem eine Hemmung der Produktion proinflammatorischer Faktoren wie Interferon α , TNF- α , IL 1 α und -1 β , IL 6 und IL 12 sowie eine Suppression der Transkription von NF- κ B (Mosser und Zhang 2008).

Eine prä-therapeutisch erhöhte IL-10-Produktion von peripheren Blutleukozyten bei Transplantationspatienten ist mit einer geringen Inzidenz von GvHD und Transplantationsverbundener Sterblichkeit assoziiert. Dies deutet darauf hin, dass Transplantatempfänger mit einer hohen Fähigkeit zur Expression von IL 10 weniger Gefahr laufen, eine GvHD zu entwickeln (Holler et al. 2000).

Neben der Fähigkeit von IL 10 als Wachstumsfaktor bei aggressiven Lymphomen zu agieren (Stasi et al. 1994; Blay et al. 1993; Lech-Maranda et al. 2006), ist dieses Zytokin auch ein wesentliches Element des Netzwerkes der Regulation der Balance zwischen T-Helfer -Zellen der Typen 1 (TH1) und 2 (TH2) (Moore et al. 2001). Interleukin 10 ist als ein potenter Hemmstoff für alloantigen-spezifische T-Zellen von besonderer Bedeutung für das Verständnis der zweiten und dritten Phase der akuten GvHD.

Das IL-10-Gen befindet sich auf Chromosom 1q31/32 und gehört zu der IL-10-Genfamilie, zu der außerdem IL 19, IL 20 und IL 24 auf Chromosom 1q31/32, aber auch IL 22, IL 26 auf Chromosom 12q15 neben dem Interferon- γ Gen sowie IL 28a, IL 28b und IL 29 auf Chromosom 19q13 zählen (Fickenscher et al. 2002).

Polymorphismen in der Promoterregion des IL-10-Gens wurden mit der Intensität der akuten GvHD und dem Überleben nach allogener SZT in Verbindung gebracht.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten proximalen IL-10-Genpolymorphismen zusammengefasst, die in der Literatur bereits im Zusammenhang mit einer Transplantation hämatopoetischer Zellen untersucht wurden.

	Position auf Chromsom 1	
-597 AC	205013030	rs1800872
-824 CT	205013257	rs1800871
-1087 AG	205013520	rs1800896
IL-10.G Mikrosatellit		
- 2726 AC	205015176	rs6693899
- 2812 AG	205015262	rs6703630
-3538 AT	205015988	rs1800890
IL-10.R Mikrosatellit		

Tabelle 1: *IL-10-Genvariationen der 5'-flankierenden Region des IL-10-Genes. Angegeben sind Genvariationen, die Positionen bezogen auf den bekannten Transkriptionsstart des IL 10, die Positionen auf Chromosom 1q31/32 sowie die inzwischen gebräuchlichen rs-Nummern des HapMap-Konsortiums. Für die genannten Mikrosatelliten gibt es keine rs-Nummern.*

Die proximalen SNPs bei *-1087AG*, *-824CT* und *-597AC* sind die am Besten charakterisierten Genvariationen des IL-10-Genes und bilden im Wesentlichen die drei Haplotypen ATA, GCC und ACC (*-1087AG,-824CT,-597AC*) (Crawley et al. 1999; Mörmann et al. 2004; Turner et al. 1997) Aufgeführt sind auch die *IL-10.R* und *IL-10.G* CA-Dinukleotidrepeats (Mikrosatelliten), die in frühen Analysen zu Risikofaktoren bei Transplantation

hämatopoetischer Zellen analysiert wurden (Middleton et al. 1998; Cavet et al. 1999; Keen et al. 2004).

Bei der Analyse der Assoziation des klinischen Verlaufs bei aggressiven NHL mit Zytokingenvariationen waren eher distale SNPs aussagekräftiger und sollen deshalb in dieser Arbeit im Vergleich zu den proximalen SNPs analysiert werden.

In Abbildung 1 sind schematisch Details des Chromosomenlokus 1q31/32 dargestellt, die zeigen, wie die Gene für IL 10, IL 19, IL 20 und IL 24 zueinander positioniert sind und wie das HapMap-Konsortium sich die genetischen Elemente derzeit vorstellt.

Die Polymorphismen, die derzeit bearbeitet werden, liegen zwischen Chromosom-1-Position 205006527 (*IL-10+5876*), 205013030 (*IL-10-597*) und 205025210 (*IL-10-12806*) und bilden damit einen Bereich von mehr als 13kbp ab. Dies ist aber nur ein Bruchteil dieses Teils des Chromosom 1q31/32.

Der Bereich um den Transkriptionsstart der IL-19-Variante 1 liegt „relativ nah“ an der distalen 5'- flankierenden Region des IL-10-Genes. Hier befindet sich der zum IL-10-Gen zählende SNP bei *-12806* (rs17015865 Chr. Pos. 205025210). Dieser SNP wird als sogenannter tag-SNP beim HapMap-Konsortium geführt. Tag-SNPs können bei Genotypisierungsstudien als „Leitgenvariationen“ angesehen werden, die nach einem neu entwickelten Algorithmus ermittelt werden und repräsentativ die entsprechenden Regionen abdecken sollen.

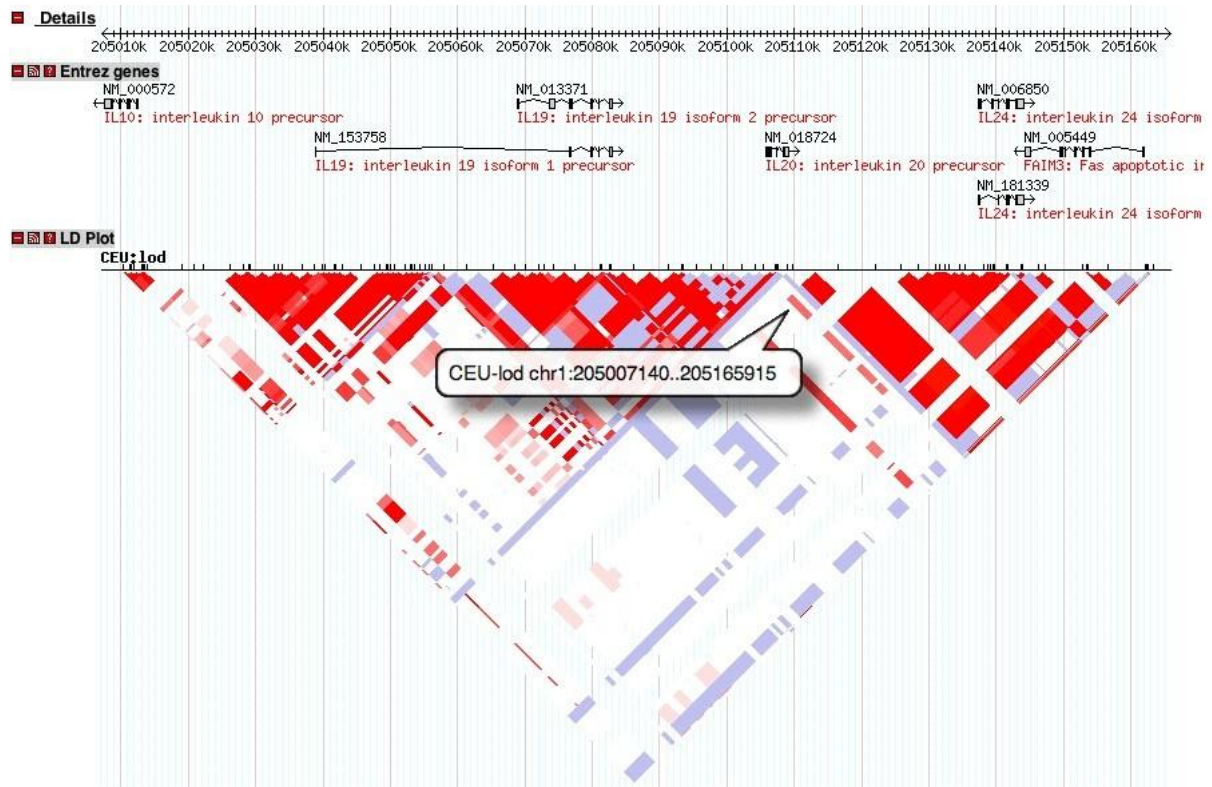


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Chromosomenlokus 1q31/32. Gezeigt sind die offenen Leseraster für IL 10, IL 19, IL 20 und IL 24 (Entrez genes) sowie die vom HapMap-Konsortium ermittelten Haplotypen bei Kaukasiern. Unter dem Punkt „Details“ ist ein numerischer Ausschnitt von Chromosom 1 dargestellt. Gezeigt sind die Positionen für die IL-10-Genfamilienmitglieder IL 10, IL 19, IL 20 und IL 24. Darunter (entrez genes) sind die offenen Leseraster der Gene für IL 10, die beiden Varianten für IL 19, sowie IL 20 und IL 24 abgebildet. Im sogenannten „LD Plot“ sind die Haplotypblöcke dargestellt, die für die IL 10, IL 19, IL 20 und IL-24-Gene innerhalb der HapMap-Kaukasier beobachtet wurden. Dunkelrote Flächen weisen auf eine komplette (>95%) Kopplung der Genvarianten hin, hellblau bedeutet fast nicht gekoppelt und weiße Felder zeigen noch nicht ausreichend untersuchte Variationen innerhalb von HapMap oder fehlende Kopplung an. Das in der Mitte des LD-Plots gezeigte „popup“ Fensters zeigt noch einmal die genauen Positionen des dargestellten Abschnitts von Chromosom 1. Die IL-19-Variante 1 (NM153758) hat ihren Transkriptionsstartpunkt bei Position 205038838 auf Chromosom 1, die IL-19-Variante 2 (NM013371) respektiv bei 205068845. Für IL 24 wurden auch 2 Varianten beschrieben, die jedoch beide den gleichen Transkriptionsstart haben.

Der IL-10-Rezeptor besteht aus 2 Unterheiten: R α und R β . Die Bindung von IL 10 an den Rezeptorkomplex aktiviert die Janus Tyrosin Kinase welches zu einer Phosphorylierung im Rezeptor führt. Diese Phosphorylierung resultiert in der Homodimerisation von STAT3, dessen Abspaltung vom Rezeptor und anschließende Translokation in den Nukleus. Dort bindet das STAT3 Homodimer an das STAT-binding-Element in der Promotorregion verschiedener Gene. Eines dieser Gene ist IL 10 selbst, wo die Bindung des STAT3 Homodimer zu einer positiven Rückkopplung der IL-10-Produktion führt.

Die IL-10R β -Kette wird auch von anderen Mitgliedern der IL-10-Familie genutzt. Hierzu zählen IL 22, IL 26 und die Interferone IL 29, IL 28A, sowie IL 28B. Somit ist der IL-10R β eine gemeinsam genutzte Rezeptorkette für die meisten der so genannten Klasse II-Zytokine (Renauld 2003).

Für die IL-10-Rezeptoreinheiten IL-10R α und IL-10R β wurden verschiedene Genvarianten beschrieben, die sowohl im 5' - nichttranslatierten Bereich möglicherweise die Expression beeinflussen, aber auch nichtsynonyme SNPs in kodierenden Bereichen konnten identifiziert werden. Die dabei beobachteten Aminosäureaustausche können zum Teil Einfluss auf die Bindung von Interleukin 10 haben oder die Aktivierung von STAT3 beeinflussen.

1.4 Zielsetzung

In der allogenen Stammzelltransplantation sind aus empirischen Analysen in den Konstellationen von Spender und Empfänger eine Reihe von klinischen Parametern bekannt, die über die HLA-Kompatibilität hinaus mit dem Auftreten einer GvHD assoziiert sind. Trotz dieser Erkenntnisse ist allerdings auch heute eine verlässliche Vorhersage zum Auftreten einer GvHD nicht möglich. Es ist daher von außerordentlichem Interesse, molekulare Prädiktoren für das Auftreten und die Ausprägung der GvHD zu finden. Es gibt umfangreiche Hinweise, dass Zytokin-vermittelte Entzündungsmediatoren von zentraler Bedeutung für den Verlauf der Transplantation und der Tumorerkrankung sind. Die individuelle genetische Ausstattung von Spender und Empfänger kann auf diese Prozesse Einfluss nehmen. Das Ziel dieser Arbeit war es, genetische Polymorphismen im Zytokinprofil von Spender und Empfänger zu identifizieren, die als prognostische oder prädiktive Faktoren in der allogenen Stammzelltransplantation dienen können. Hierzu wurden zunächst die individuelle genetische Ausstattung von Spender und Empfänger (N=360/respektiv) für Zytokingene und deren Rezeptoren aus der IL-10/IL-10R-Familie analysiert. Durch entsprechende epidemiologische und statistische Analysen mit Bezug zum klinischen Verlauf sollten Assoziationen mit dem Auftreten von GvHD identifiziert sowie mögliche Interaktionen zwischen den untersuchten Genvarianten charakterisiert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
dNTP-Set	Promega
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt

GeneScan™ LIZ® 120 Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
HiDi-Lösung (enthält Formamid)	Applied Biosystems, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Exonuklease 1	USB, Staufen
Platinum Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB, Staufen

2.2 Verbrauchsmaterial

dH2O	
Filter Tips	Starlab, Ahrensburg
PCR-Folien	Abgene, Epsom
PCR Softtubes Flachdeckel 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen (10µ, 100µ, 1000µ)	Sarstedt, Nümbrecht
Platten, Thermo fast 384-Well	Abgene, Epsom
Platten, Thermo fast 96-Well	Abgene, Epsom
Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatte	Applied Biosystems, Darmstadt
Spitzen für Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Sterile Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
TaqMan Adhesive Optical Covers	Applied Biosystems, Darmstadt

2.3 Geräte

Inkubator Function line	Heraeus, Hanau
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (384-Well), Typ Master-Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (96-Well)	MJResearch/BioRad, Hercules, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sequenzierer Genetic Analyzer 3130	Applied Biosystems, Darmstadt

TaqMan 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermocycler T3000 mit Heizdeckel	Biometra, Göttingen
Vortexer	IKA, Staufen
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

2.4 Kits

SNaPshot [®] Multiplex Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix 100 RXN	USB, Staufen
TaqMan [®] Genotyping Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

2.5 Sondenassays

TaqMan [®] SNP Genotyping Assay	Applied Biosystems, Darmstadt
--	-------------------------------

2.6 Primer

2.6.1 Primer für SNaPshot und SNP IL 10 -7400

Gen Variation	rs Nummer	Allele	Primer
IL 10 -12kb	rs17015865 rs4072227 rs4072226		fwd: CTGTCCCAGCTCACAGATCA rev: GTTTCACGAAAGCGGCTAAG
IL 10 -3kb	rs1800890 rs6703630 rs6693899		fwd: TATTTTGGAGCAGGGATGGA rev: ATGTCAGGGAGAAGGGAGGT
IL 10 +4kb	rs3024498 rs3024505		fwd: AAGCCTGACCACGCTTTCTA rev: AAACCTGACCACAGCCTGTCC
TNF			fwd : CTGTGGGGAGAACAAAAGGA rev: CATTCAACCAGCGGAAAACCT
IL 10 -12806	rs17015865	C/T	GACTAGATCGATCGATCGATTATGTTTGTG

			TTCCATGGGT
IL10 -11777	rs4072227	A/G	AGCCCTTGGATTATTGATGC
IL10 -11668	rs4072226	A/G	GATCGATCGATCGATCGTACGATCAGCCTG AGCCAGTCAGTCTTTCTACT
IL 10 -3538	rs1800890	A/T	GATCGATCGATCGATCCAGTACATCCCCCA CTGGAAAAAT
IL10 - 2849	rs6703630	A/G	GATCGGTCTCGATCTCCTGACCTTATGATC
IL10 2763neu		A/C	AACACAGTGAACCCCTCTCTAATAAAAATA CAAAA
IL 10 + 4259	rs3024498	A/G	GATCCTGGTTTCTCTTCCTAAGAGTATTTG
IL10- rs3024505	rs3024505		TCGATCGATCGATCAGCCCAGGCAGAGCGT GAGGG

IL10-7400 forward	GAAGGAACATCTGAGCTGAGAGCT
IL10-7400 reverse neu	TTGAACTCCTAGGCTCAAGTAATCCT

2.6.2 Primer für Taqman Genotyping Assay

Gen Variation	rs Nummer	Allele	Primer
IL 10 - 6208	rs10494879	G (Vic)/C (Fam)	C 26593071 10
IL 10 -3538	rs1800890	T (Vic)/A (Fam)	C 8828790 10
IL 10 -1087	rs1800896	A (Vic)/G (Fam)	C 1747360 10
IL 10 -824	rs1800871	C (Vic)/T (Fam)	Vic: AGGTGATGTAACATCT Fam: AGGTGATGTAACATCT
IL 10 -597	rs1800872	A (Vic)/C (Fam)	Vic: CTGGCTTCCTACAGTAC Fam: TGGCTTCCTACAGGAC

2.7 Puffer

Srimp Alkaline Phosphatase-Puffer 10xRxBuf	USB,Staufen
---	-------------

PCR-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
------------	----------------------------

2.8 Software

3100 Data Collection Software Version 1.0 (Applied Biosystems): Erhebung von Daten mit dem 3100 Genetic Analyser Sequenzierer

GeneMapper ID Version 3.2 (Applied Biosystems):

MS-Office (Microsoft GmbH): Programme für Textverarbeitung und Tabellenkalkulation

PHASE-Software Version 2.1 (<http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>): Programm zur Berechnung und Rekonstruktion von Haplotypen

SDS 2.1 (Applied Biosystems): Auswertung von Expressionsmessungen, die mit dem TaqMan 7900HT gemacht wurden

SPSS: Statistische Auswertung auf mögliche Assoziationen und deren grafische Darstellung

2.9 Datenbanken

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Die NCBI (National Center for Biotechnology Information) ist eine Unterorganisation des National Institut of Health (NIH) und ermöglicht den Zugang zu wichtigen DNA-, RNA-, und Protein-Datenbanken. Sie enthält unter anderem auch die Standard-Literatur-Datenbank PubMed. Für meine Arbeit waren vor allem Informationen zu genetischen Polymorphismen und der Graft versus Host Disease relevant.

HapMap-Projekt (<http://www.hapmap.org>)

Das HapMap Projekt ist eine Zusammenarbeit mehrerer Länder zur Kartographierung von Haplotypen des menschlichen Genoms. Das Ziel ist die Identifizierung ähnlicher genetischer

Varianten in den einzelnen chromosomalen Regionen verschiedener Individuen durch einen Vergleich genetischer Sequenzen. Diese Informationen sollen helfen genetische Varianten zu identifizieren, die bei bestimmten Erkrankungen mit einem erhöhten Risiko verknüpft sind.

3 Patientengut und Methoden

3.1 Patientengut

3.1.1 Patientenauswahl

Insgesamt wurden die Daten von 360 Patienten erfasst, die in dem Zeitraum von Januar 2001 bis Februar 2011 an dem Universitätsklinikum Göttingen eine allogene Stammzelltransplantation als Therapie erhielten. Die Krankheitsbilder der Patienten umfassten: Akute Leukämie, Chronische Lymphatische Leukämie, Chronische Myeloische Leukämie, Lymphome und einige wenige andere Krankheitsbilder wie zum Beispiel das Multiple Myelom. Eingeschlossen wurden nur Patienten, die erstmalig eine allogene Stammzelltransplantation erhielten. Bei 34 der 360 Patienten lagen keine Blutproben zur Analyse der genetischen Daten vor, sodass diese bei der gemeinsamen Analyse der klinischen und genetischen Daten nicht mit eingeschlossen wurden.

3.1.2 Erfasste Daten

Für jeden Patienten wurden, nach Einholung eines zustimmenden Votums der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen, insgesamt 25 Parameter aus den Krankenakten an einem nicht-internetfähigen Computer in anonymisierter Form erfasst. Dafür wurden sowohl elektronisch verfügbare Arztbriefe als auch labordiagnostische Dokumentationen verwendet. Noch fehlende Daten wurden unter Einhaltung des Datenschutzes den archivierten Akten entnommen. Sämtliche Daten gingen in eine Tabelle des MS-Excel-Tabellenkalkulationsprogramms (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) ein.

Neben der Erfassung der persönlichen Daten wie Geburtsdatum, Geschlecht und einer Namensverschlüsselung wurden vor allem die die Transplantation betreffenden Daten erfasst. Die Grunderkrankung des Empfängers wurde ebenso wie der Zeitpunkt der Transplantation

(früh, mittel oder spät in der Therapie) in die Tabelle aufgenommen. Den Empfängern wurde, ebenfalls in verschlüsselter Form, ein Spender samt Geschlecht und Alter zum Zeitpunkt der Spende zugeordnet und die Stammzellquelle (Knochenmark oder peripheres Blut) notiert. Des Weiteren wurde eine Unterteilung in eine Familien-allogene Transplantation und eine Fremdspende vorgenommen und ein gegebenenfalls vorhandener Unterschied in einem der 10 wichtigsten HLA-Merkmale erfasst (HLA-mismatch). Ebenso wurde eine nicht myoablative Konditionierung und eine der Transplantation vorangestellte T-Zell-Depletion mit Hilfe des Medikaments ATG (Thymoglobulin) dokumentiert. Um dies später bei der statistischen Auswertung berücksichtigen zu können, wurden zur GvHD-Prophylaxe verabreichte Medikamente (Tacrolimus, Cyclosporin A, Methotrexat, Mycophenolat mofetil) aufgeführt. Als wichtiger Parameter wurde der Todeszeitpunkt, wenn dieses Ereignis schon eingetroffen war, notiert und GvHD als Ursache erfasst. Letzten Endes fand eine Einteilung der Patienten in die Schweregrade der akuten sowie der chronischen GvHD statt.

3.1.3 Einteilung in die Schweregrade der akuten Graft versus Host Disease

Die Einteilung in die Schweregrade der akuten GvHD erfolgte anhand einer Einteilung der Consensus Conference on Acute GVHD Grading von 1994 an der University of Texas MD Anderson Cancer Center in Houston (Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hovs J, Thomas ED.). (Tabelle 2)

Das Ausmaß des Hautbefalls wurde in Prozent gemessen. Für die Beeinträchtigung der Leber ist in dieser Einteilung die Höhe des Bilirubins entscheidend und für den Darm die Menge an Stuhl pro Tag.

Stage	Skin	Liver (bilirubin)	Gut (Stool output/day)
0	No GVHD rash	< 2 mg/dl	< 500 ml/day or persistent nausea.
1	Maculopapular rash < 25% BSA	2–3 mg/dl	500–999 ml/day
2	Maculopapular rash 25 – 50% BSA	3.1–6 mg/dl	1000–1500 ml/day
3	Maculopapular rash > 50% BSA	6.1–15 mg/dl	Adult: >1500 ml/day
4	Generalized erythroderma plus bullous formation	>15 mg/dl	Severe abdominal pain with or without ileus
Grade			
I	Stage 1–2	None	None
II	Stage 3 or	Stage 1 or	Stage 1
III	-	Stage 2–3 or	Stage 2–4
IV	Stage 4 or	Stage 4	-

Tabelle 2: Ausmaß der Organbeteiligung und Einteilung der Schweregrade der akuten GvHD
© 2007 Jacobsohn and Vogelsang; licensee BioMed Central Ltd.

3.1.4 Einteilung in die Schweregrade der chronischen Graft versus Host Disease

Die chronische GvHD kann prinzipiell jedes Organ befallen, und die Einteilung ist daher komplizierter als bei der akuten GvHD. Die aktuelle Einteilung der zwei Schweregrade „Limited“ und „Extensive“ erfolgt nach einer Studie von Sullivan et al. aus dem Jahre 1980 in Seattle an 20 Patienten mit chronischer GvHD. Sie wird bis heute von der International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) und dem National Marrow Donor Program (NMDP) benutzt, um den Schweregrad der chronischen GvHD zu melden. Die limitierte Form

(limited) der chronischen GvHD beschränkt sich auf eine lokalisierte Reaktion der Haut oder der Leber. Die ausgeprägtere Form (extensive) präsentiert sich mit einem generalisierten Befall der Haut oder einer limitierten Form zusammen mit einem Befall eines weiteren Organs (nicht Leber oder Haut). Organe, die neben der Leber und der Haut häufig im Rahmen einer ausgeprägten cGvHD befallen werden, umfassen die Augen, den Mund, den Gastrointestinaltrakt und die Lunge sowie seltener die Genitalien, die Haare oder die Gelenke.

Es wurde ein Fragebogen entwickelt, um den Schweregrad der akuten sowie der chronischen GvHD für jeden Patienten zu erfassen. (Fragebogen im Anhang)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Segmentes. Voraussetzung ist die Kenntnis zumindest von Teilen der interessierenden DNA-Sequenz.

Das Prinzip der PCR besteht aus den Schritten Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation). Bei 95°C erfolgt die Denaturierung der Matrizen-DNA. Nach Abkühlung auf ca.55°C (je nach Primer zu optimierende Temperatur) binden in der Annealing-Phase die spezifischen Primer (Oligonukleotide) an den zu amplifizierenden Bereich der komplementären Einzelstränge der Matrizen-DNA. In der folgenden Phase der Elongation dienen die Primer als Starter für die DNA-Polymerase-Reaktion. Die Synthese erfolgt bei 72°C durch die hitzestabile Taq-Polymerase in 5'→ 3'- Richtung entlang der einzelnen Matrizenstränge mit Hilfe der zugegebenen deoxy-Nukleotidtriphosphat-Bausteine (dNTPs). Die drei Phasen der PCR (Denaturierung, Annealing, Elongation) werden zyklisch (40-45 Zyklen) durchlaufen, wobei die Zyklusanzahl primerspezifisch ermittelt wird, um die Amplifizierungsausbeute zu optimieren. In jedem Zyklus erfolgt im Optimalfall eine Verdopplung der DNA-Moleküle.

Ziel: PCR der Fragmente innerhalb des IL-10 Gens für die spätere SNaPshot Multiplex: IL-10-3538, IL-10-2849, IL-10-2763

Reagenz	Menge	Firma
dNTPs (100mM)	1 µl	Promega
10xPCR-Puffer	5 µl	Invitrogen
MgCl ₂ (25mM)	2 µl	Invitrogen
SNPshot-IL-10-fw (10µM)	1 µl	IBA
SNPshot-IL-10-rev (10µM)	1 µl	IBA
Taq-Polymerase 5U/µl	0,1 µl	Invitrogen
H ₂ O	ad 25 µl (inklusive 5µl DNA)	

Tabelle 3: Pipettierschema für den MasterMix für PCR IL 10 –3000bp

Ziel: PCR der Fragmente innerhalb des TNF Gens für die spätere SNaPshot Multiplex: TNF – 308 und TNF -238

Reagenz	Menge	Firma
dNTPs (100mM)	1 µl	Promega
10xPCR-Puffer	5 µl	Invitrogen
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl	Invitrogen
SNPshot-TNF-fw (10µM)	1 µl	IBA
SNPshot_TNF-rev (10µM)	1 µl	IBA
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1 µl	Invitrogen
H ₂ O	ad 25 µl (inklusive 5µl DNA)	

Tabelle 4: Pipettierschema für den MasterMix für PCR TNF –300bp

Ziel: PCR des Fragmentes um +4259 und +5876 des IL 10 Gens für die spätere SnaP-Shot Multiplex +4259 und +5876

Reagenz	Menge	Firma
dNTPs (100mM)	1 µl	Promega
10xPCR-Puffer	5 µl	Invitrogen
MgCl ₂ (25mM)	2 µl	Invitrogen
IL 10 exon-5 fwd (10µM)	1 µl	IBA
IL 10 exon-5 rev (10µM)	1 µl	IBA
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1 µl	Invitrogen
H ₂ O	ad 25 µl (inklusive 5µl DNA)	

Tabelle 5: Pipettierschema für den MasterMix für PCR IL 10 +5000bp

Ziel: PCR des Fragmentes um -11000 bis -12800bp des IL 10 Gens für die spätere SNaP-Shot Multiplex: -11668, -11777, -12806

Reagenz	Menge	Firma
dNTPs (100mM)	1 µl	Promega
10xPCR-Puffer	5 µl	Invitrogen
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl	Invitrogen
IL10-12800-fwd (10µM)	1 µl	IBA
IL10-12800-rev (10µM)	1 µl	IBA
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1 µl	Invitrogen
H ₂ O	ad 25 µl (inklusive 5µl DNA)	

Tabelle 6: Pipettierschema für den MasterMix für PCR IL 10 -12000bp

Der IL-10–MasterMix wurde für die jeweilige PCR mit entsprechenden Primern nach oben beschriebenem Ansatz unter der PCR-Hood (25µl Ansatz) pipettiert und gemischt.

Primer	Sequenz
SNPshot-IL10-fw (-3kb)	TATTTTGGAGCAGGGATGGA
SNPshot-IL10-rev (-3kb)	ATGTCAGGGAGAAGGGAGGT
SNPshot-TNF-fw	CTGTGGGGAGAACAAAAGGA
SNPshot-TNF-rev	CATTCAACCAGCGGAAAAC
IL 10 exon-5 fwd (+4kb)	AAGCCTGACCACGCTTTCTA
IL 10 exon-5 rev (+4kb)	AAACTGACCACAGCCTGTCC
IL10-12800-fwd CT	CTGTCCCAGCTCACAGATCA
IL10-12800-rev CT	GTTTCACGAAAGCGGCTAAG

Tabelle 7: Primer mit ihren Sequenzen

Primer Stocks sind 100µM, mussten also mit dH₂O 1:10 verdünnt werden.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 ng DNA (5µl). Nach Zentrifugation des gesamten Ansatzes wurde zur Durchführung der PCR ein Thermocycler (Biometra) mit Heizdeckel verwendet. Für den Thermocycler galten die in Tabelle 8 gezeigten Bedingungen. Die Temperatur für das erste Annealing ist für den jeweiligen Primer spezifisch.

Programm: Variabel (1): IL10-3KB (3)

Heizdeckel 99°C Vorlauf Ein

Phase	Zeit	Temperatur °C	Wiederholungen
1. Denaturation	5 min	95	1
2. Annealing	3 min	X	1
3. Elongation	3 min	72	1
4. Denaturation	1 min	95	50
5. Annealing	1 min	X	50
6. Elongation	2 min	72	50
7. Elongation	10 min	72	1
8. Pause	∞	4	

Tabelle 8: Thermocyclerbedingungen für die durchgeführte PCR

IL 10 -3000bp X =60 °C

TNF -300bp X =57 °C

IL 10 +5000bp X =65 °C

IL 10 -12000bp X =63 °C

3.2.2 Analyse des IL10 -7400-Genabschnittes mittels PCR

Die Analyse dieses SNPs erfolgte mittels einer PCR und nicht durch eine SNaPshot Reaktion oder ein SNP-Assay of TaqMan®.

Ziel: Amplifikation und Analyse des IL10 -7400 Genabschnittes auf Insertion oder Deletion

Der Mix für die PCR wurde nach folgendem Ansatz unter der PCR-Hood (25µl Ansatz) pipettiert und gemischt:

Produkt	Pro Reaktion [µl]	Firma
dNTP (10mM)	0,5	Invitrogen
Puffer (10x)	2,5	
MgCl ₂ (25mM)	2	
IL10-7400forward (5µM)	0,4	IBA

IL10-7400reverse neu (5µM)	0,4	IBA
Platinum Taq (5U/µl)	0,1	Invitrogen
H2O	ad 25 µl (inklusive DNA)	

Tabelle 9: Mix für die PCR-Analyse des IL 10 –7400-Genabschnittes

Primer	Sequenz
IL10-7400forward	GAAGGAACATCTGAGCTGAGAGCT
IL10-7400reverse neu	TTGAACTCCTAGGCTCAAGTAATCCT

Tabelle 10: Primersequenzen

Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 ng DNA. Nach Zentrifugation des gesamten Ansatzes wurde zur Durchführung der PCR ein Thermocycler (Biometra) mit Heizdeckel verwendet. Für den Thermocycler galten die in Tabelle 11 gezeigten Bedingungen.

Phase	Zeit	Temperatur °C	Wiederholungen
1. Denaturation	30 sek.	96	25
2. Annealing	20 sek.	64	25
3. Elongation	15 sek.	72	25
4. Denaturation	30 sek.	96	10
5. Annealing	45 sek.	60	10
6. Elongation	20 sek.	72	10
7. Elongation	1 h	72	1
8. Pause	∞	4	

Tabelle 11: Programm für den Thermocycler

Die Analyse erfolgte ebenso wie bei der SNaPshot-Reaktion im Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Es wurde je 1µl des Reaktionsproduktes (verdaut DNA) mit 10µl Formamid (versetzt mit 0,15 µl des Längenstandard ROX400) in eine 96-Well-Platte pipettiert und für 5 min. bei 95°C im 96-Well-Cycler denaturiert. Zur Vermeidung der Renaturierung wurde die Platte im Anschluss unmittelbar für 10 min. auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben im Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) analysiert.

3.2.3 SNaPshot™-Analyse

Die SNaPshot™-Analyse ist eine PCR-gestützte Methode zur Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs). Zunächst erfolgt die Amplifikation eines DNA-Abschnittes mittels PCR. Anschließend erfolgt in einer zweiten PCR-Amplifikation die Zugabe spezifischer Primer, die direkt vor den zu identifizierenden SNPs binden und eine Base davor enden. Durch die Zugabe von Dideoxynukleotiden (ddNTPs), die mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe versehen sind, erfolgt nach dem ersten Baseneinbau ein Amplifikationsstopp. Es entstehen Produkte, die die Länge des Primers plus eine Base aufweisen. Das eingebaute ddNTP ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, wodurch eine anschließende Analyse anhand des sequenzspezifischen Farbsignals ermöglicht wird.

Im ersten Schritt wurden die PCR-Fragmente aufgereinigt und von den noch verbliebenen Primern und nicht eingebauten dNTPs befreit. Dazu wurden je 5µl des PCR-Produktes (5µl II10 + 5µl TNF oder IL10 -12000 + 5000) mit 5µl der MasterMix-Aufreinigung versetzt. Die MasterMix-Aufreinigung enthält 3,3µl Srimp Alkaline Phosphatase (SAP, 1U/µl) und den dazugehörigen SAP-Puffer (1,5µl) sowie 0,2µl des Restriktionsenzym Exonuklease (Exo1, baut einzelsträngige DNA ab, z.B. Primer, 10U/µl).

Produkt	Pro Reaktion [µl]	Firma
10xRxBuf (SAP-Puffer)	1,5	USB
SAP 1U/µl	3,3	USB
Exo I 10U/µl	0,2	USB

Tabelle 12: *MasterMix-Aufreinigung*

Dieser Ansatz wurde unter der PCR-Hood in die Vierer–Strips pipettiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C für eine Stunde inkubiert (Verdau) und die Enzyme anschließend bei 80°C für 15min. inaktiviert.

Die im Anschluss durchgeführte SNaPshot™-Reaktion ermöglichte die Bestimmung mehrerer unterschiedlicher SNPs gleichzeitig. Als Voraussetzung mussten die SNPs jedoch nahe beieinander liegen (1000-1500 Basen dazwischen).

2µl des durch den Verdau aufgereinigten PCR-Produktes wurden mit 1,86 µl H₂O, 0,64 µl SNaPshot™ Multiplex Ready Reaction Mix und 0,5 µl eines selbsthergestellten Pooled Primer Mix versetzt (Gesamtvolumen 5µl) und jeweils in einen Well einer 384-Well-Platte gegeben. Anschließend erfolgte die SNaPshot-PCR im 384-Well Cyler (Firma Eppendorf).

Produkt	Pro Reaktion [µl]	Firma
H ₂ O	1,86	
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix 100 RXN	0,64	USB
Pooled Primer Mix	0,5	Selbst hergestellt
Total	3	
+ PCR Produkt aufgereinigt	2	

Tabelle 13: *Mix für SNaPshot Reaktion*

Phase	Zeit	Temperatur °C	Wiederholungen
1. Denaturation	10 min	95	24
2. Annealing	5 min	50	24
3. Elongation	30 min	60	24
4. Pause	∞	4	

Tabelle 14: *Programm für den 384-Well-Cycler für die SNaPshot-PCR*

Produkt	1x [µl]	Sequenz
H ₂ O	90,5	
SNaPshot IL10-3538 AT	2	GATCGATCGATCGATCCAGTACATCCCCACTGGA AAAAT
SNaPshot IL10-2849 AG	2	GATCGGTCTCGATCTCCTGACCTTATGATC
SNaPshot IL10 2763neu AC	1,5	AACACAGTGAACCCCTCTCTAATAAAAATACAAAA
SNaPshot TNF –308	2	GATCGAATAGGTTTTGAGGGGCATG
SNaPshot TNF –238	2	ACTCCCCATCCTCCCTGCTC
Total	100	

Tabelle 15: *Pooled Primer Mix TNF/IL-10*

Produkt	1x [µl]	Sequenz
H2O	89,5	
SNaPshot IL10-12806 CT	2,5	GACTAGATCGATCGATCGATTATGTTTGTGTTCCA TGGGT
SNaPshot IL10-11777 AG	2	AGCCCTTGGATTATTGATGC
SNaPshot IL10-11668 AG	2	GATCGATCGATCGATCGTACGATCAGCCTGAGCC AGTCAGTCTTTCTACT
SNaPshot IL10+545Ex5 (+4259)	2	GATCCTGGTTTCTCTTCCTAAGAGTATTTG
IL10- rs3024505	2	TCGATCGATCGATCAGCCCAGGCAGAGCGTGAGG G
Total	100	

Tabelle 16: Pooled Primer Mix IL-10-12800/+4259

Zur Entfernung der restlichen ddNTPs fand nach der SNaPshot™-Reaktion ein zweiter Verdau zur erneuten Aufreinigung statt. Der Ansatz wurde dazu mit 0,5 µl SAP und 0,5µl SAP-Puffer für eine Stunde bei 37°C im 384-Well-Cycler (Eppendorf) inkubiert und anschließend bei 80°C für 15min. inaktiviert.

Produkt	Pro Reaktion [µl]
10RxBuf (SAP-Puffer)	0,5
SAP 1U/µl	0,5
Total	1

Tabelle 17: Aufreinigung nach SNaPshot-Reaktion

Für den Nachweis der SNaPshot™-Reaktion im Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) wurde je 1µl des Reaktionsproduktes (verdaute DNA) mit 10µl Formamid (versetzt mit 0,1 µl des Längenstandard Gene Scan™-120LIZ Size Standard) in eine 96-Well-Platte pipettiert und für 5min. bei 95°C im 96-Well-Cycler denaturiert. Zur Vermeidung der Renaturierung wurde die Platte im Anschluss unmittelbar für 10min. auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben im Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) analysiert und manuell ausgewertet.

Produkt	Pro Reaktion [μ l]	Firma
Formamid (HIDI)	9,9	Applied Biosystems
Gene Scan TM -120LIZ [®] Size Standard	0,1	Applied Biosystems (Part No: 4322362)
Total	10	
+ verdaute DNA	1	

Tabelle 18: Vorbereitung für den Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems)

3.2.4 TaqMan[®] SNP Genotyping Assays

TaqMan[®] ist ein Sonden-basiertes Verfahren. Ein sequenzspezifisches Oligonukleotid (Sonde) bindet an den Bereich der DNA, der zuvor mittels spezifischer Primer in einer normalen PCR amplifiziert wurde. An die beiden Enden der Sonde sind Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt. Am 5'-Ende der Sonde befindet sich der Reporter-Farbstoff (FAM-Farbstoff oder VIC-Farbstoff), am 3'-Ende bindet ein weiteres Fluorophor, der sogenannte Quencher. An das 3'-Ende der Sonde wird zusätzlich ein *minor groove binder* gekoppelt, der eine besonders feste Bindung der Sonde an die kleinen Schleifen (*minor grooves*) der DNA ermöglicht. Der FAM/VIC-Fluoreszenzfarbstoff wird durch einen Laser angeregt (= Exzitation) und strahlt Licht einer anderen Wellenlänge (= Emission) wieder ab. Durch diese Emission des Reporters wird der Quencher angeregt und strahlt ebenfalls Licht ab. Liegen Quencher und Reporter in räumlicher Nähe zueinander, wie es auf der Sonde der Fall ist, unterdrückt der Quencher das Signal des Reporters (FRET-Prinzip = *fluorescence resonance energy transfer*). Gleichzeitig mit den Sonden, die an die denaturierte DNA binden, werden Primer hinzugegeben. Diese binden ebenfalls an die DNA, und durch die Aktivität der Taq-Polymerase beginnt die Synthese eines komplementären DNA-Strangs. Im Zuge des Nukleotideinbaus kommt es zum Abspalten des Reporters von der Sonde. Durch die räumliche Trennung von Quencher und Reporter wird das Reporter-Signal nicht mehr durch den Quencher unterdrückt und dadurch messbar.

Bei den TaqMan[®] SNP Genotyping Assays, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden jeweils 2 Sonden hinzugegeben. Eine Sonde war mit dem VIC-Farbstoff markiert und die zweite mit dem FAM-Farbstoff. Die Sonde mit der passenden komplementären Base band an die Matrizen- DNA, und nach Abtrennung des Reporter-Farbstoffes vom Quencher wurde Licht in der Wellenlänge des entsprechenden Farbstoffes abgestrahlt und mittels GeneMapper ID v3.2 ausgewertet.

Befindet sich an der entsprechenden Stelle auf der DNA überall die gleiche Base, leuchtet nur ein Farbstoff auf (Homozygotie). Befinden sich an dieser Stelle auf den verschiedenen DNA-Strängen unterschiedliche Basen, können beide Sonden binden, und beide Farbstoffe strahlen Licht ab (Heterozygotie). Mit diesem Verfahren lässt sich bestimmen, welche Base sich an einer bestimmten Stelle der DNA befindet.

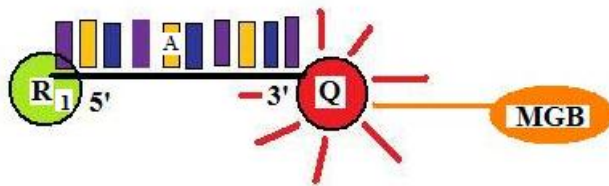


Abbildung 2: Die Sonde. Das Signal des Quencher unterdrückt das Reporter-Signal. R1=Reporter-Farbstoff VIC, Q=Quencher, MGB= Minor Groove Binder

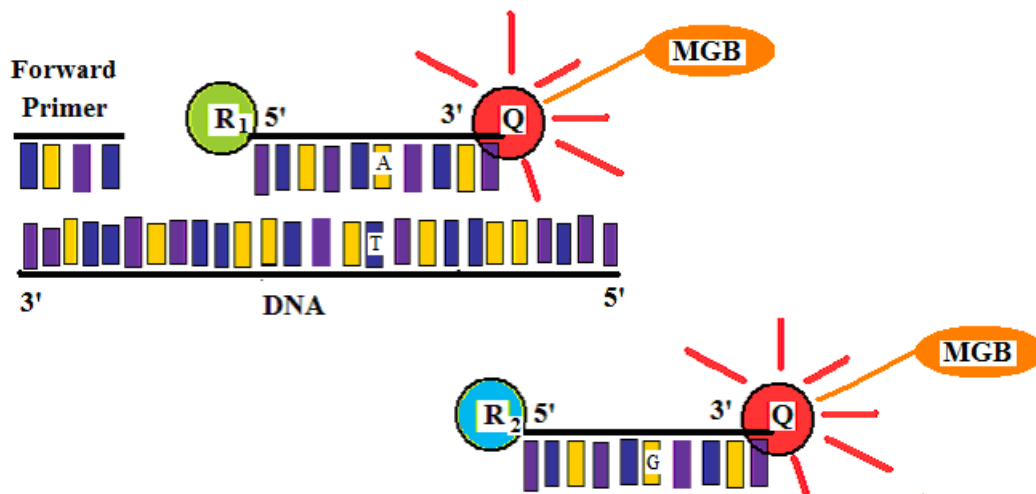


Abbildung 3: Der Primer bindet an die DNA, die bereits die passende Sonde gebunden hat. R2=Reporter-Farbstoff FAM

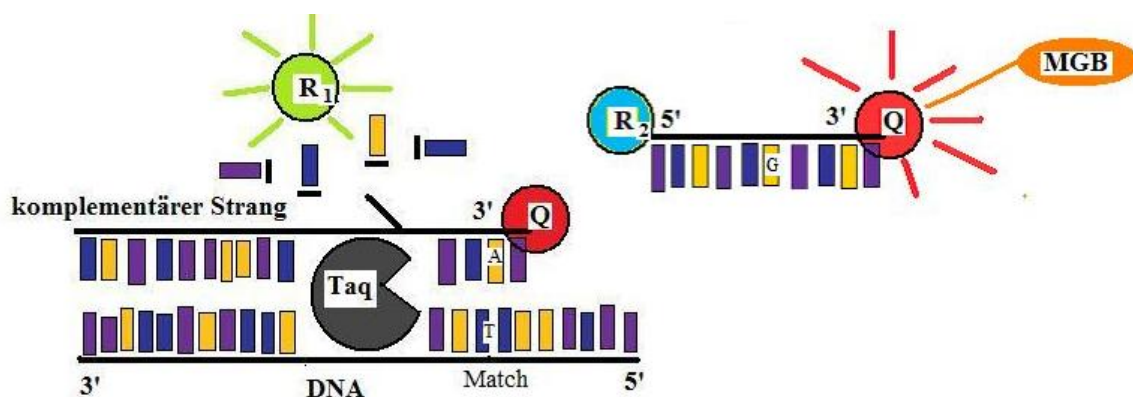


Abbildung 4: Der Reporter wird vom Quencher getrennt und das Reporter-Signal (VIC) wird messbar. Das Signal des zweiten Reporters (FAM) bleibt weiterhin durch den Quencher unterdrückt. Taq= Taq Polymerase

Für die SNP-Assays wurde das fertige TaqMan® SNP Genotyping Assay der Firma Applied Biosystems verwendet.

Produkt	Pro Reaktion [μ l]	Firma
TaqMan® Genotyping Master Mix (2x)	2,5	Applied Biosystems
TaqMan® SNP Genotyping Assay (40x)	0,125	Applied Biosystems
Destilliertes H ₂ O	1,375	
TOTAL	4	

Tabelle 19: *Mix für das SNP-Assay mit dem TaqMan® SNP Genotyping Assay*

Der Mix wurde wie in Tabelle 19 beschrieben zusammen pipettiert und mit einer Multipipette auf einer 384-Well-Platte verteilt (4 μ l/Well). Anschließend wurde in jeden Well 1 μ l DNA (Konzentration 10ng/ μ l) hinzu gegeben. Die 384-Well-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und in den 384-Well-Cycler (Eppendorf) überführt, wo die PCR stattfand.

Die allelische Diskriminierung Endpunktauswertung erfolgte mit Hilfe der SDS 2.1 – Software im 7900HT (Applied Biosystems).

Phase	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
1. Denaturation	10 min.	95°C	1x
2. Denaturation	15 sec.	92°C	40x
3. Annealing und Elongation	1 min.	60°C	40x
4. Pause	∞	8°C	

Tabelle 20: *Programm für die PCR im 384-Well-Cycler*

3.3 Statistische Methoden

3.3.1 Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik dient der Ordnung der erfassten Daten in Graphiken und Tabellen, um eine bessere Übersicht zu schaffen. Die Möglichkeiten zur deskriptiven Zusammenfassung der gesammelten Daten beinhalten die tabellarische Auflistung, die

grafische Darstellung und die Berechnung von statistischen Kennwerten wie Lage- und Streuungsmaß. In dieser Arbeit wurde zur Veranschaulichung die tabellarische Auflistung der Daten gewählt. Es erfolgte die Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Form von Häufigkeitstabellen, in denen die absolute ($h(x)$, x = Ausprägung) sowie die relative Häufigkeit ($f(x) = h(x)/N$, N = Gesamtzahl der Beobachtungen) innerhalb eines Parameters (z.B. Alter des Patienten) erfasst wird.

3.3.2 Anpassung des Parameters Spenderalter

Der Parameter Alter (Patienten und Spender) wurde zuerst anderen Studien zu diesem Thema folgend in drei äquidistante Gruppen aufgeteilt ($< 20 = 0$, $20-40 = 1$, $>40 = 2$). Der Altersdurchschnitt des untersuchten Patientenkollektivs lag allerdings bei über 40 Jahren, und nur drei der Patienten ließen sich der Gruppe der unter 20-jährigen zuordnen. Aus diesem Grund erfolgte eine Änderung dieser Einteilung in nicht-äquidistante Gruppen gleicher Gruppengröße anhand der Häufigkeit des Alters. Das Alter in der Patientengruppe reicht von 17 bis 70 Jahre mit einem Durchschnittsalter von 48 Jahren. Schnittpunkte wurden bei 43 und 58 Jahren gesetzt (17 – 43 Jahre = Gruppe 0 (130 Patienten), 44 – 58 Jahre = Gruppe 1 (118 Patienten), 59 – 70 Jahre = Gruppe 2 (110 Patienten)).

Diese Änderungen wurden ebenfalls bei der Einteilung des Spenderalters vorgenommen. Das minimale Spenderalter lag bei 16 Jahren, das maximale bei 78 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 41 Jahren. Die Schnittpunkte wurden in dieser Gruppe bei 32 und 49 Jahren gesetzt (16 – 32 = Gruppe 0 (104 Spender), 33 – 49 = Gruppe 1 (101 Spender), 50 – 78 = Gruppe 2 (97 Spender)).

Bei 58 der Patienten war kein Alter des Spenders verfügbar. Um die Verwendung dieser Patientendaten zu ermöglichen, erfolgte die Zuteilung der fehlenden Variable (Spenderalter) nach dem Zufallsprinzip. Die verfügbaren Spenderalter wurden in Abhängigkeit von dem Patientenalter aufgetragen, um einen Hinweis auf eventuell vorhandene Muster in der Alterspaarung Spender/Patient zu erhalten. Das Streudiagramm (siehe Abbildung 5) zeigte jedoch kein für die Alterszuteilung verwendbares Muster. Das Alter des Spenders zeigt keinen Bezug zu dem Alter des Patienten. Eine gewisse Selektion in Bezug auf das Alter findet bei den Fremdspendern statt, da Spender ab 55 Jahren nicht mehr in die Spenderdatei aufgenommen werden.

Die Zuweisung der fehlenden Spenderalter erfolgte letztendlich durch eine zufällige Zuteilung eines Spenderalters von einem anderen Patienten der selben Gruppe. Bei diesem Verfahren

werden die Proportionen der Gruppen nicht verändert. Für jeden Patienten ist theoretisch jedes Spenderalter möglich. Die verhältnismäßig häufiger vorhandenen Altersgruppen der Spender werden auch bei den zugeteilten Spenderaltern auf Grund einer erhöhten Zufallswahrscheinlichkeit vermehrt vorhanden sein.

(z.B.: Patient 31 Jahre alt → Gruppe 1 → Zuteilung eines Spenderalters von einem anderen Patienten der Gruppe 1 per Zufall, Spenderalter kann in der Gruppe 0, 1 oder 2 liegen)

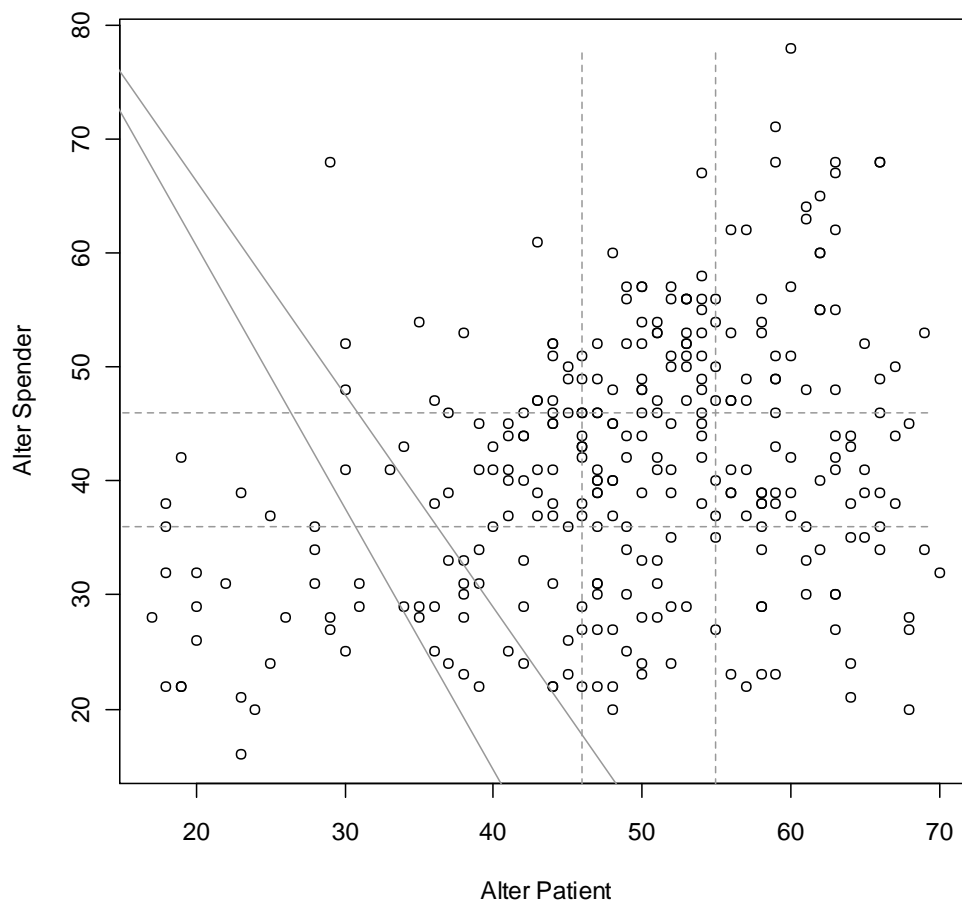


Abbildung 5: Patientenalter (in Jahren) in Abhängigkeit des Spenderalters, Daten von Paaren mit verfügbarem Patienten- und Spenderalter ($n=302$)

° : Paar Patient-Spender

---- : Schnittpunkte (Patientenalter bei 43 und 58 Jahren, Spenderalter bei 32 und 49 Jahren)

3.3.3 Analytische Statistik

Untersucht wurde der Einfluss von klinischen und genetischen Variablen auf den Verlauf der akuten GvHD, der chronischen GvHD und das Eintreten des Todes bei Stammzelltransplantierten Patienten.

Die akute GvHD wurde in ihren unterschiedlichen Schweregraden jeweils gesondert analysiert, indem für jeden Schweregrad zwei Untergruppen kreiert wurden, die gegeneinander untersucht wurden. Die aGvHD wurde dementsprechend wie folgt analysiert: aGvHD (0 vs. 1-4), aGvHD (0-1 vs. 2-4), aGvHD (0-2 vs. 3-4) und aGvHD (0-3 vs. 4). Ebenso die chronische GvHD: cGvHD (0 vs. 1-2) und cGvHD (0-1 vs. 2). In der späteren Auswertung wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit bereits publizierten Studien nur die schwere GvHD (Grad III und IV, also 0-2 vs. 3-4) berücksichtigt.

Die Gruppierung der SNPs wurde geändert. Für jeden SNP wurde ein additives, dominantes und ein rezessives Modell erstellt. Mit dieser Methode ist es möglich, den additiven/dominanten/rezessiven Effekt des minor-Allels des SNPs zu messen. Das Allel mit der größten Frequenz innerhalb des Datensatzes gilt als das major-Allel. Das andere dementsprechend als minor-Allel. Es wird angenommen, dass das minor-Allel einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat. Im dominanten Modell reicht das Vorhandensein mindestens eines minor-Allels aus, um in die Gruppe 1 kategorisiert zu werden. Andernfalls erfolgt die Zuordnung in die Gruppe 0. Im rezessiven Modell hingegen müssen beide Allele dem minor-Allel entsprechen, um der Gruppe 1 zugeordnet zu werden. Das additive Modell repräsentiert einen Risikoanstieg entsprechend der Frequenz des minor-Allels.

Es erfolgte zuerst eine gesonderte Analyse der klinischen und genetischen Daten. Anschließend wurde eine gemeinsame Analyse durchgeführt.

Für die Analyse der Assoziation zwischen einer klinischen Variablen und einem Outcome: akute Graft versus Host Disease (aGvHD) und chronische Graft versus Host Disease (cGvHD), wurde eine univariate und eine multivariate logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

In einer univariaten Regressionsanalyse wurde der Einfluss von einer unabhängigen Kovariablen auf eine abhängige Variable gemessen. Als unabhängige Variablen werden die möglichen Einflussfaktoren bezeichnet, die das Endergebnis gegebenenfalls in seinem Auftreten beeinflussen können (Parameter wie z.B. das Krankheitsstadium, das Geschlecht, ein HLA-Mismatch etc.). Die abhängige Variable ist das Endergebnis (aGvHD, cGvHD). Die univariate Analyse diente zur Vorauswahl der relevanten Kovariablen. Die im Anschluss durchgeführte multivariate Regressionsanalyse erlaubt die Analyse des Einflusses mehrerer Kovariablen gleichzeitig auf die abhängige Variable. Kovariablen, die einzeln genommen keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis zeigen, können sich in ihrem Risikopotential ergänzen.

Die unabhängigen Variablen mit einem p-Wert $< 0,20$ in der univariaten logistischen Regressionsanalyse wurden in die multivariate Analyse eingeschlossen. Der hohe p-Wert (normalerweise sollte dieser bei $< 0,05$ liegen) wurde gewählt, um das Herausfiltern von Parametern zu verhindern, die in der Kombination mit anderen (multivariate Analyse) noch eine Signifikanz zeigen könnten. Es erfolgte ein Abgleich der ausgewählten Kovariablen mit dem erforderlichen p-Wert $< 0,20$ mit ihren Frequenzen (Häufigkeit in dem Datensatz). Nur Kovariablen mit einer Häufigkeit von über 5 Fällen wurden in die multivariate logistische Regressionsanalyse eingeschlossen. In der multivariaten Regressionsanalyse wurde aufgrund des kleinen Datensatzes ein Signifikanzniveau von $p < 0,10$ (anstatt $0,05$) festgelegt.

Die selben Schritte der Analyse (erst univariat dann multivariat) wurden auch für die SNPs durchgeführt. Für einige der SNPs stellte sich in der univariaten Regressionsanalyse eine Signifikanz in mehr als einem Modell dar. Es wurde jeweils das Modell mit dem signifikantesten p-Wert für die weitere Analyse ausgewählt. Es wurde keine Korrektur für multiples Testen durchgeführt.

Anschließend wurde der Odds Ratio kalkuliert. Der Odds Ratio (OR) ist ein Assoziationsmaß, das etwas über die Stärke eines Zusammenhangs von zwei Merkmalen aussagt. Der Odds Ratio ist bei allen Studiendesigns anwendbar. Er wird benutzt, um das Risiko für das Auftreten eines Endergebnisses (in diesem Fall GvHD) abzuschätzen, wenn ein bestimmter potentieller Risikofaktor vorhanden ist. Mit dem OR besteht die Möglichkeit, die Odds zweier Gruppen miteinander zu vergleichen. Man vergleicht typischerweise Personen mit einem potentiellen Risikofaktor mit Personen ohne diesen Risikofaktor bezüglich ihrer Chance zu erkranken. Er wird berechnet, indem die Odds der ersten Gruppe (Gruppe 0) durch die Odds der zweiten Gruppe (Gruppe 1) dividiert werden. Die Odds sind das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, dass das Endergebnis auftritt zu der Wahrscheinlichkeit, dass es nicht auftritt. Der OR kann Werte zwischen 0 und ∞ annehmen.

Ein Quotenverhältnis von 1 bedeutet, dass keine Assoziation besteht (kein Unterschied in den Odds vorhanden). Ein Wert unter 1 ist ein Hinweis darauf, dass die Referenzgruppe (Gruppe, die in der multivariaten Analyse als Gruppe 0 definiert ist) größer ist als die beobachtete Gruppe (Gruppe 1). Die Odds der ersten Gruppe sind also größer als die der zweiten. Des Weiteren führt ein Wert < 1 zu einer Senkung des Risikos für das Auftreten des Endergebnisses in der Gruppe 1 im Gegensatz zur Gruppe 0. Ein OR über 1 bedeutet, dass die Referenzgruppe kleiner (die Odds der ersten Gruppe sind kleiner) und das Risiko der Patienten, mit diesen Parametern das Endergebnis (GvHD) zu entwickeln, größer ist.

In einem Modell mit mehr als einer unabhängigen Variable können mehrere Odds Ratios berechnet werden. Je nachdem, welche Faktoren bei einem Patienten vorhanden sind und welche nicht, ergeben sich verschiedene Kombinationen, die dann in ihrem Einfluss auf die Entstehung einer GvHD verglichen werden können. Um den OR für einen bestimmten Risikofaktor (Kovariabel) zu berechnen, werden alle anderen Kovariablen auf einem Level fixiert (am Besten gleich Null setzen).

	Risikofaktor	Kein Risikofaktor
Krankheit (z.B. GvHD)	a	b
Keine Krankheit	c	d

$$\text{Odds Ratio (OR)} = (a/c) / (b/d) = a*d / b*c$$

Um die Interpretation zu vereinfachen, kann das Ergebnis in eine Prozentzahl umgerechnet werden:

→OR-1

Beispiel: OR=1,5

$1,5-1=0,5$ -> 50% -> das Risiko steigt um 50% für Patienten mit diesen Kovariablen

Beispiel: OR=0,8

$0,8-1=-0,2$ -> 20% -> das Risiko sinkt um 20% für Patienten mit diesen Kovariablen

Für die Analyse des Outcome: Tod des Patienten wurde eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Ein simpler Logrank-Test wurde verwendet, um Variablen mit einem p-Wert < 0,20 herauszufiltern, mit denen anschließend eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt wurde. Die Cox-Regressionsanalyse liefert den Hazard Ratio als Indikator für das Risiko, welcher ähnlich dem Odds Ratio zu interpretieren ist.

Um einige Trends aus der multivariaten Regressionsanalyse zu verifizieren, wurden dieselben Analyseschritte erneut in den Untergruppen Familien- (MRD) und Fremdspender (MUD) durchgeführt. Durch diese getrennte Analyse wurde eine bessere Vergleichbarkeit mit bereits

publizierten Studien geschaffen, deren Analysen hauptsächlich auf Patienten mit einem Familienspender basieren. Da die einzelnen Untergruppen durch diese Unterteilung jedoch sehr klein wurden, gestaltete sich die Analyse schwierig. Nur wenige der untersuchten klinischen Variablen erreichten die geforderten 5 Patienten pro Kategorie und konnten somit in die Analyse eingeschlossen werden.

In einem weiteren Schritt wurden nach dem selben Analyseverfahren wie bei der Unterteilung nach MRD und MUD zwei weitere Unterteilungen des gesamten Datensatzes vorgenommen. Eine Analyse nach dem Kriterium der T-Zell-Depletion und eine weitere getrennt nach akute Leukämie-(Gruppe 1) und Lymphompatienten (Gruppe 4).

Um einige Ergebnisse aus anderen publizierten Studien in unserem Datensatz zu überprüfen, wurde eine Haplotypen-Analyse der IL-10–Promoterregion durchgeführt.

Mit dem Programm PHASE v.2.1 wurde der distale A-A-Haplotyp (*IL10* –3538 AT und *IL10* –2763 CA) auf eine Assoziation mit einer schweren akuten GvHD hin analysiert. Für die kombinierte Analyse der SNPs *IL10* -597 (im Patienten) und *IL10Rβ* K47E (im Spender) wurde ebenfalls dieses Programm verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

Insgesamt wurden 360 Patienten, bei denen erstmalig eine Stammzelltransplantation durchgeführt wurde, in die statistischen Auswertungen eingeschlossen. Der mediane Beobachtungszeitraum betrug 610 Tage. Bei 34 der Patienten fehlte das Material zur Genotypanalyse, sodass diese von der gemeinsamen Analyse von klinischen und genetischen Daten ausgeschlossen wurden. Bei 13 Fällen wurde die Transplantation des Patienten kurzfristig abgesagt. Der Grund für die Absage war entweder ein Progress der Grundkrankheit, womit die Indikation zur Stammzelltransplantation nicht mehr gegeben war oder der vorzeitige Tod des Patienten. Diese wurden von der Analyse ausgeschlossen. Patienten, die eine zweite Transplantation erhielten, wurden ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen. Nicht jeder Parameter war für jeden Patienten in den Akten auffindbar. Als Aufnahmekriterium in die Analyse wurde das Vorhandensein mindestens einer Art von Verlauf (Entwicklung einer akuten GvHD, einer chronischen GvHD oder der Tod) festgelegt.

Die Patienten wurden entsprechend ihrer Diagnose vor der Transplantation in 5 Gruppen eingeteilt. Insgesamt waren 132 Fälle mit akuter Leukämie (AML, ALL; Gruppe 1) vorhanden, 154 Patienten mit Lymphomen (CLL, NHL, Hodgkin Lymphom; Gruppe 4), 11 mit chronisch myeloischer Leukämie (Gruppe 2), und 56 Patienten mit anderen Krankheitsentitäten unter anderem dem Multiplen Myelom (andere Entitäten; Gruppe 3). Die Tabelle 21 zeigt die Frequenzen der klinischen Parameter im Datensatz.

Nur 10 der Patienten bekamen eine Knochenmarkspende, der Rest der Patienten bekam Stammzellen aus dem peripheren Blut des Spenders nach entsprechender Stimulation. 132 der Patienten erhielten Stammzellen von einem verwandten Spender (MRD) und 225 von einem Fremdspender (MUD). In Vorbereitung auf die Transplantation wurden 76 Patienten mit einem reduzierten Konditionierungsregime behandelt und 155 erhielten das Medikament ATG zur T-Zell-Depletion. In 52 Fällen lag ein HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger vor. In vorherigen Studien wurde die Konstellation „weiblicher Spender/männlicher Empfänger“ als ein Risikofaktor zur Entwicklung einer GvHD beschrieben (Flowers et al. 1990). In unserem Kollektiv finden sich 63 Fälle mit dieser Konstellation.

Von den 360 Patienten entwickelten 194 innerhalb der ersten 100 Tage eine akute GvHD. 117 dieser Patienten hatten nur leichte Symptome im Sinne einer GvHD Grad I oder II, während 77 Patienten eine schwere GvHD Grad III oder IV entwickelten. Im Patientenkollektiv befinden sich 121 Fälle mit chronischer GvHD (54 in limitierter Form und 67 in extensiver Form). 182 der Patienten verstarben im Laufe der Stammzelltransplantation, 61 davon an den Folgen der GvHD.

Von den 132 Leukämiepatienten entwickelten 28 eine schwere aGvHD, 40 eine cGvHD und 64 verstarben. Von den 154 Lymphompatienten zeigten 31 eine schwere aGvHD, 56 eine cGvHD und 82 der Patienten verstarben. Die Abbildung 6 zeigt das Gesamtüberleben der Patienten aufgetrennt nach der Grunderkrankung.

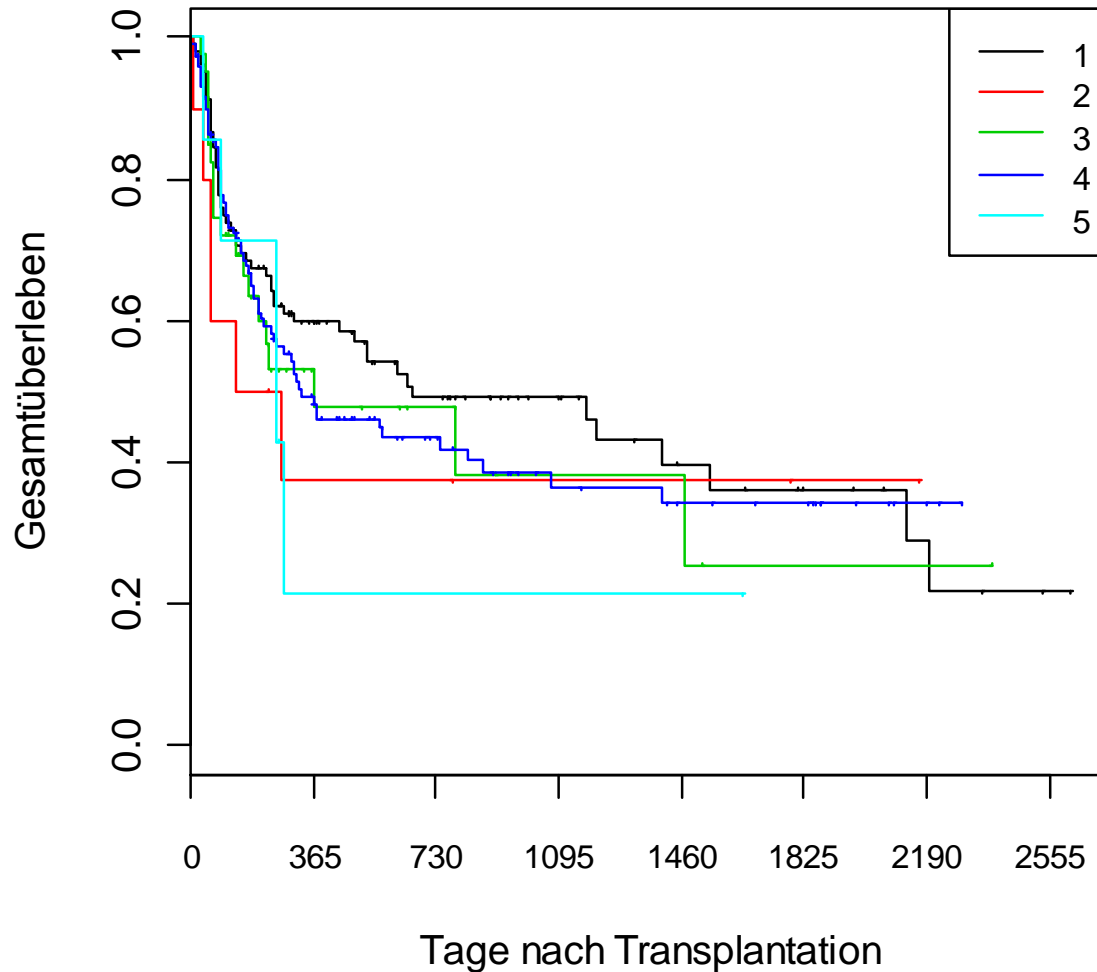


Abbildung 6: Gesamtüberleben der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation, aufgetrennt nach Erkrankungsgruppen

Kaplan-Meier-Abschätzung für das Gesamtüberleben der Patienten abhängig von der Grunderkrankung

1 = akute Leukämie (AML und ALL) (N=132)

2 = CML (N=11)

3 = Andere Entitäten (N=56)

4 = Lymphom (CLL, NHL, Hodgkin Lymphom) (N=154)

5 = Andere (z.B. Osteomyelofibrose) (N=7)

Parameter	Kategorien	Anzahl Patienten (%)
Demographische Daten		
Alter des Patienten	17 – 43 Jahre	130 (36,1)
	44 – 58 Jahre	118 (32,8)
	59 – 70 Jahre	110(30,6)
Alter des Spenders*	16 – 32 Jahre	141 (39,2)
	33 – 49 Jahre	118 (32,8)
	50 – 78 Jahre	99 (27,5)
Geschlecht des Patienten	Weiblich	139 (38,6)
	Männlich	220 (61,1)
Geschlecht des Spenders	Weiblich	115 (31,9)
	Männlich	202 (56,1)
	NA	43 (11,9)
Geschlecht (Spender und Patient)	Spender w/ Patient m	63 (17,5)
	Andere Kombination	296 (82,2)
	NA	1 (00,3)
Beziehung zum Spender	Familienspender (MRD)	132 (36,7)
	Fremdspender (MUD)	225 (62,5)
Klinische Daten vor Transplantation		
Stammzellquelle	Knochenmark	10 (3,0)
	PBSZT	348 (97,0)
	NA	2 (0,6)
Gruppe des Diagnose	Akute Leukämie	132 (36,7)
	Chron. Myeloische Leukämie	11 (3,1)
	Andere Entitäten	56 (15,6)
	Lymphom	154 (42,8)
	Andere	7 (1,9)
Transplantationszeitpunkt im Verhältnis zur Diagnosestellung	Früh	109 (30,3)
	Mittel	108 (30,0)
	Spät	143 (39,7)
GvHD Prophylaxe	Prophylaxe	330 (91,7)
	Keine Prophylaxe	7 (2,0)

	NA	23 (6,4)
Reduzierte Konditionierung	Reduzierte Konditionierung	76 (21,1)
	Keine red. Konditionierung	282 (78,3)
HLA-Mismatch	HLA-Mismatch	52 (14,4)
	Kein HLA-Mismatch	306 (85,0)
	NA	2 (0,6)
T-Zell-Depletion	T-Zell-Depletion	155 (43,1)
	Keine T-Zell-Depletion	202 (56,1)
	NA	3 (0,8)
Ganzkörperbestrahlung (TBI)	TBI	40 (11,1)
	Keine TBI	319 (88,6)
	NA	1 (0,3)
Klinische Daten Nach Transplantation (Outcome)		
Akute Graft vs. Host Disease	0	152 (42,2)
	1	65 (18,1)
	2	52 (14,4)
	3	57 (15,8)
	4	20 (5,6)
	NA	14 (3,9)
Chronische Graft vs. Host Disease	0	227 (63,1)
	1	54 (15,0)
	2	67 (18,6)
	NA	12 (3,3)
Todesfall	verstorben	182 (50,6)
	lebend	175 (48,6)
	NA	3 (0,8)
Tod durch GvHD	Tod durch GvHD	61 (16,9)
	Andere (lebend, Tod anderer Ursache)	294 (81,7)
	NA	5 (1,4)

Tabelle 21: Demographische und klinische Parameter der Patienten (n=360)

*Frequenzen nach der Zuteilung eines fehlenden Spenderalters

NA= fehlende Daten

4.2 Klinische Variablen mit Einfluss auf das Auftreten von aGvHD und cGvHD und die Überlebenszeit

Die Analyse der klinischen Variablen wurde mit der Durchführung einer univariaten logistischen Regressionsanalyse begonnen. Klinische Variablen mit einem p-Wert unter 0,20 wurden in einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse weiter untersucht und nur dann in die Analyse der SNP-Daten mit einbezogen, wenn sie mit einem p-Wert unter 0,1 als signifikant gewertet werden konnten.

Um eine bessere Vergleichbarkeit mit bereits publizierten Studien zu schaffen, deren Analysen hauptsächlich auf Daten von Patienten mit einem Familienspender basieren, wurden die Daten getrennt in den Gruppen MUD (matched unrelated donor, Fremdspender) und MRD (matched related donor, Familienspender) erneut mit der gleichen Verfahrensweise analysiert. In einem weiteren Schritt wurde eine zweite Unterteilung des gesamten Datensatzes vorgenommen nach dem Kriterium der T-Zell-Depletion. Es entstand eine Patientengruppe die ATG zur T-Zell-Depletion erhalten hat und eine, bei der keine T-Zell-Depletion durchgeführt worden war.

Als hoch signifikanter Risikofaktor für das Auftreten einer schweren akuten GvHD (Grad III und IV) erwies sich der HLA-Mismatch zwischen Spender und Patient mit 34,6% (mit Mismatch) zu 19,3% (ohne Mismatch) (OR 2,342, p-Wert 0,010). Dieses Ergebnis bestätigte sich in der Gruppe der Patienten, die Stammzellspenden von Familienmitgliedern erhalten hatten (MRD) (OR 2,373, p-Wert 0,017), sowie auch bei den Patienten, bei denen eine T-Zell-Depletion durchgeführt worden war (OR 3,720, p-Wert 0,003).

Für die Patienten mit einem Fremdspender und ebenfalls für die Patienten, die keine T-Zell-Depletion erhielten, ergab sich außer dem männlichen Geschlecht des Spenders (OR 2,885, p-Wert 0,027 und OR 2,336, p-Wert 0,036) kein signifikanter klinischer Risikofaktor für das Auftreten von akuter GvHD. Für Patienten mit einer akuten Leukämie oder einem Lymphom ergaben sich keine weiteren klinischen Risikofaktoren für die aGvHD.

Für die chronische GvHD erwiesen sich die im Vorfeld der Transplantation durchgeführte Depletion der T-Zellen (OR 0,282, p-Wert 0,005) sowie ein männlicher Spender (OR 0,521, p-Wert 0,012) als protektive Faktoren sowohl für die limitierte als auch die extensive Form der Erkrankung. Dieses Ergebniss bestätigte sich in beiden Erkrankungsgruppen (akute

Leukämie und Lymphom) (OR 0,198, p-Wert 0,001 für Gruppe 1 und OR 0,378, p-Wert 0,012 für Gruppe 4).

Das Risiko für die Patienten, im Verlauf der Stammzelltransplantation zu versterben (umfasst alle Todesfälle unabhängig der Ursache; Gesamtüberleben) ist bei einem Fremdspender (MUD) höher als bei einem verwandten Spender (Hazard Ratio 1,670, p-Wert 0,002). In der Gruppe mit einem Fremdspender sind 54,2% der Patienten verstorben, während in der Gruppe mit einem Familienspender nur 44,7% der Patienten starben (siehe Abbildung 7).

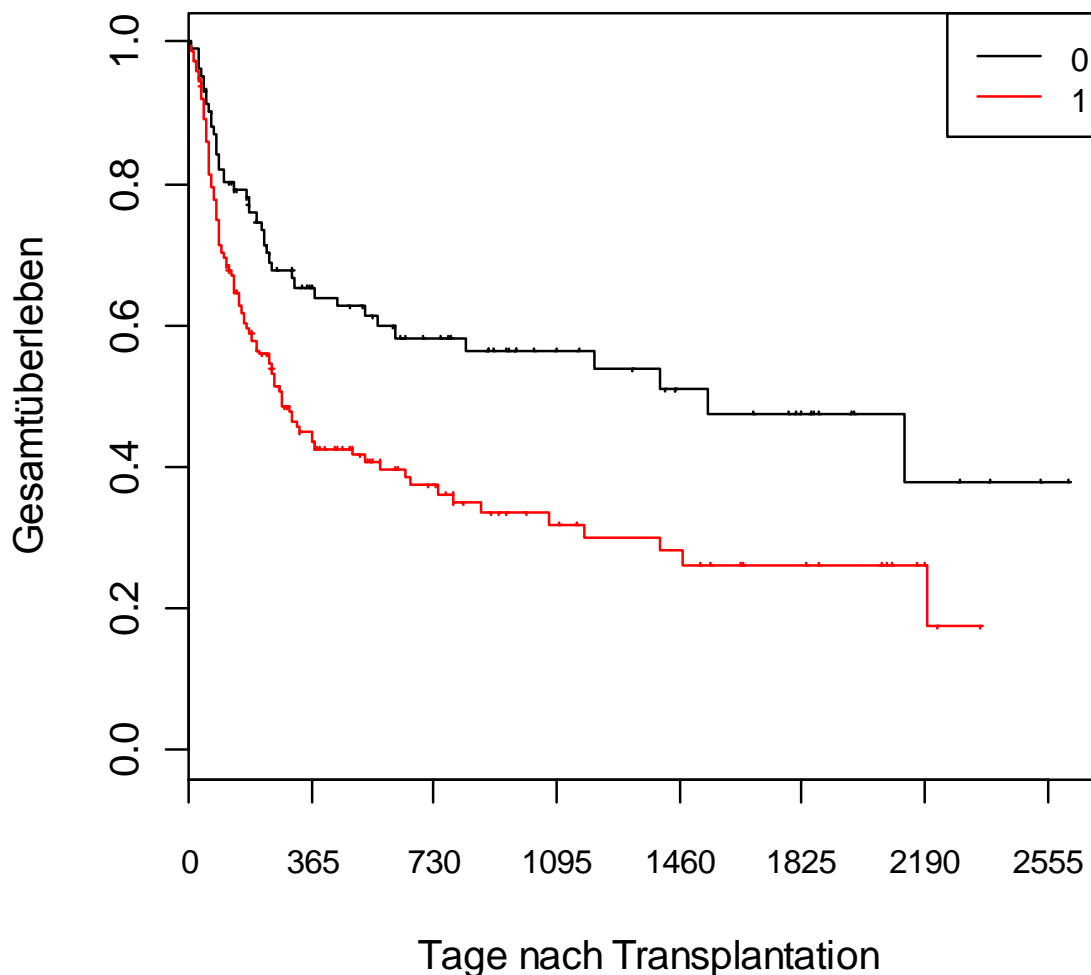


Abbildung 7: Gesamtüberleben der Patienten mit Stammzellen von einem Fremdspender im Vergleich zu dem Gesamtüberleben der Patienten mit Stammzellen von einem verwandten Spender.

Kaplan-Meier-Schätzkurve für das Gesamtüberleben der Patienten mit einem Fremdspender (MUD, 1) Familienspender (MRD, 0) (N=132) oder Fremdspender (MUD) (N=225)

Als Risikofaktor für den Tod des Patienten ergab sich im Gesamtkollektiv das Alter des Patienten (Hazard Ratio 1,49, p-Wert 0,034). Je älter der Patient, desto höher war das Risiko für ihn im Verlauf der Behandlung zu versterben. Des Weiteren war in unseren Analysen eine Stammzelltransplantation erst spät im Krankheitsverlauf, also nach mehreren anderen Therapieversuchen, mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Hazard Ratio 1,58, p-Wert 0,018).

Für die Patienten mit einem Fremdspender erwiesen sich ein reduziertes Konditionierungsregime sowie eine T-Zell-Depletion als ungünstig für das Gesamtüberleben (Hazard Ratio 2,46, p-Wert 0,003 für die reduzierte Konditionierung und Hazard Ratio 2,590, p-Wert 0,035 für die T-Zell-Depletion).

Ein HLA-Mismatch bei Patienten, die keine T-Zell-Depletion erhielten, ging ebenfalls mit einem schlechteren Gesamtüberleben einher (Hazard Ratio 2,110, p-Wert 0,047). Die Abbildung 8 zeigt das Überleben der Patienten mit einem HLA-Mismatch im Gesamtkollektiv.

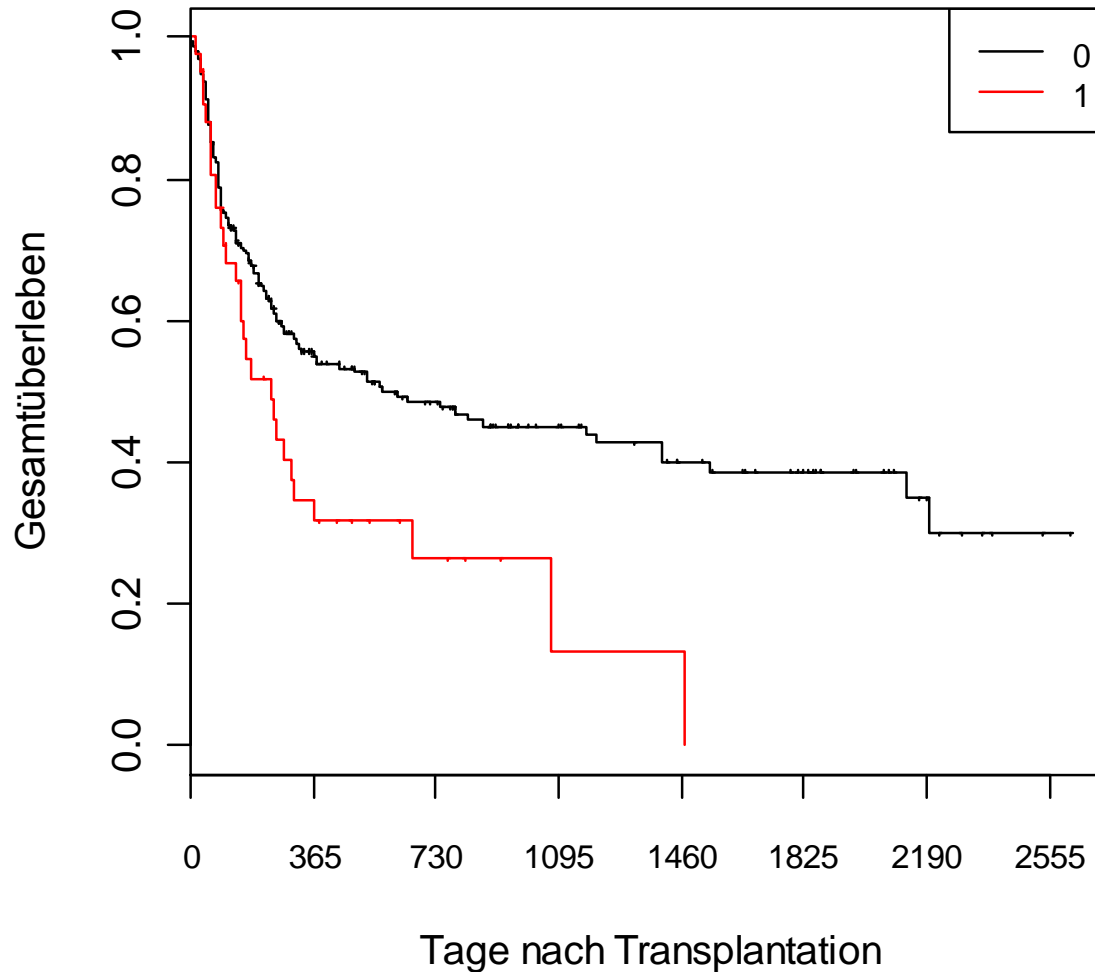


Abbildung 8: Gesamtüberleben der Patienten mit einem HLA-Mismatch zwischen Empfänger und Spender im Vergleich zu dem Überleben der Patienten mit einem HLA-kompatiblen Spender.

Kaplan-Meier-Schätzkurven für das Überleben der Patienten ohne HLA-Mismatch ($N=306$) (0) oder HLA-Mismatch ($N=52$) (1)

In einer getrennten Überlebenszeitanalyse wurde nur das Ereignis Tod durch GvHD analysiert (GvHD-assoziierte Mortalität). Die klinischen Risikofaktoren entsprachen denen der Überlebenszeitanalysen der gesamten Todesfälle.

4.3 Einfluss von Single Nucleotide Polymorphisms auf den Verlauf der aGvHD und der cGvHD

In der Analyse der Genpolymorphismen (SNPs) wurde die gleiche Vorgehensweise wie in der Analyse der klinischen Daten angewendet. Zuerst wurde eine einfache logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Die SNP-Modelle mit einem p-Wert < 0,20 wurden in eine stufenweise durchgeführte Auswahlprozedur eingeschlossen, bei der als Grundlage die multivariate Regressionsanalyse der klinischen Daten verwendet wurde und die in einer Zusammenfassung der klinischen und genetischen Daten in einer gemeinsamen multivariaten Regressionsanalyse endete. Die Tabellen 22a+b (für die akute GvHD) sowie 23a+b (für die chronische GvHD) fassen die relevanten signifikanten Ergebnisse für die aGvHD und die cGvHD zusammen. Eine Tabelle mit sämtlichen signifikanten Ergebnissen befindet sich im Anhang (Tabelle 26-29 im Anhang).

		Empfänger			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single-Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl	Inzidenz akute GvHD (III+IV) (%)	Odds Ratio	p-Wert
Keine T-Depletion					
Position -2763	Dominant (AA/AC)			3,022	0,022
A/A		13	23,1		
A/C		79	27,8		
C/C		73	15,1		

Tabelle 22a: Signifikante Assoziationen von Zytokingenpolymorphismen des IL 10- und des IL 10-Rezeptor-Gens im Empfänger und der Akuten GvHD im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom. Nur das Vorhandensein eines A-Allels auf Position IL10 -2763 im Empfänger bei Patienten ohne eine T-Zell-Depletion zeigt eine Signifikanz.

		Spender			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single-Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl	Inzidenz akute GvHD (3+4) (%)	Odds Ratio	p-Wert
Gesamtkollektiv					
Position R α G351R	Additiv (AA>AG>GG)			1,585	0,024
A/A		38	28,9		
A/G		133	23,3		
G/G		146	16,4		
MRD					
Position R α G351R	Rezessiv (AA)			2,848	0,037
A/A		16	18,8		
A/G		46	30,4		
G/G		47	10,6		
MUD					
Position R α G351R	Dominant (AA/AG)			3,150	0,042
A/A		22	36,4		
A/G		87	19,5		
G/G		96	19,8		
T Depletion					
Position R α G351R	Rezessiv (AA)			7,559	0,001
A/A		15	46,7		
A/G		62	12,9		
G/G		68	17,6		
Akute Leukämie					
Position R β K47E	Dominant (GG/AG)			0,368	0,026
G/G		6	33,3		
A/G		44	18,2		
A/A		64	17,2		
Lymphom					
Position -1087	Additiv (GG>AG>AA)				
G/G		28	14,3		
A/G		73	24,7		
A/A		35	17,1		
Position R α G351R	Rezessiv (AA)				
A/A		13	23,1		
A/G		56	23,2		
G/G		67	17,9		

Tabelle 22b: Signifikante Assoziationen von Zytokingenpolymorphismen des IL 10- und des IL 10-Rezeptor-Gens im Spender und der Akuten GvHD im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom. Signifikanzen zeigen sich für das A-Allel des IL 10 Rezeptors α G351R im Spender im Gesamtkollektiv, den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion und Lymphom. Des Weiteren ergaben sich der IL 10-Rezeptor β K47EAllel G bei den Leukämie-Patienten und das G-Allel auf Position -1087 des IL 10-Gens als signifikant.

		Empfänger			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single-Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl	Inzidenz chronische GvHD (%)	Odds Ratio	p-Wert
Gesamtkollektiv					
Position -1087	Rezessiv (GG)			2,769	0,002
G/G		66	43,9		
A/G		170	28,8		
A/A		83	30,1		
MRD					
Position -824	Dominant (TT/CT)			3,199	0,007
T/T		6	16,7		
C/T		35	42,9		
C/C		68	44,1		
T Depletion					
Position -824	Dominant (TT/CT)			2,488	0,032
T/T		9	11,1		
C/T		53	30,2		
C/C		87	13,8		
Keine T-Depletion					
Position -1087	Rezessiv (GG)			3,932	0,003
G/G		34	61,8		
A/G		96	38,5		
A/A		39	41,0		
Haplotyp <i>IL10</i> -3538 A und <i>IL10</i> -2763 A		172	34,9	2,102	0,032
Lymphom					
Position R α G351R	Rezessiv (AA)			5,673	0,020
A/A		12	66,7		
A/G		65	29,2		
G/G		57	33,3		

Tabelle 23a: Signifikante Assoziationen von Zytokingenpolymorphismen des IL 10- und des IL 10-Rezeptor-Gens im Empfänger und der Chronischen GvHD im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom. Siginifikanz zeigte der Genotyp GG auf Position -1087 des IL 10-Gens im Empfänger im Gesamtkollektiv und der Untergruppe ohne T-Zell-Depletion und außerdem das T-Allel auf Position -824 in den Untergruppen MRD und T-Zell-Depletion. In der Untergruppe Lymphom ergab sich

eine Signifikanz für den Genotyp AA des IL 10-Rezeptors α G351R. Der Haplotyp -3538A/-2763A zeigte eine Signifikanz in der Untergruppe der Patienten ohne T-Zell-Depletion.

		Spender			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single-Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl	Inzidenz chronische GvHD (%)	Odds Ratio	p-Wert
MUD					
Position -824	Dominant (TT/CT)			0,401	0,030
T/T		19	10,5		
C/T		73	32,9		
C/C		110	26,4		
Keine T-Depletion					
Haplotyp <i>IL10</i> -3538 A und <i>IL10</i> -2763 A		175	36,6	2,011	0,046
Lymphom					
Position -1087	Additiv (GG>AG>AA)			3,101	0,0006
G/G		28	60,7		
A/G		73	34,2		
A/A		35	14,3		

Tabelle 23b: Signifikante Assoziationen von Zytokingenpolymorphismen des IL 10- und des IL 10-Rezeptor-Gens im Spender und der Chronischen GvHD im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom. Eine Signifikanz für die chronische GvHD zeigte das T-Allel auf Position -824 des IL 10-Gens im Spender in der Untergruppe der MUD sowie das G-Allel auf Position -1087 bei Lymphom-Patienten. . Der Haplotyp -3538A/-2763A zeigte eine Signifikanz in der Untergruppe der Patienten ohne T-Zell-Depletion.

Interessante Ergebnisse ergaben sich insbesondere für die Polymorphismen im Gen des Interleukin-10-Rezeptors alpha. Das Risiko für eine schwere akute GvHD Grad III und IV war stark erhöht bei Patienten, die einen Spender mit einem homozygoten Genotyp *IL 10Ra* G351R AA aufwiesen (OR 1,585, p-Wert 0,024 für das Gesamtkollektiv und OR 2,848, p-Wert 0,037 bei MRD). Das Risiko war ansteigend in Abhängigkeit von der Beteiligung des Minor Allels, in diesem Fall das A-Allel, am Genotyp mit entsprechend 28,9% (AA), 23,3% (AG) und 16,4% (GG). Bei den Patienten mit einem Fremdspender reichte mindestens eine Kopie des A-Allels (AG/AA) beim Spender aus, um das Risiko für eine schwere aGvHD deutlich zu erhöhen mit jeweils 36,4%, 19,5% und 19,8% für AA, AG und GG (OR 3,150, p-Wert 0,042 bei MUD). Dieser negativ prognostische Effekt verstärkte sich bei den Patienten, die eine T-Zell-Depletion mittels ATG erhalten hatten (OR 7,559, p-Wert 0,001). In unserem Kollektiv gab es 7 Patienten, die mit dieser Konstellation (T-Zell-Depletion und homozygoter Spender *IL 10Ra* G351R Genotyp AA) eine schwere aGvHD entwickelten. Insgesamt waren

15 Spender bzgl. des *IL 10Ra G351R* Genotyp AA homozygot. Die Patienten mit einem A-Allel tragenden Spender verstarben signifikant häufiger an den Folgen der schweren aGvHD (GvHD assoziierte Mortalität, Hazard Ratio 2,83, p-Wert 0,021). Das Langzeitüberleben war dabei aber nicht beeinträchtigt (siehe Abbildung 9a).

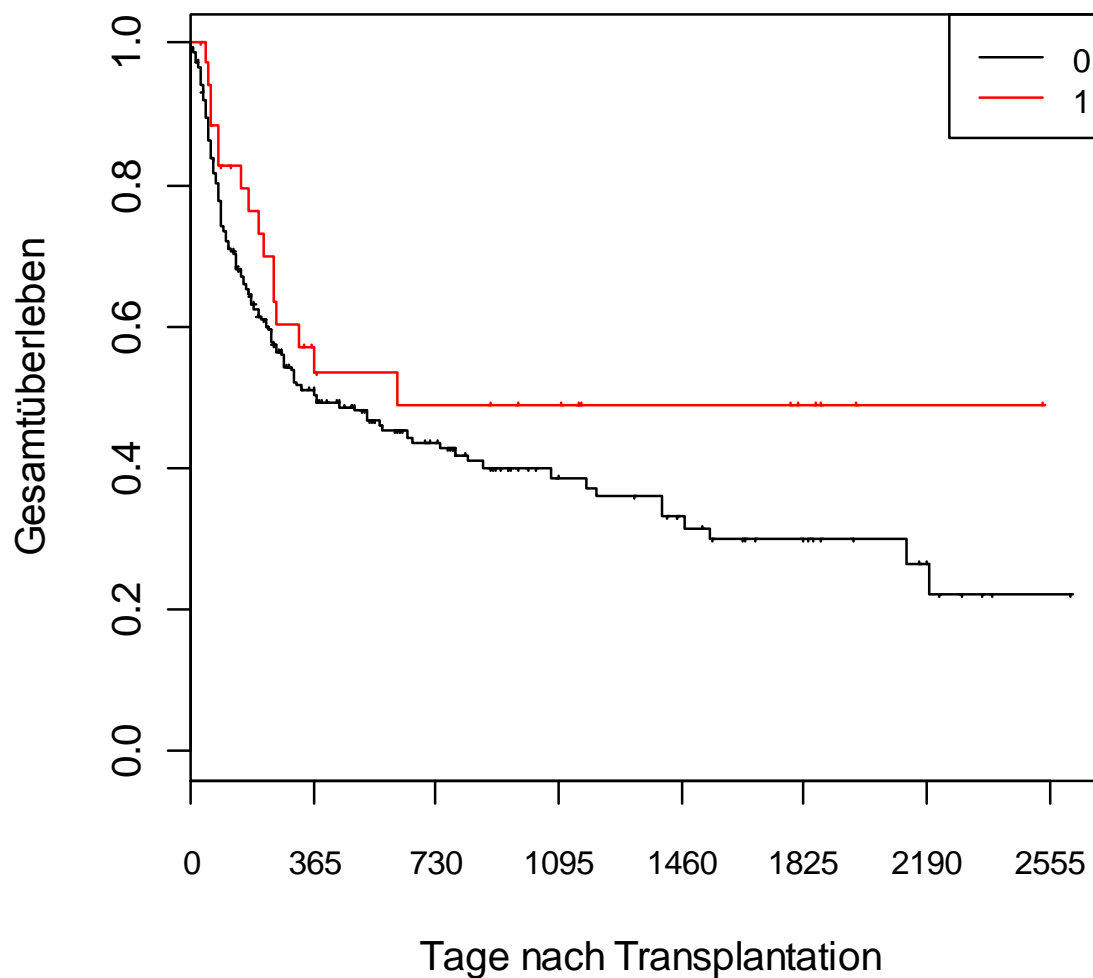


Abbildung 9a: Gesamtüberleben der Patienten mit einem homozygoten Spender *IL 10Ra G351R* AA zeigen trotz einer erhöhten Rate an schwerer aGvHD ein besseres Gesamtüberleben als Patienten mit einem Spender *IL 10Ra G351R* AG oder GG.

Kaplan-Meier-Schätzkurven für das Gesamtüberleben der Patienten mit einem homozygoten Spender-Genotyp *IL 10Ra G351R* AA bzw. GG/AG
 0 = Spender *IL 10Ra G351R* Genotyp GG/AG (N=279)
 1 = Spender *IL 10Ra G351R* Genotyp AA (N=38)

Patienten, die selbst homozygote Träger des A-Allels für *IL 10Ra G351R* waren, zeigten ein im Vergleich besseres Gesamtüberleben als Patienten mit den Genotypen AG oder GG auf (Hazard Ratio 0,438, p-Wert 0,025) (Abbildung 9b).

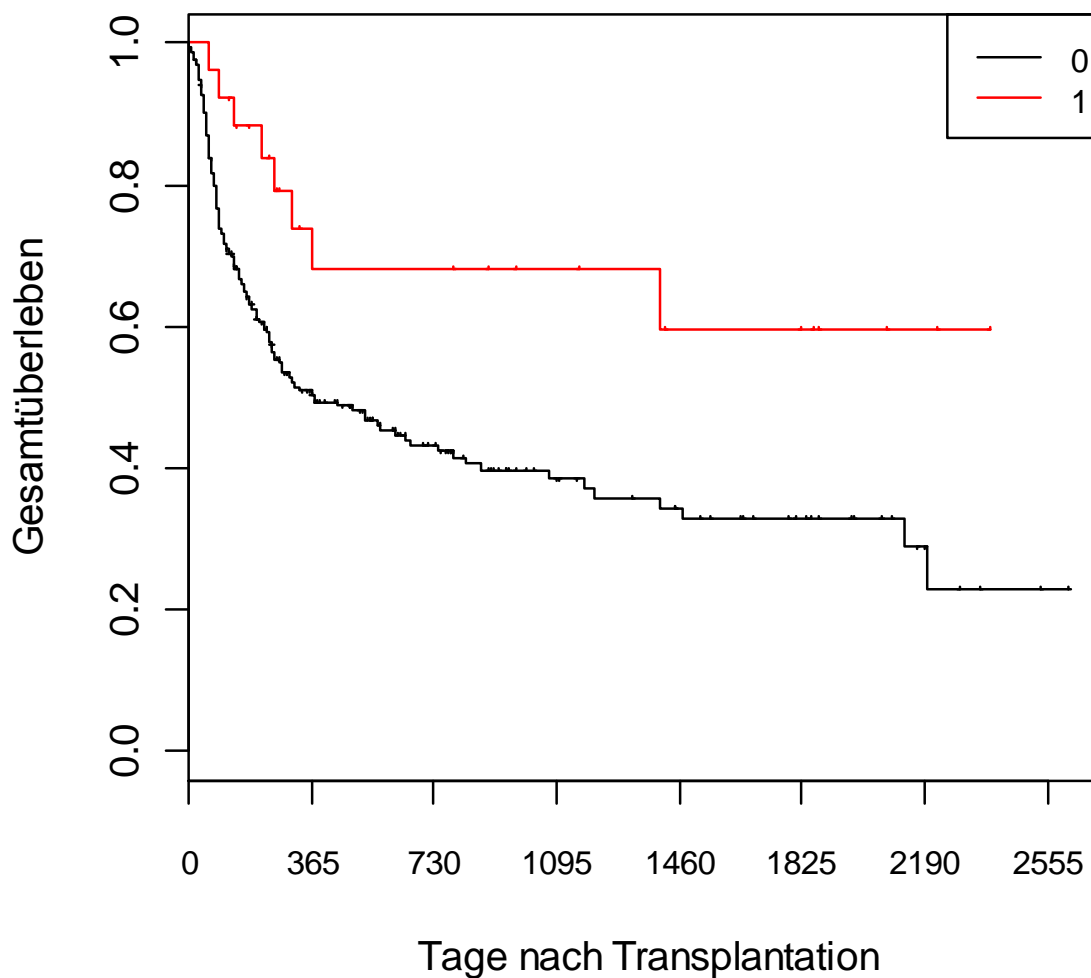


Abbildung 9b: Gesamtüberleben der Patienten mit *IL 10Ra G351R* Genotyp AA versus der Patienten mit *IL 10Ra G351R* Genotyp AG oder GG.

Kaplan-Meier-Schätzkurve für das Gesamtüberleben der Patienten mit *IL 10Ra G351R* Genotyp AA

0 = *IL 10Ra G351R* Genotyp GG/AG (N= 189)

1 = *IL 10Ra G351R* Genotyp AA (N=30)

Die Abbildung 9c zeigt die bessere Überlebenskurve der Patienten mit dem homozygoten Genotyp *Ra G351R* AA dessen Spender ebenfalls diesen homozygoten Genotyp *Ra G351R* AA besaßen. Kurven 2 und 3 in dieser Abbildung zeigen das insgesamt schlechtere Überleben

der homozygot AA-Patienten mit Spendern eines anderen Genotyps (*Ra G351R* AG oder GG) bzw. der Patienten die selber einen anderen Genotyp (AG/GG) aufwiesen, dessen Spender jedoch den homozygoten Genotyp AA besaß. Diese Abbildung zeigt an sehr kleinen Fallzahlen, dass die Patienten mit der Kombination homozygoter Patient (AA)/ homozygoter Spender (AA) auf *Ra G351R* ein besseres Gesamtüberleben aufwiesen als Patienten mit einer anderen Genotyp-Kombination.

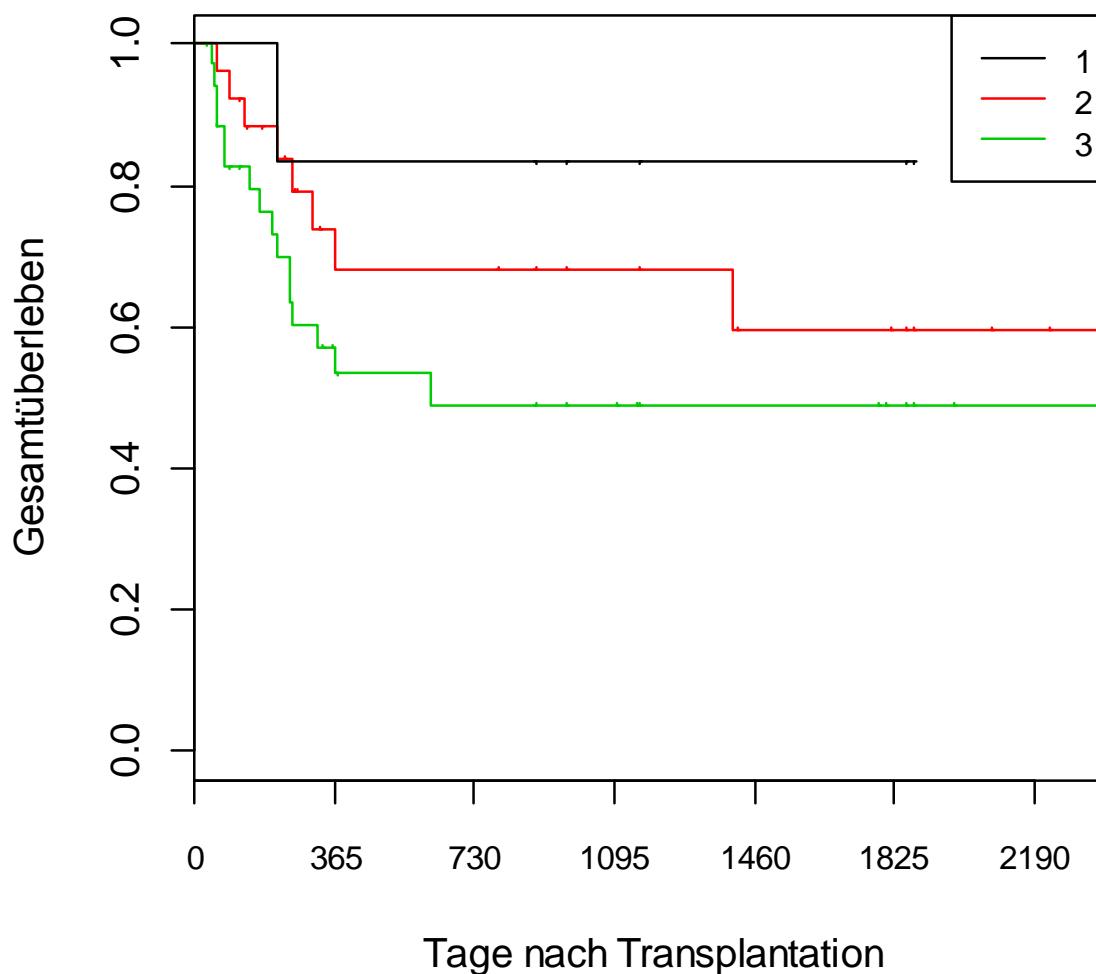


Abbildung 9c: Gesamtüberleben der homozygoten Patienten *Ra G351R* AA mit einem ebenfalls homozygoten Spender *Ra G351R* AA versus homozygote Patienten (AA) mit einem Spender anderen Genotyps (*Ra G351R* AG/GG) und versus Patienten anderen Genotyps (*Ra G351R* AG/GG) mit einem Spender des homozygoten Genotyps *Ra G351R* AA

Kaplan-Meier-Schätzkurve für das Überleben der Patienten mit einem homozygoten Spender des Genotyps *IL 10Ra G351R* AA

1 = Patient *IL 10Ra G351R* Genotyp AA und Spender Genotyp *IL 10Ra G351R* AA (N=6)

2 = Patient *IL 10Ra G351R* Genotyp AA und Spender Genotyp *IL 10Ra G351R* AG/GG (N=26)

3 = Patient *IL 10Ra G351R* Genotyp AG/GG und Spender Genotyp *IL 10Ra G351R* AA (N=36)

In der Analyse zur Assoziation der Genotypen mit dem Auftreten von chronischer GvHD zeigte sich weiterhin, dass Lymphompatienten mit dem Genotyp *IL 10Ra G351R* AA mit 66,7% zu 29,2% (AG) und 33,3% (GG) ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer chronischen GvHD aufwiesen (OR 5,673, p-Wert 0,020).

Über die Befunde an dem SNP *IL 10Ra G351R* im IL10 Rezeptor hinaus ergaben sich bei zwei SNPs im Gen des IL 10 selbst interessante Befunde:

In der Untergruppe der Patienten ohne eine T-Zell-Depletion war das Vorliegen des A-Allel im SNP *IL-10 -2763* im Patienten assoziiert mit dem Auftreten einer schweren akuten GvHD mit relativen Häufigkeiten von 23,1%, 27,8% und 15,1% für AA, AC und CC (OR 3,022, p-Wert 0,022). Eine Assoziation des selteneren Auftretens von schwerer akuter GvHD mit dem Vorliegen des Genotyps *-2763* CC in der Situation der MRD Transplantation, in der kein ATG zur T-Zell-Depletion eingesetzt wird, entspricht auch den Ergebnissen vorangegangener Analysen an unabhängigen Kohorten (Lin et al. 2003).

Ebenfalls in der Literatur beschrieben waren schon die SNPs *IL-10 -597* Genotyp A (= *IL-10 -592*) im Patienten und das G-Allel im *IL-10Rβ K47E* (= *IL-10Rβ c238*) im Spender als weitere wichtige protektive Faktoren gegen eine schwere aGvHD (Hansen et al. 2007). Diese SNPs wurden auch in der vorliegenden Analyse untersucht. Während sich bei den Patienten mit einer Leukämie als Grunderkrankung keiner dieser SNP als signifikant mit dem Auftreten von GvHD assoziiert erwies, bestätigte sich der protektive Effekt des *IL-10Rβ K47E* Allel G (AG/GG), wenn im Spender vorhanden, in der Gruppe der Lymphompatienten mit einer relativen Häufigkeit des Auftretens schwerer akuter GvHD mit 5,9% (GG) und 15,4% (AG) zu 27,9% (AA) (OR 0,368, p-Wert 0,026).

Weiterhin erwies sich für die chronische GvHD im gesamten Datensatz, sowie auch gesondert für Patienten ohne eine T-Zell-Depletion, der proximale SNP *IL-10 -1087* Genotyp GG (homozygot) des Patienten als assoziiert mit dem Auftreten von chronischer GvHD, mit relativen Häufigkeiten von jeweils 43,9%, 28,8% und 30,1% bzw. 61,8%, 38,5% und 41,0% für GG, AG und AA (OR 2,769, p-Wert 0,002 im Gesamtkollektiv und OR 3,932, p-Wert 0,003 für Patienten ohne T-Zell-Depletion). Besonders für die Lymphompatienten erwies sich der Genotyp GG im Spender gegenüber dem Genotyp AA, mit ansteigendem Risiko abhängig von Hetero- bzw. Homozygotie des G-Allels auf *-1087*, als assoziiert mit dem Auftreten von chronischer GvHD (OR 3,101, p-Wert 0,001).

Ebenfalls als assoziiert mit dem Auftreten von chronischer GvHD assoziiert erwies sich das Auftreten des T-Allels im proximalen SNP *IL-10* -824 (TT/TC) im Empfänger bei Patienten mit einem Familienspender (OR 3,199, p-Wert 0,007), und in der Gruppe der Patienten mit T-Zell-Depletion (OR 2,488, p-Wert 0,032). Umgekehrt war das Vorhandensein eines T-Allels in dem SNP *IL-10* -824 im Spender assoziiert mit einer verminderten relativen Häufigkeit für das Auftreten einer cGvHD in der Gruppe der MUD mit jeweils 10,5% (TT), 32,9% (CT) und 26,4% (CC) (OR 0,401, p-Wert 0,030).

Weitere SNPs mit einem Einfluss auf das Auftreten einer chronischen GvHD in der Gruppe der MRD waren -6208 (CG) und -11777 (AG). Das Vorliegen eines Genotyps CC auf -6208 im Patienten war assoziiert mit relativen Häufigkeiten für das Auftreten einer cGvHD von jeweils 48,4% (CC), 48,9% (CG) und 30,0% (GG) (OR 4,714, p-Wert 0,003), während das Vorliegen eines G-Allels auf -11777 mit geringeren relativen Häufigkeiten von cGvHD von jeweils 0%, 33,3% und 44,1% für GG, AG und AA verbunden war.

4.4 Haplotypenanalyse und kombinierte SNP-Analyse

Haplotypen sind Gruppen von genetischen Varianten auf einem Chromosom, die als eine gemeinsame Einheit vererbt werden. Findet zwischen den Genen dieser Gruppen keine freie Rekombination statt, besteht ein Kopplungsungleichgewicht.

Die SNPs *IL10* -3538 AT (AT; 01 04) und *IL10* -2763 CA (CA; 01 02) am distalen Ende der 5'-flankierenden Region des *IL-10*-Gens sind in bereits publizierten Studien als eine solche Gruppierung identifiziert worden. Die Kopplung dieser beiden SNPs ließ sich auch in unserem Datensatz nachweisen (Korrelation 0,8). Das A-Allel beider SNPs wurde als das Allel identifiziert, welches bei Vorhandensein mit einem erhöhten Risiko für eine schwere akute GvHD einherging. Aus diesem Grund wurden Patienten und Spender mit einem A- (A-Allel im SNP -3538) A -(A-Allel im SNP -2763) Haplotyp innerhalb unseres Kollektiv identifiziert, um das Risiko des Empfängers für eine schwere aGvHD in dem Kollektiv dieser Analyse überprüfen zu können.

Weiterhin war in der Literatur schon eine Interaktion zwischen dem SNP *IL10* -592 AC (-597 in unserer Analyse) und dem SNP *IL 10* *Rβc238* AG (*Rβ K47E*) beschrieben worden. Das A-Allel des SNP -592 (-597) im Empfänger war dabei als protektiv gegen eine schwere aGvHD Grad III oder IV erkannt worden. Dieser Schutz war verstärkt nachweisbar, wenn bei dem Spender das G-Allel im SNP *Rβc238* (*Rβ K47E*) vorlag (Hansen et al. 2007). Empfänger-

Spender-Paare mit dieser Kombination wurden in unserem Kollektiv identifiziert und deren Risiko für das Auftreten einer akuten GvHD kalkuliert.

Für die Analyse des A-A-Haplotyps (*IL10* -3538 AT und *IL10* -2763 CA) sowie für die kombinierte Analyse der SNPs -597 und *Rβ K47E* wurde das Programm PHASE v.2.1 verwendet und anschließend die Odds Ratio kalkuliert.

In der Analyse des Haplotypes -3538 A / -2763 A zeigte sich keine signifikante Assoziation des Vorliegens dieses Haplotyps mit dem Auftreten einer schweren aGvHD, obwohl der Genotyp -2763 CC in der Einzelanalyse als ein protektiver Faktor identifiziert wurde. Das Vorhandensein dieses Haplotyps im Patienten sowie im Spender stellte allerdings einen Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen GvHD dar (OR 2,102, p-Wert 0,032 im Patienten und OR 2,011, p-Wert 0,046 im Spender). Grenzwertig signifikant war die Assoziation dieses Haplotypes bei Auftreten im Spender mit einem geringeren Risiko für eine schwere akute GvHD (OR 0,475, p-Wert 0,072) in der Gruppe der Patienten, die kein ATG bekamen.

In der kombinierten Analyse ist in unserem Datensatz das Vorhandensein des A-Allels auf -597 im Patienten und des G-Allels im *Rβ K47E* im Spender mit 73,3% (Kombination A -597/G *Rβ K47E*) zu 42,4% (andere Kombination) mit einem verminderten Gesamtüberleben bei Leukämiepatienten assoziiert (Hazard Ratio 2,737, p-Wert 0,004). In der Tendenz ist dieser Effekt auch bei den Patienten mit einem Fremdspender vorhanden (Hazard Ratio 1,71, p-Wert 0,170).

4.5 Einfluss der genetischen Variablen auf die Überlebenszeit

Für die Analyse der Überlebenszeit wurde erst ein einfacher Logrank-Test verwendet um anschließend mit den Variablen, die einen p-Wert < 0,20 aufwiesen, eine Cox-Regressionsanalyse durchzuführen. Anschließend wurde eine zweite Überlebenszeitanalyse durchgeführt, getrennt nach GvHD-assoziiertes Mortalität und Tod durch eine andere Ursache (z.B. Infektion, Rezidiv). Insgesamt verstarben 182 Patienten, 61 davon an den Folgen einer GvHD. Die Tabellen 24a+b sowie 25a+b fassen die relevanten signifikanten Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse zusammen. Die Tabellen 24a+b betreffen die Ergebnisse für das Gesamtüberleben der Patienten und die Tabellen 25a+b die GvHD-assoziierte-Mortalität.

		Empfänger			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single-Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl	Verstorbene Patienten (alle) (%)	Hazard Ratio	p-Wert
Gesamtkollektiv					
Position -824	Rezessiv (TT)			2,544	0,015
T/T		15	66,7		
C/T		113	45,1		
C/C		192	48,4		
Position R α G351R	Rezessiv (AA)			0,438	0,025
A/A		30	30,0		
A/G		149	53,0		
G/G		140	45,7		
MRD					
Position -824	Rezessiv (TT)			6,931	0,001
T/T		6	50,0		
C/T		35	42,9		
C/C		68	38,2		
Position -597	Additiv (AA>AC>CC)			0,643	0,050
A/A		6	50,0		
A/C		35	42,9		
C/C		69	37,7		
Position R α G159S	Dominant (GG/AG)			1,555	0,047
G/G		2	41,1		
A/G		34	35,3		
A/A		73	41,1		
MUD					
Position R α G351R	Dominant (AA/AG)			0,494	0,033
A/A		15	40,0		
A/G		98	61,2		
G/G		96	43,8		
Akute Leukämie					
Kombinierte Analyse Pat. 597 / Spender R β K47E G		15	73,3	2,737	0,004

Lymphom					
Position -824	Rezessiv (TT)			3,510	0,009
T/T		8	75,0		
C/T		41	51,2		
C/C		85	48,2		

Tabelle 24a: Signifikante Assoziationen von Zytokingenpolymorphismen des IL 10- und des IL 10-Rezeptor-Genes im Empfänger und dem Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv, sowie in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom. Signifikanz zeigte der Genotyp TT auf Position -824 im Empfänger im Gesamtkollektiv und in den Untergruppen MRD und Lymphom. Weitere Signifikanzen zeigten das a-Allel de IL 10-Rezeptor α G351R im Gesamtkollektiv und der Untergruppe MUD sowie das G-Allel des IL 10-Rezeptor α G159S und das A-Allel auf Position -597 im IL 10-Gen jeweils in der Untergruppe der MRD. Die kombinierte Analyse Patient IL 10 -597 A/ Spender IL 10-Rezeptor β K47E G ergab sich als signifikant in der Untergruppe akute Leukämie.

		Spender			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single-Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl	Verstorbene Patienten (%)	Hazard Ratio	p-Wert
MRD					
Position -597	Dominant (AA/AC)			0,595	0,016
A/A		8	37,5		
A/C		36	41,7		
C/C		66	40,9		
MUD					
Position R β K47E	Rezessiv (GG/AG)			3,062	0,010
G/G		17	47,1		
A/G		80	58,8		
A/A		108	49,1		
T-Depletion					
Position -597	Dominant (AA/AC)			0,489	0,024
A/A		17	29,4		
A/C		54	37,0		
C/C		71	52,1		
Lymphom					
Position -3538	Rezessiv (AA)			0,415	0,044
A/A		17	35,3		
A/T		70	50,0		
T/T		50	58,0		

Tabelle 24b: Signifikante Assoziationen von Zytokingenpolymorphismen des IL 10- und des IL 10-Rezeptor-Gens im Spender und dem Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom. Signifikanz zeigte das A-Allel auf Position -597 im Spender in den Untergruppen MRD und T-Zell-Depletion sowie der Genotyp GG des IL 10-Rezeptors β K47E in der Untergruppe der MUD und der Genotyp AA auf Position -3538 des IL 10-Gens bei den Lymphom-Patienten.

		Empfänger			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single-Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl	Verstorben durch GvHD (%)	Hazard Ratio	p-Wert
Gesamtkollektiv					
Position R α G159S	Dominant (GG/AG)			1,887	0,027
G/G		11	18,2		
A/G		89	22,5		
A/A		220	15,9		
MRD					
Position R α G159S	Dominant (GG/AG)			2,150	0,022
G/G		2	50,0		
A/G		34	11,8		
A/A		73	11,0		
MUD					
Position R α G351R	Dominant (AA/AG)			0,346	0,065
A/A		15	13,3		
A/G		98	25,5		
G/G		96	17,7		
Lymphom					
Position R β K47E	Dominant (GG/AG)			0,248	0,010
G/G		15	6,7		
A/G		46	8,7		
A/A		74	23,0		

Tabelle 25a: Signifikante Assoziationen von Zytokingenpolymorphismen des IL 10- und des IL 10-Rezeptor-Gens im Empfänger und der GvHD-assoziierten-Mortalität im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom. Es zeigte sich eine Signifikanz für das G-Allel des IL 10 Rezeptor α G159S im Empfänger im Gesamtkollektiv und der Untergruppe MRD. Ebenfalls signifikant zeigte sich das A-Allel des IL 10-Rezeptor α G351R in der Untergruppe MUD und das G-Allel des IL 10-Rezeptor β K47E in der Untergruppe Lymphom.

		Spender			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single-Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl Spender	Verstorben durch GvHD (%)	Hazard Ratio	p-Wert
MRD					
Position R α G351R	Rezessiv(AA)			2,830	0,021
A/A		16	12,5		
A/G		46	13,0		
G/G		47	12,8		
T-Depletion					
Position -7400	Dominant (DelDel/DelIns)			2,520	0,043
Del/Del		8	0,0		
Del/Ins		47	25,5		
Ins/Ins		92	10,9		
Keine T-Depletion					
Position -7400	Dominant (DelDel/DelIns)			0,419	0,019
Del/Del		3	33,3		
Del/Ins		73	16,4		
Ins/Ins		94	25,5		
Akute Leukämie					
Position R α G159S	Dominant (GG/AG)			3,160	0,043
G/G		4	0,0		
A/G		41	22,0		
A/A		70	7,1		

Tabelle 25b: Signifikante Assoziationen von Zytokingenpolymorphismen des IL 10- und des IL 10-Rezeptor-Gens im Spender und der GvHD-assoziierten-Mortalität im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom. Signifikanzen zeigten sich für den Genotyp AA des IL 10-Rezeptors im Spender für die Untergruppe der MRD, sowie für das G-Allel des IL 10-Rezeptor α G159S in der Gruppe der Leukämie-Patienten. Die Deletion an Position -7400 ergab sich als signifikant für die Untergruppen mit T-Zell-Depletion und ohne T-Zell-Depletion.

Wie bereits im Kapitel 3.3 beschrieben, erwies sich das Vorhandensein des A-Allels mit dem größten Effekt für den Genotyp AA (homozygot) auf *IL 10Ra G351R* im Empfänger als assoziiert mit einer höheren Gesamtüberlebensrate (Hazard Ratio 0,438, p-Wert 0,025) (siehe auch Abbildung 9b). Bei den Patienten mit einem Fremdspender (MUD) war bereits das Vorliegen nur eines A-Allels in diesem SNP mit einer höheren Gesamtüberlebensrate assoziiert (Hazard Ratio 0,494, p-Wert 0,033).

Der Genotyp AA auf diesem SNP (*IL 10Ra G351R*) im Spender, der wie oben beschrieben mit einem erhöhten Risiko für eine akute GvHD assoziiert war, ging auch mit einer erhöhten Sterblichkeit durch GvHD (erhöhte GvHD-assoziierte-Mortalität) einher (Hazard Ratio 2,83, p-Wert 0,021).

Mit einer geringeren Gesamtüberlebensrate ging das Auftreten des Genotyps TT (homozygot) auf -824 im Empfänger einher, wobei mit Genotyp TT 66,7% verstarben im Gegensatz zu jeweils 45,1% und 48,4% für das Vorliegen der Genotypen TC und CC im Empfänger (Hazard Ratio 2,544, p-Wert 0,015 im Gesamtkollektiv, Hazard Ratio 6,931, p-Wert 0,001 für MRD und Hazard Ratio 3,509, p-Wert 0,009 für Lymphompatienten). (Abbildung 10).

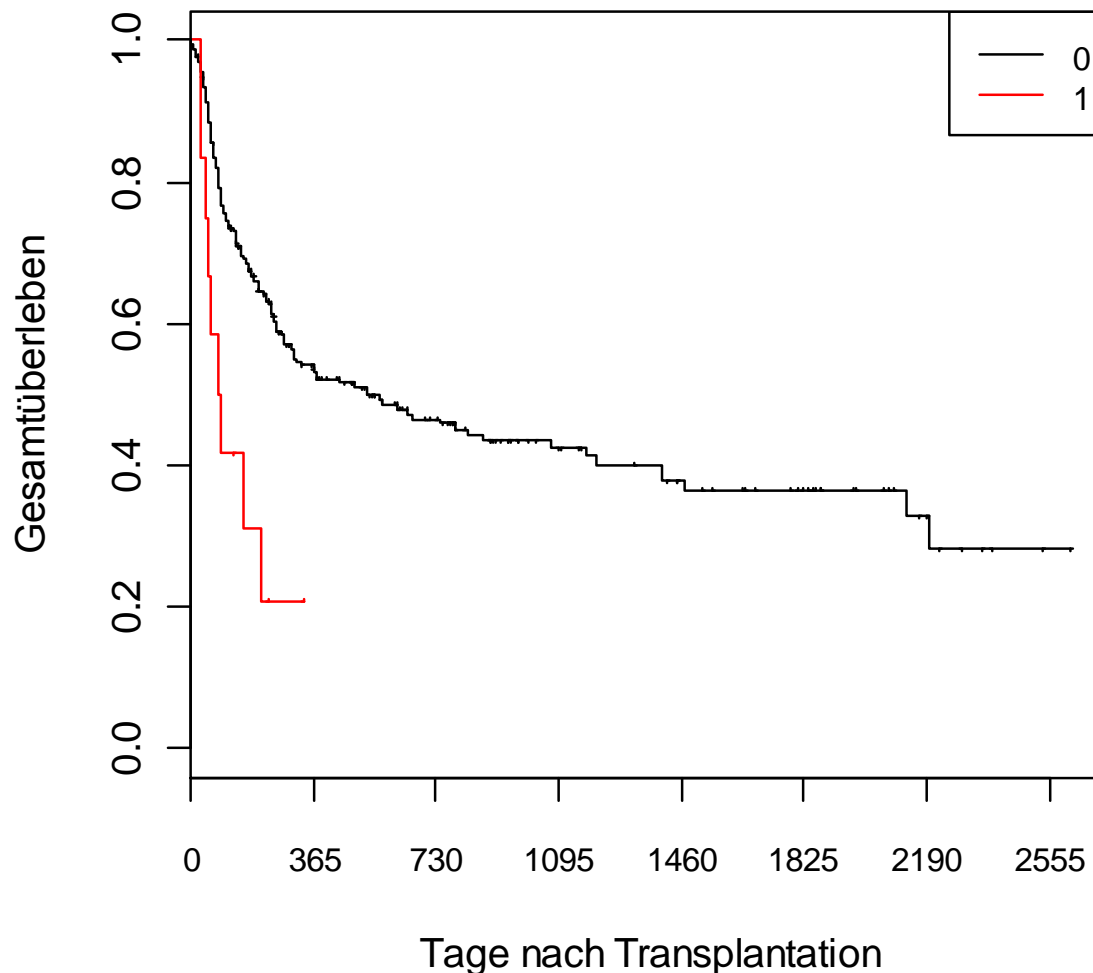


Abbildung 10: Gesamtüberleben der Patienten mit *IL-10* -824 Genotyp *TT* im Vergleich zum Gesamtüberleben der Patienten mit den Genotypen *IL-10* -824 *CT* oder *CC*.

Kaplan-Meier-Schätzkurve für das Überleben der Patienten mit *IL-10* -824 Genotyp *TT* (Gesamtkollektiv)

0 = *IL-10* -824 Genotyp *CT/CC* (N=205)

1 = *IL-10* -824 Genotyp *TT* (N=15)

Für die Patienten mit einem Familienspender (MRD) war das Vorhandensein des Genotyps *AA* für *IL-10* -597 (3 von 6 Patienten verstarben) verglichen mit dem Genotyp *CC* (26 von 69 Patienten verstarben) mit einer höheren Überlebensrate assoziiert (Hazard Ratio 0,643, p-Wert 0,050), wobei die Anzahl der Patienten mit einem Familienspender und dem Genotyp *IL-10* -597 *AA* mit nur 6 Patienten sehr gering war. Interessanterweise erwies sich das *A*-Allel auf -597 im Spender ebenfalls als protektiv für die Patienten (Hazard Ratio 0,595, p-Wert 0,016). Dieser Effekt bestätigte sich auch in der Gruppe der Patienten, die eine T-Zell-Depletion erhielten (Hazard Ratio 0,489, p-Wert 0,024). Positiv wirkte sich auch der Genotyp

AA auf Position -3538 im Spender auf das Überleben aus (Hazard Ratio 0,415, p-Wert 0,044).

Außerdem mit einem positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben assoziiert, erwiesen sich der Genotyp AA auf -11668 im Spender für die Untergruppen der MRD und der Leukämie-Patienten (Hazard Ratio 0,427, p-Wert 0,016 MRD und Hazard Ratio 0,326, p-Wert 0,046 Gruppe akute Leukämie), sowie das T-Allel (TT/TC) auf -12806 im Patienten für die Gruppe der MUD (Hazard Ratio 0,474, p-Wert 0,029). Das Vorhandensein des G-Allels auf -11777 im Patienten mit dem stärksten Effekt für den Genotyp GG war mit einer geringeren Überlebensrate (100% GG, 77,8% AG und 49,3% AA verstarben) für Patienten ohne eine T-Zell-Depletion assoziiert (Hazard Ratio 1,990, p-Wert 0,021), und ging mit einem erhöhten Risiko für den Tod durch GvHD bei Patienten mit einem Lymphom einher (Hazard Ratio 6,681, p-Wert 0,007).

Obwohl der Genotyp GG im *IL-10Rβ K47E* (= *IL-10Rβ c238*) im Spender mit einer geringeren Rate an schwerer aGvHD assoziiert war, ging das Vorhandensein von *IL-10Rβ K47E* Genotyp GG im Spender mit einer geringeren Gesamtüberlebensrate für die Patienten mit einem Fremdspender einher (Inzidenz Tod 47,1% GG, 58,8% GA, 49,1% AA, Hazard Ratio 3,062, p-Wert 0,001). Das G-Allel auf *IL-10Rβ K47E* im Patienten selber war bei Patienten mit einem Lymphom als Grunderkrankung allerdings mit einer geringeren GvHD-assoziierten Mortalität verbunden (Hazard Ratio 0,248, p-Wert 0,010)

In der Überlebenszeitanalyse aufgetrennt nach Todesfällen aufgrund einer GvHD erwies sich *IL-10 -12806* Genotypen TT und TC (T-Allel) im Patienten mit einer Inzidenz für den Tod des Empfängers von 10,0% (TT), 13,6% (TC) und 21,4% (CC) als protektiv (Hazard Ratio 0,548, p-Wert 0,042), während das G-Allel (Genotyp AG/GG) im Interleukin 10-Rezeptor α G159S ebenfalls im Patienten ein schlechteres Überleben anzeigte (Hazard Ratio 1,887, p-Wert 0,027 im Gesamtkollektiv und OR 2,150, p-Wert 0,022 bei MRD).

Das Auftreten des G-Allels im *IL 10-Rezeptor α G159S* im Spender war bei Patienten mit einer akuten Leukämie (Hazard Ratio 3,160, p-Wert 0,043) und das T-Allel auf +5876 im Empfänger bei den Lymphompatienten (Hazard Ratio 4,162, p-Wert 0,007) mit einer erhöhten GvHD-assoziierten-Mortalität verbunden, mit einer Inzidenz von jeweils 0% (nur 4 Patienten insgesamt), 22% und 7% (GG, GA, AA) bzw. 0% (insgesamt 3 Patienten), 32% und 12,5% (TT, TC, CC).

Der Genotyp *-7400 Del/Ins* im Spender war bei Patienten, die eine T-Zell-Depletion erhielten, mit einem erhöhten Risiko für ein Versterben auf Grund von GvHD assoziiert (Hazard Ratio 2,520, p-Wert 0,043), während er bei Patienten ohne eine T-Zell-Depletion mit einer geringeren Rate von Tod durch GvHD assoziiert war (Hazard Ratio 0,419, p-Wert 0,019).

5 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war die Identifizierung molekularer Prädiktoren unter den SNPs in den Genen des Zytokins IL 10 und des IL 10-Rezeptors für das Auftreten und den Schweregrad der GvHD nach allogener Blutstammzelltransplantation. Die bereits identifizierten klinischen Risikofaktoren HLA-Mismatch, Geschlecht des Spenders und Alter des Empfängers ließen sich in unseren Analysen bestätigen. Der Einfluss von bekannten SNPs in den Genen von Interleukin 10 selbst und im Gen des Interleukin 10–Rezeptor alpha ließen sich in dieser Dissertation teilweise ebenfalls bestätigen. Der protektive Effekt der Kombination des *-597 A* im Patienten mit dem Genotyp *Rβ K47E G* im Spender, der für die Situation der MRD Transplantation beschrieben worden war, war in dem Patientenkollektiv dieser Arbeit allerdings nicht nachweisbar. Dieser Unterschied zu den publizierten Vordaten kann am ehesten auf das inhomogene Kollektiv von Patienten mit verschiedenen Grunderkrankungen, sowie der gesammelten Analyse von in MRD und MUD Situationen transplantierten Patienten erklärt werden. Für den Haplotyp *-3538 A/ -2763 A* fand sich nur eine signifikante Assoziation mit dem gehäuften Auftreten der chronischen GvHD bei Patienten, die ATG erhielten. Es ließ sich jedoch ein negativer Effekt des zuvor nicht untersuchten *IL 10 Rα G351R AA* im Spender auf das Auftreten einer aGvHD nachweisen. Dieser negative Effekt verstärkte sich noch bei Patienten, bei denen mittels ATG eine T-Zell-Depletion durchgeführt wurde. Einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben zeigte dieser Rezeptorgenotyp bei Vorhandensein im Empfänger.

Im Folgenden werden diese Ergebnisse mit Hilfe der aktuell vorliegenden Literatur detaillierter besprochen werden.

5.1 Negativer Einfluss der klinischen Variablen HLA-Mismatch, Geschlecht und Beziehung zum Spender auf das Auftreten einer schweren akuten GvHD

Das Vorliegen eines HLA-Mismatch ist als klinische Risikofaktor für das Auftreten einer akuten GvHD aufgrund der zentralen Rolle des HLA-Systems für die immunologische Gewebekompatibilität biologisch sehr gut erklärlich und in der Klinik der allogenen Stammzelltransplantation sehr gut dokumentiert (Flomenberg et al. 2004; Petersdorf 2004; Morishima et al. 2002). Die Zellen mit inkompatiblen HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche werden von dem transplantierten Immunsystem als fremd erkannt, und es wird eine Immunreaktion ausgelöst. Trotz des bekannten Risikos für das Auftreten einer GvHD kann es aber in Abhängigkeit von der klinischen Situation, insbesondere dem Vorliegen einer chemotherapierefraktären Erkrankung und hoher Dringlichkeit zur Therapie, gerechtfertigt sein, einen 1/10-Locus-mismatch für die allogene Stammzelltransplantation zu akzeptieren. Das Vorliegen eines HLA-Mismatch überwiegt in der Gruppe der Patienten mit einem Fremdspender (50 Patienten MUD, 2 Patienten MRD in unserem Kollektiv), da Familienspender nur in den Ausnahmefällen einer Rekombination im HLA-Haplotyp nicht auf allen 10 untersuchten HLA-Loci übereinstimmen.

So erwies sich der HLA-Mismatch auch in unserem Kollektiv als hoch signifikanter Risikofaktor für das Auftreten einer schweren akuten GvHD in der Gruppe der MUD.

Als ein signifikanter Risikofaktor für eine aGvHD erwies sich der HLA-Mismatch auch in der Gruppe der MRD (nur 2 Patienten) und in der Gruppe der Patienten, die ATG erhielten (MRD OR 2,373, p-Wert 0,017 und T-Zell-Depletion OR 3,720, p-Wert 0,003).

Bei Empfängern mit einem Fremdspender wird zur Abmilderung der Immunreaktion gegen Antigene auch außerhalb des HLA-Lokus eine T-Zell-Depletion durchgeführt. In der Situation der Familienspendertransplantation wird dagegen eine T-Zell-Depletion mit ATG in der Regel in Situationen durchgeführt, in denen aufgrund weiterer Risikofaktoren auch bei HLA-Kompatibilität das Auftreten von GvHD mit erhöhter Wahrscheinlichkeit erwartet wird. Dies war in dem Patientenkollektiv dieser Arbeit bei zwei Patienten der Fall. Von diesen 2 Patienten entwickelte einer eine schwere akute GvHD Grad IV und ist verstorben, während der zweite Patient keine GvHD entwickelte und zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch lebte. Von den Patienten, bei denen ein HLA-Mismatch vorlag und die kein ATG erhielten (insgesamt 11 Patienten) verstarben 9, davon 3 an den Folgen einer GvHD. 10 dieser Patienten bekamen die Stammzellen eines Fremdspenders und ein Patient von einem

Familienspender. Von den Patienten, die ATG zur T-Zell-Depletion erhielten, insgesamt 40 Patienten, verstarben zwar auch 21 der Patienten, 8 davon an den Folgen einer GvHD, aber 19 der Patienten mit einem HLA-Mismatch lebten zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch, davon 1 MRD Patient und 18 MUD Patienten.

Die Unterschiede im Auftreten von GvHD oder des Überlebens in Abhängigkeit vom Mismatch auf HLA-Klasse 1 Loki (HLA-A, -B und C) versus einem Mismatch auf Loki der HLA-Klasse 2 (HLA-DR und -DQ) wurden auf Grund des kleinen Datensatzes nicht weiter untersucht.

Wie oben bereits erwähnt, wird bei Patienten mit einem Fremdspender häufig eine T-Zell-Depletion durchgeführt, in unserem Kollektiv erhielten 155 der 225 MUD-transplantierten Patienten ATG. Die Gabe von ATG zur Depletion der T-Zellen hat den Analysen von Finke et al. zufolge einen protektiven Effekt gegen eine schwere akute GvHD sowie eine extensive chronische GvHD (Finke et al. 2009). Diese Analysen zeigten keinen Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten durch die Gabe von ATG. In vorangegangenen Analysen hatten sich dagegen tendenziell geringere Transplantations-assoziierte-Überlebensraten auf Grund einer erhöhten Rate an schweren Infektionen und einer erhöhten Rezidivneigung vor allem bei Patienten mit einer CML gezeigt (Bacigalupo et al. 2001; Wagner et al. 2005). In unseren Analysen zeigte sich ein geringeres Gesamtüberleben für die Patienten mit einem Fremdspender, die ATG erhielten. Zusätzlich muss jedoch auch beachtet werden, dass es unterschiedliche Arten von ATG und verschiedene Dosierungen gibt, die eventuell auch einen Einfluss auf den Effekt haben könnten. In unseren Analysen zeigte sich neben dem negativen Effekt auf das Gesamtüberleben auch ein stark erhöhtes Risiko für eine akute GvHD bei Patienten mit einem Spender Genotyp *IL 10 Rα G351R* AA/AG, die ATG zur T-Zell-Depletion erhielten (detaillierte Diskussion dieses Ergebnisses weiter unten im Verlauf). Dies zeigt, dass eine differenzierte Untersuchung der Wirkung von ATG unbedingt nötig ist, um zu verstehen, für welche Patienten dadurch ein positiver Effekt entsteht.

Ein männlicher Spender war in der Gruppe der Empfänger ohne eine T-Zell-Depletion sowie in der Gruppe der MUD mit einem erhöhten Risiko für eine akute GvHD assoziiert. Die Kombination eines weiblichen Spenders mit einem männlichen Empfänger jedoch zeigte keine signifikante Assoziation. In einer Situation mit einem Geschlechtsunterschied zwischen Spender und Empfänger, könnten Gewebsmerkmale, die auf dem Y-Chromosom kodiert sind (H-Y-Antigene), für eine Reaktion gegen die Zellen des anderen Geschlechts ursächlich sein

(Ho und Soiffer 2001; Flowers et al. 1990) und so zu einer überschießenden Immunreaktion im Sinne einer GvHD führen. Für ein erhöhtes Risiko einer Transplantatabstoßung bei der Kombination männlicher Spender/ weiblicher Empfänger werden H-Y-Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen des weiblichen Empfängers für den Effekt verantwortlich gemacht (Voogt et al. 1990). Für ein erhöhtes Risiko einer aGvHD wurde ein signifikanter Effekt bisher allerdings nur für die Kombination weiblicher Spender/ männlicher Empfänger nachgewiesen (Gale et al. 1987). Der Parameter „vorhergehende Schwangerschaft“ wurde in unserem Kollektiv nicht erfasst.

Eine Transplantation von einem Fremdspender geht, den Analysen von Tseng et al. folgend, mit einer höheren Rate an schwerer akuter GvHD einher (Tseng et al. 2009). Bei einem Fremdspender sind größere Unterschiede in der Antigenität zwischen Spender und Empfänger zu erwarten als bei einem Familienspender. Dieser Effekt konnte in unserem Datensatz nicht signifikant nachgewiesen werden (21,8% in der Gruppe MUD und 21,2% bei den MRD). Eine MUD-Transplantation war jedoch mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert als eine Transplantation von einem Familienspender.

5.2 Stark erhöhtes Risiko für eine akute GvHD durch die Spender-Genvariante *IL 10 R α G351R AA*

Der Genotyp *IL 10 R α G351R AA/AG* im Spender mit dem größten Risiko für den Genotyp *AA* ist mit einem erhöhten Risiko für eine schwere akute GvHD assoziiert. Dieser Effekt war verstärkt bei Patienten fest zu stellen, die vor der Transplantation ATG erhielten. Der T-Zell-depletierende Effekt von ATG, der normalerweise protektiv wirkt und die Rate an aGvHD senkt (Finke et al. 2009), kehrt sich bei dieser Untergruppe an Patienten in das Gegenteil um. Von den 15 Patienten, deren Spender homozygot für *R α G351R AA* war und die eine T-Zell-Depletion mittels ATG erhielten, entwickelten insgesamt 9 Patienten eine aGvHD, davon 7 Patienten eine schwere aGvHD Grad III oder IV. 6 dieser Patienten verstarben, 5 davon an den Folgen der GvHD. Das Vorhandensein dieses homozygoten Genotyps im Patienten selbst, ebenfalls in der Kombination mit ATG, war nur bei einem Patienten mit einer schweren akuten GvHD assoziiert (insgesamt 13 Patienten). In der Untergruppe der MRD war dieser Genotyp (*R α G351R AA*) auch mit einer höheren GvHD-assoziierten-Mortalität assoziiert.

Der IL 10 Rezeptor besteht aus einer α - und einer β -Einheit. Die β -Einheit des Rezeptors wurde in mehreren Studien ausführlich untersucht, und es wurde ein protektiver Effekt für den *R β K47E* Genotyp GG im Spender nachgewiesen (Lin et al. 2005; Tseng et al. 2009). Analysen der α -Einheit des IL 10-Rezeptors beziehen sich größtenteils auf den *R α G159S* (Glocker et al. 2009; Begue et al. 2011). Der *R α G351R* wurde bisher nicht funktionell oder in genetischen Assoziationsstudien untersucht, weshalb die funktionelle Bedeutung dieses Polymorphismus bisher nicht bekannt ist. Eine funktionelle Rolle dieses Polymorphismus erscheint aber prinzipiell möglich, da er im codierenden Bereich des Gens liegt und mit einem Austausch der Aminosäure Glycin gegen Arginin verbunden ist.

Eine Ursache für den negativen Effekt des Vorliegens von *R α G351R* im Sinne eines erhöhten Risikos für eine aGvHD könnte die gestörte Hemmung der proinflammatorischen Zytokinausschüttung bei Vorliegen dieses Rezeptor-Genotyps sein. Dieser Effekt ist unabhängig von der Menge an vorhandenem IL 10, sondern könnte auf einer veränderten Signalübertragung bei der Bindung von IL 10 an den Rezeptor mit *R α G351R*-Polymorphismus liegen (siehe Abbildung 11). So könnte es zu einer geringeren Übertragung des hemmenden Signals und somit trotz Vorhandenseins von IL 10 zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel TNF α , INF γ , IL 1 α und β , IL 6 und IL 12 kommen, die dann eine stärkere Reaktion auf das als fremd erkannte Gewebe vermitteln.

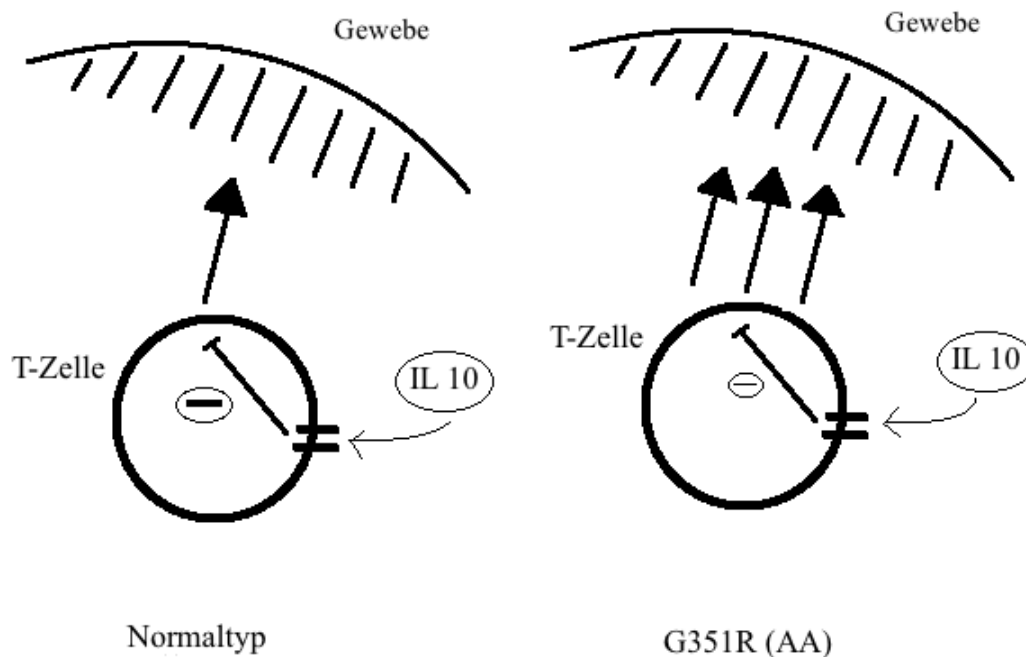


Abbildung 11: Putativer funktioneller Unterschied Normaltyp-IL-10 Rezeptor α und α G351R AA. Die Signalübertragung über den Rezeptor G351R AA ist geringer als über den Rezeptor ohne Polymorphismus. Dadurch könnte es zu einer stärkeren Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch die Effektorzelle und einem größeren Gewebeschaden kommen.

Dies erklärt aber noch nicht den verstärkten negativen Effekt bei Patienten, die ATG zur T-Zell-Depletion erhielten. Zur Erklärung können zwei Hypothesen formuliert werden, die experimentell zu überprüfen wären. Zunächst erfolgte die ATG-Gabe bei den Patienten, bei denen aufgrund klinischer Risikofaktoren die Wahrscheinlichkeit des Auftretens signifikanter GvHD als signifikant eingeschätzt wurde. Dadurch ist nicht abzugrenzen, ob und in welchem Ausmaß der Polymorphismus zu dem vermehrten Auftreten von GvHD Anteil hat. Alternativ könnte auch eine auf einem biologischen Effekt des α G351R Polymorphismus beruhende Hypothese formuliert werden. Die T-Zell-Depletion trifft unspezifisch die Zellen des Empfängers und nach Gabe der Spender-Stammzellen auch die Zellen des Spenders. Dadurch werden Zellen zerstört, die sonst Interleukin 10 produzieren. Es ist also zu diskutieren, ob durch die Gabe von ATG weniger Interleukin 10 im Serum vorhanden ist. Dies könnte dazu führen, dass sich der Effekt der $IL\ 10\ \alpha\ G351R$ – Rezeptoreinheit weiter verstärkt. Bei diesen Patienten wäre also die Übertragung des IL 10-Signals verändert und zusätzlich weniger IL 10 vorhanden. Mit Blick auf den häufigen Einsatz von ATG in der allogenen Stammzelltransplantation, insbesondere bei Empfängern mit erhöhtem Risiko für das

Auftreten von GvHD, erscheinen weitere Analysen zu möglichen biologischen Ursachen der Assoziation des Vorliegens des Polymorphismus *Rα G351R* und dem Auftreten schwerer GvHD klinisch wichtig.

5.3 Protektiver Effekt auf das Gesamtüberleben durch den Empfänger-Genotyp *Rα G351R* AA

Einen günstigen Effekt für eine erhöhte Gesamtüberlebensrate zeigte hingegen das Vorliegen des Genotyps *IL 10 Rα G351R* AA im Patienten (Hazard Ratio 0,438). Von den 30 Patienten mit diesem Genotyp verstarben nur 9 Patienten (30%), 3 dieser Patienten aufgrund einer schweren aGvHD (insgesamt entwickelten auch nur 3 der 30 Patienten eine schwere aGvHD). In der Untergruppe der MUD reichte schon das Vorliegen nur eines A-Allels für diesen günstigen Effekt.

Da die genaue funktionelle Bedeutung des Polymorphismus *Rα G351R* noch nicht geklärt ist, können nur theoretische Überlegungen über dessen Funktionsweise angestellt werden. Ausgangspunkt für derartige Überlegungen wäre, dass die IL-10-Rezeptor-tragende Zelle, in der der Rezeptorpolymorphismus funktionell relevant wäre, eine Zellpopulation des Spenders ist, die die unmittelbare Toxizität der Konditionierung zur allogenen Stammzelltransplantation überdauert. Um welche Zellen es sich dabei handelt, z.B. Endothelzellen oder dendritische Zellen, ist derzeit noch nicht bekannt.. Bei 7 Patienten lag die Kombination *Rα G351R* AA im Spender/ *Rα G351R* AA im Patienten vor. Interessanterweise überwog in dieser Gruppe der protektive Effekt des homozygoten Patienten-Genotyps gegenüber dem negativen Effekt des homozygoten Spenders. Von diesen 7 Empfängern entwickelte nur einer eine schwere aGvHD und verstarb auch an deren Folgen. Von den noch lebenden restlichen 6 Patienten entwickelten diejenigen mit einer AML als Grunderkrankung (2 Patienten) eine akute GvHD Grad II während bei den Patienten mit einem Lymphom eine extensive chronische GvHD vorlag (3 Patienten, 1 Lymphompatient entwickelte gar keine GvHD). Hier zeigt sich eine wichtige Rolle des Immunsystems des Empfängers für das Überleben und eventuell auch für die Entwicklung einer schweren akuten GvHD.

Bei Lymphompatienten war der Genotyp *Rα G351R* AA im Empfänger mit einem erhöhten Risiko für eine chronische GvHD assoziiert. Von den 12 Lymphompatienten mit diesem Genotyp (AA) entwickelten 8 eine chronische GvHD (66,7%), 4 davon eine extensive

cGvHD. Im Vergleich dazu entwickelten nur 3 der Leukämiepatienten mit diesem Genotyp eine cGvHD (insgesamt 10 Patienten): 2 Patienten in limitierter Form und einer in der extensiven Form. Laut Zouh et al. ist ein erhöhter Interleukin 10 Spiegel im Serum assoziiert mit einer erhöhten relativen Häufigkeit für das Auftreten von cGvHD (Zhou et al. 2007). Dies würde bedeuten, dass eine verminderte Signalübertragung des IL 10 Signals über den *Rα G351R* AA mit einem niedrigeren Risiko für eine cGvHD assoziiert sein müsste. P. Martin erklärt in seinem Paper „Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach“ eine vorangehende aGvHD als den wichtigsten Risikofaktoren für eine cGvHD (Martin 2008). In unseren Analysen war allerdings der Genotyp des Spenders mit homozygotem *Rα G351R* AA mit einer erhöhten Rate an aGvHD assoziiert, und dieser Genotyp im Empfänger im Falle der Lymphom-Patienten mit einer erhöhten Rate an cGvHD. Zudem lag für die Lymphompatienten kein offensichtlicher Zusammenhang des Auftretens von akuter und nachfolgend chronischer GvHD vor. Bei nur 4 der 8 Patienten, die eine cGvHD entwickelten, lag zuvor eine akute GvHD vor (1x Grad I, 2x Grad II und 1x Grad III). Auch diesbezüglich erscheinen weitere, klinische und zellbiologische Untersuchungen zum Verständnis der pathobiologischen Zusammenhänge notwendig.

5.4 Protektiver Effekt durch den Genotyp -597 A-Allel im Patienten in Kombination mit dem *Rβ K47E* G-Allel im Spender

Die Kombination des -597 A-Allels im Patienten mit dem *Rβ K47E* G-Allel im Spender war in vorangegangenen Arbeiten als mit einem reduzierten Risiko für eine schwere akute GvHD assoziiert beschrieben worden (Lin et al. 2005). Der protektive Effekt dieser Kombination (-597 A-Allel im Patienten /*Rβ K47E* G-Allel im Spender), war in unserem Datensatz nur sehr schwach in der Tendenz erkennbar (p-Wert 0,701), während sich der alleinige protektive Effekt des *Rβ K47E* G-Allel im Spender bei Lymphompatienten als signifikant zeigte (p-Wert 0,026).

Die Variante GG des Polymorphismus in der β -Kette des IL 10 Rezeptors (*Rβ*) führt zu einem Austausch der Base A gegen G auf Codon 47, welches in einem Austausch von Lysin gegen Glutamin resultiert. Durch diese Veränderung kommt es zu einer Hochregulation der messenger RNA (mRNA) und zu einer Zunahme des *Rβ*-GG auf der Zelloberfläche. Dies führt zu einer verbesserten IL 10 vermittelten Hemmung der TNF α -Ausschüttung in Monozyten (Frodsham et al. 2006) und damit zu einer geringeren Rate an schwerer akuter

GvHD. Nach Holler et al. hat eine hohe Interleukin 10 Produktion einen schützenden Effekt gegen die aGvHD (Holler et al. 2000). Die Variante -597 AA mit ihrem protektiven Effekt gegen eine aGvHD müsste folglich mit erhöhten IL-10-Spiegeln im Serum assoziiert sein. Miura et al. haben aber reduzierte IL 10 messenger RNA in mononukleären peripheren Blutzellen bei Patienten mit dem Genotyp -597 AC oder -597 AA nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass die genaue Wirkung dieses Polymorphismus noch nicht ausreichend verstanden ist. Eine Ursache könnte zum Beispiel die Lage des Polymorphismus innerhalb einer Bindungsstelle im IL 10-Rezeptor sein. Der Austausch von C zu A (-597) liegt innerhalb der vermeintlichen Bindungsstelle des STAT 3, während zum Beispiel der -1087 Polymorphismus von G nach A innerhalb der mutmaßlichen ETS-Transkriptionsfaktor Bindungsstelle liegt (Crawley et al. 1999; Miura et al. 2002). Über -1087 G gibt es widersprüchliche Analysen. Wenn -1087 G allerdings mit einem erhöhten IL 10 Level einhergeht und ein größeres Risiko für eine schwere aGvHD zur Folge hat (Crawley et al. 1999; Miura et al. 2002; Stanilova et al. 2006), könnte der Unterschied zu dem protektiven Effekt des -597 A in der unterschiedlichen Übertragung des Signals in der Bindungsstelle liegen.

Unser Patientenkollektiv setzt sich aus MRD- und MUD-Transplantationen zusammen, mit einem Überwiegen der MUD von circa 2/3 zu 1/3 (225 MUD, 132 MRD). Die Analyse von Lin et al. basierte auf einem reinen MRD-Kollektiv. Tseng et al. untersuchten diese Assoziation 2009 an einem MUD-Kollektiv und konnten den protektiven Effekt in diesem Kollektiv nicht signifikant nachweisen (Tseng et al. 2009).

In der Überlebenszeitanalyse dieser SNP-Kombination (Genotyp -597 A-Allel im Patienten /*Rβ K47E* G-Allel im Spender) zeigte sich ein schlechteres Gesamtüberleben für Patienten mit einer akuten Leukämie (Hazard Ratio 2,737, p-Wert 0,004). Ursache dafür könnte eventuell das deutlich schlechtere Gesamtüberleben der Patienten mit einem *Rβ K47E* GG -Spender in der Gruppe der Fremdspender (MUD) sein (Hazard Ratio 3,062, p-Wert 0,010), da von den 132 Leukämiepatienten 81 Stammzellen von einem Fremdspender erhielten. Wenn also die MUD-Transplantationen in der Gruppe der Leukämiepatienten für den negativen Effekt auf das Gesamtüberleben der Leukämiepatienten mit der SNP-Kombination Genotyp -597 A-Allel im Patienten /*Rβ K47E* G-Allel im Spender sorgen, trifft darauf wieder zu, dass sich der positive Effekt für diese Patienten bisher nicht bestätigen ließ. Es bleibt allerdings mechanistisch unverstanden, warum sich die bessere Hemmung der proinflammatorischen Zytokine durch den *Rβ K47E* GG nur bei Patienten mit einem Familienspender positiv auf das Auftreten einer aGvHD und das Überleben auswirkt.

In der Gruppe der Patienten mit einem Familienspender und dem Genotyp -597 AA (mit ansteigendem Effekt in Abhängigkeit der Anzahl des A-Allels) zeigte sich auch in dem Kollektiv dieser Arbeit eine höhere Gesamtüberlebensrate (Hazard Ratio 0,634, p-Wert 0,05) und bestätigte die Ergebnisse von Lin et al (Lin et al. 2003).

5.5 Erhöhtes Risiko für eine chronische GvHD bei Vorhandensein des distalen Haplotyps A-A (-3538 (AT) und -2763 (AC))

Die proximalen SNPs -1087 (AG), -824 (CT) und -597 (AC) sind zu 98% miteinander gekoppelt, treten also in bestimmten Haplotypen auf (ATA, GCC und ACC) (Crawley et al. 1999; Mörmann et al. 2004; Turner et al. 1997). Die proximalen Haplotypen ATA und ACC sind wiederum an den distalen TC-Haplotyp (-3538 (AT), -2763 (AC)) gekoppelt, während der proximale GCC-Haplotyp mit AA, AC, TA oder TC gekoppelt sein kann (Lin et al. 2003). Unser Kollektiv war zu klein, um diese ausgedehnten Haplotypen-Analysen durchzuführen. Unsere Analyse beschränkte sich daher auf die Gruppierung der beiden SNPs -3538 (AT) und -2763 (AC) in der distalen 5'-flankierenden Region des Interleukin 10-Gens. Eine signifikante Assoziation zeigte sich nur für die chronische GvHD. Der Haplotyp A-A (sowohl bei Vorliegen im Empfänger als auch im Spender) war bei Patienten, die ATG erhielten, mit einer erhöhten Rate an cGvHD assoziiert. Es existieren wenige Analysen dieses Haplotyps in Bezug auf die chronische GvHD. Tseng et al. haben in ihrer Analyse der unverwandten Spender ebenso ein erhöhtes Risiko für eine extensive chronische GvHD für Empfänger mit dem Genotyp -2763 AA gefunden, diese zeigte jedoch statistisch keine Signifikanz (Tseng et al. 2009).

Das Auftreten des A-Allels auf -2763 war, ebenfalls in der Gruppe der Empfänger die kein ATG erhielten, mit einem erhöhten Risiko für eine schwere akute GvHD assoziiert. Hier bestätigt sich ein Ergebnis von Lin et al., die in ihren Analysen den Genotyp CC auf -2763 als einen protektiven Faktor identifiziert hatten. In unserem gesamten Datensatz ist dieses Ergebnis zwar in der Tendenz vorhanden, jedoch nicht signifikant (OR 1,145, p-Wert 0,177) (Lin et al. 2003).

Der distale Haplotyp A-A (-3538/-2763) geht mit einer niedrigen Interleukin 10 Produktion einher (Gibson et al. 2001). Eine höhere Rate an akuter GvHD würde die Ergebnisse von Holler et al. stützen, dass eine erhöhte IL 10-Produktion schützend gegen eine aGvHD wirkt (Holler et al. 2000).

Die Pathophysiologie der chronischen GvHD ist sehr viel schlechter verstanden als die der aGvHD. Eine akute GvHD gilt als ein Risikofaktor für eine chronische GvHD (Martin 2008). Die Ursache hierfür könnte eine ausgedehnte Schädigung des Thymus und die damit einhergehende gestörte negative Selektion der T-Zellen durch die akute GvHD sein. Hierdurch kommt es zu einer gestörten Entwicklung von regulatorischen T-Zellen, die eine chronische GvHD verhindern könnten. Wenn also der Haplotyp -3538 A/-2763 A mit einer schweren aGvHD assoziiert ist, könnte dies auch zu einer Entwicklung einer chronischen GvHD beitragen.

P. Martin berichtet über einen positiven Effekt von einem erhöhten TNF α Level auf die Inhibition der kutanen Fibrose im Rahmen der cGvHD sowie über erhöhte Interleukin 10-Level bei Patienten mit einer cGvHD (Martin 2008; Zhou et al. 2007). Der niedrige IL 10-Spiegel, der mit dem Haplotyp A-A assoziiert ist, führt zu einer geringeren Inhibition der proinflammatorischen Zytokine wie zum Beispiel TNF α , was, entgegengesetzt zu unseren Ergebnissen für den Haplotyp A-A, P. Martin zu Folge eher schützend gegen eine kutane cGvHD wirken sollte.

5.6 Negativer Einfluss des Genotyps -1087 GG (Patient und Spender) auf das Auftreten einer chronischen GvHD und gegensätzlicher Effekt des Genotyps -824 T-Allel im Spender

Der SNP -1087 Genotyp GG wird, wie oben bereits erwähnt, meistens mit einer erhöhten Interleukin 10-Produktion assoziiert. Crawley et al. stellten in ihren Analysen eine stärkere Transkriptionsaktivität mit erhöhten Interleukin 10-Spiegeln bei Vorhandensein des GCC-Haplotyps (-1087 (AG), -824 (CT) und -597 (AC)) als bei dem ACC- und dem ATA-Haplotypen fest (Crawley et al. 1999). Andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen mit einem erhöhten IL 10- Spiegel für den Genotyp -1087 GG (Rieth et al. 2004; Stanilova et al. 2006; Miura et al. 2002). In unserem Gesamtdatensatz ist der Genotyp -1087 GG im Empfänger und im Spender mit einem erhöhten Risiko für eine chronische GvHD assoziiert (dieses gilt auch für die Untergruppe der Lymphompatienten und für Patienten die kein ATG erhielten). Dies passt zu den Ergebnissen von Martin und Zhou et al., dass ein erhöhter IL 10-Spiegel mit einer cGvHD assoziiert ist. Davon ausgehend, dass der Genotyp -824 T mit den beiden proximalen SNPs -1087 und -597 gekoppelt ist und den Haplotyp ATA bildet, geht dieser Genotyp mit einem niedrigen Interleukin 10-Serumlevel einher. Dieser SNP (Genotyp

-824 T) wirkt in unserem Kollektiv folgerichtig auch protektiv gegen eine chronische GvHD bei Auftreten im Spender in der Gruppe der MUD (OR 0,401, p-Wert 0,030).

Der Genotyp -824 T im Empfänger bewirkt ebenfalls einen signifikanten Effekt. Im Gegensatz zu dem Genotyp -824 T im Spender, der protektiv gegen eine cGvHD in der Gruppe der Fremdspender wirkt, erhöht dieser Genotyp bei Vorhandensein im Empfänger in der Gruppe der Familienspender das Risiko für eine cGvHD. Eine Rolle für diesen unterschiedlichen Effekt könnte die Beziehung zwischen Spender und Empfänger spielen. Der protektive Effekt des -824 T trifft nur für die Patienten mit einem Fremdspender zu, während der negative Effekt bei den Familienspendern auftrat.

Es ist zu diskutieren, warum der Genotyp -824 TT signifikanten Einfluss auf das Auftreten einer cGvHD zeigt und der Genotyp -597 AA nicht. Diese sollten durch die Bildung des Haplotyps ATA im gleichen Maße im Kollektiv vorhanden sein und denselben Effekt bewirken. Auch in dem Kollektiv dieser Arbeit zeigten die beiden SNPs -597 und -824 eine starke Kopplung (p-Wert < 0,001). Bei allen Patienten mit dem Genotyp -824 TT fand sich der Genotyp -597 AA (12 Patienten). So werden bei der multivariaten Regressionsanalyse die Variablen mit dem stärksten Effekt herausgefiltert. Wenn einer signifikant erkannt wird, kann der damit verbundene zweite Faktor nicht auch als unabhängig signifikant assoziiert ermittelt werden, da er keinen zusätzlichen Effekt verursacht. Das heißt, dass der -597 AA ebenfalls bei Vorhandensein im Spender einen protektiven Effekt (Untergruppe MUD) und bei Ausprägung im Empfänger einen negativen Effekt (Untergruppe MRD) für das Auftreten einer cGvHD auslöst. Der Genotyp -597 AA geht laut Miura et al mit einer niedrigen Interleukin 10-Produktion einher (Miura et al. 2002). Wenn also hohe IL 10-Spiegel einen verstärkenden Effekt auf die cGvHD ausüben, sollte der niedrige IL 10-Spiegel durch den Genotyp -597 AA protektiv gegen eine cGvHD wirken (Zhou et al. 2007; Martin 2008). Des Weiteren gilt der -597 AA, allerdings bei MRD-transplantierten Patienten, als protektiv gegen eine schwere akute GvHD (Lin et al. 2005). Da die aGvHD als größter Risikofaktor für das Auftreten einer cGvHD gilt, sollte bei diesen Patienten auch eine cGvHD seltener auftreten. Der Genotyp -597 AA war allerdings in dem Kollektiv dieser Arbeit nur bei MUD-transplantierten Patienten mit einem protektiven Effekt assoziiert. Eventuell führte die geringere Rate an aGvHD, die in unserem Datensatz allerdings nicht signifikant nachweisbar ist, dazu, dass die Überlebenszeit dieser Patienten, vor allem in der Frühphase, länger war und dadurch verhältnismäßig mehr Patienten eine cGvHD entwickeln konnten.

Des Weiteren ergaben unsere Analysen eine geringere Gesamtüberlebensrate für die Patienten mit dem homozygoten Genotyp -824 TT (Gesamtkollektiv, MRD und Lymphompatienten).

Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig, da die Pathophysiologie der cGvHD sehr viel schlechter verstanden ist, als die der aGvHD. Eine Analyse der proximalen Haplotypen ATA, ACC und GCC und ihr Einfluss auf die cGvHD wäre dafür sicherlich sinnvoll.

5.7 Erhöhte GvHD-assoziierte Mortalität durch den Genotyp -7400 DelIns im Spender bei T-Zell-depletierten Patienten

Eine Deletion des Basenpaares „GGA“ auf -7400 (Genotyp -7400 DelIns) im Spender war bei Patienten, bei denen eine T-Zell-Depletion durchgeführt wurde, mit einer erhöhten GvHD-assoziierten Mortalität assoziiert (Hazard Ratio 2,520), während sie bei Patienten ohne eine T-Zell-Depletion protektiv wirkte (Hazard Ratio 0,419). Rieth et al. zeigte 2004, dass der homozygote Genotyp -7400 DelDel sowie der heterozygote Genotyp -7400 DelIns mit einer erhöhten Sekretion von Interleukin 10 assoziiert sind (Rieth et al. 2004). Dies würde Holler et al., zur Folge in einer geringeren Rate an aGvHD resultieren und somit auch in einer geringeren GvHD-assoziierten-Mortalität (Holler et al. 2000). Durch die Depletion der T-Zellen könnten allerdings, wie oben bereits diskutiert, weniger Interleukin 10-produzierende Zellen vorhanden sein und dadurch den protektiven Effekt der erhöhten Interleukin 10-Sekretion durch den Genotyp -7400 DelIns aufheben. Da der unterschiedliche Effekt jeweils nur bei Auftreten des Genotyps -7400 DelIns im Spender eine Signifikanz zeigte, würde dies bedeuten, dass ATG nicht nur auf die Empfänger T-Zellen, sondern auch auf die Spender T-Zellen einen Effekt hat.

5.8 Ausblick

Die GvHD zählt zu einer gefürchteten Komplikation bei Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Sowohl die akute wie auch die chronische GvHD können bis zum Tode des Patienten führen oder durch Organschäden und die langandauernde intensive Immunsuppression die Lebensqualität der Patienten sehr beeinträchtigen. Es fehlt bis heute das genaue Verständnis, warum einige Patienten eine schwerwiegende GvHD entwickeln, während andere Patienten von einer nur leichtgradig auftretenden GvHD auf Grund eines damit assoziierten GvL-Effektes sogar profitieren. Es wurden über die HLA-Kompatibilität hinaus einige klinische Risikofaktoren identifiziert, die jedoch nicht ausreichen, um diese

Unterschiede vollständig zu erklären. Umso wichtiger ist die Identifizierung molekularer Prädiktoren für das Auftreten einer GvHD.

In dieser Arbeit wurde mit dem *Rα G351R* AA-Genotyp im Spender ein weiterer molekularer Einflussfaktor auf die Entstehung einer schweren aGvHD erstmalig beschrieben. Dieser Effekt sollte nun in einem unabhängigen Patientenkollektiv validiert werden, auch um die Assoziation mit einer höheren Inzidenz an schwerer akuter GvHD bei Patienten, die ATG erhielten, detaillierter zu untersuchen. Um den Effekt besser zu verstehen, sollte diese Genvariante auch in ihrer Funktionalität *in vitro* untersucht werden. Für diese Patienten hat die bisher als protektiv eingeschätzte Gabe von ATG einen negativen Effekt. Neben dem Interleukin 10 sind noch viele weitere Zytokine an der Entstehung bzw. der Verhinderung einer GvHD beteiligt und es ist wichtig, hier mit der Genotypisierung von Kandidatengen fortzufahren, um weitere funktionell bedeutsame Genvarianten zu identifizieren. Im Erfolgsfalle wird durch die Identifizierung dieser Varianten die Erstellung eines genetischen Profils der Patienten vor der geplanten Stammzelltransplantation möglich. Mit Hilfe dieses Profils kann eine bessere Einschätzung des individuellen Risikos getroffen und gegebenenfalls die Medikation frühzeitig dementsprechend angepasst werden.

6 Zusammenfassung

Zur verbesserten Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer schweren Graft versus Host Disease (GvHD) nach allogener Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation bedarf es über aktuell bekannte klinische Risikofaktoren hinaus weiterer Parameter. Das Interleukin 10 spielt neben anderen Zytokinen aufgrund seiner antiinflammatorischen Funktion eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der GvHD. Ziel dieser Dissertation war daher die Identifizierung molekularer Prädiktoren für das Auftreten von GvHD speziell in den genetischen Polymorphismen der Zytokingene sowie deren Rezeptoren aus der IL-10/IL-10R-Familie.

Für die Analyse wurden die GvHD-relevanten klinischen Daten von 360 konsekutiven Patienten ausgewertet, die zwischen 2001 und 2011 in der Universitätsmedizin Göttingen eine allogene Transplantation erhielten. Für diese Analyse geeignetes genetisches Material war für 326 der 360 Patienten vorhanden. Es wurde eine Genotypisierung ausgewählter Single Nucleotide Polymorphisms des IL 10-Gens und des IL 10-Rezeptorgens mittels SNaPshot-Analyse und TaqMan® Genotyping Assays vorgenommen. Durch multivariate

logistische Regressionsanalysen der Daten mit Bezug zum klinischen Verlauf wurden Genvarianten mit Einfluss auf das Auftreten und den Schweregrad der GvHD identifiziert.

In Voruntersuchungen war der SNP *IL-10 -597* Genotyp A (= *IL-10 -592*) im Patienten, in Kombination mit dem G-Allel im SNP *IL-10R β K47E* (= *IL-10R β c238*) im Spender, bereits als wichtiger protektiver Faktor gegen eine schwere aGvHD in Matched-related-Donor (MRD)-transplantierten Patienten beschrieben worden (Hansen et al., 2007). Der protektive Effekt dieser Kombination war in unserem Datensatz über alle Patienten hinweg nur als Tendenz erkennbar, während sich der alleinige protektive Effekt des *R β K47E* G-Allel im Spender bei Patienten mit malignen Lymphomen als signifikant erwies. In der Gruppe der MRD war das Vorhandensein des Genotyps AA auf *IL-10 -597* verglichen mit dem Genotyp CC mit einer höheren Überlebensrate assoziiert, allerdings bei sehr kleinen Fallzahlen. Weiterhin erwies sich für die chronische GvHD im gesamten Datensatz, sowie auch gesondert für Patienten ohne eine T-Zell-Depletion, der proximale SNP *IL-10 -1087* Genotyp GG des Patienten als assoziiert mit einem erhöhten Auftreten von chronischer GvHD. Für den Haplotyp *-3538 A/ -2763 A* in der distalen 5'-flankierenden Region des Interleukin 10-Gens fand sich nur eine signifikante Assoziation mit dem gehäuften Auftreten der chronischen GvHD bei Patienten, die im Rahmen der Konditionierung Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) erhalten hatten.

Unter den in dieser Untersuchung erstmalig analysierten Polymorphismen des IL 10-Rezeptorgens wurde ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten einer schweren akuten GvHD (Grad III und IV) für Patienten festgestellt, die mit einem Spender des Genotyps *IL 10 R α G351R AA* transplantiert worden waren. Dieses Risiko war weiter erhöht für die Patienten festzustellen, die zur T-Zell-Depletion im Rahmen der Konditionierung ATG erhalten hatten. Der Einsatz des als prophylaktisch gegen das Auftreten einer schweren GvHD genutzten ATGs war bei dieser Patientengruppe also mit einer zusätzlichen Risikoerhöhung für das Auftreten einer schweren GvHD assoziiert.

Die Bedeutung der in dieser Arbeit erstmalig untersuchten SNPs, insbesondere des Polymorphismus *IL 10 R α G351R AA*, sollte in unabhängigen Patientenkollektiven hinsichtlich seiner klinischen Relevanz weiter überprüft werden. Sollte sich die Assoziation des Vorliegens von *IL 10 R α G351R AA* im Spender mit einem erhöhten Risiko für schwere GvHD bestätigen, könnte die Typisierung der Patienten hinsichtlich dieses und anderer bereits

identifizierter SNPs vor einer geplanten Stammzelltransplantation zu einer verbesserten individuellen Risikoerfassung und Optimierung der Therapie führen.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1:	14
ABBILDUNG 2:	32
ABBILDUNG 3:	32
ABBILDUNG 4:	32
ABBILDUNG 5:	35
ABBILDUNG 6:	41
ABBILDUNG 7:	45
ABBILDUNG 8:	47
ABBILDUNG 9A:	52
ABBILDUNG 10:	63
ABBILDUNG 11:	70

7.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1:	12
TABELLE 2:	22
TABELLE 3:	24
TABELLE 4:	24
TABELLE 5:	24
TABELLE 6:	25
TABELLE 7:	25
TABELLE 8:	26
TABELLE 9:	27
TABELLE 10:	27
TABELLE 11:	27
TABELLE 12:	28
TABELLE 13:	29
TABELLE 14:	29
TABELLE 15:	29
TABELLE 16:	30
TABELLE 17:	30
TABELLE 18:	31
TABELLE 19:	33
TABELLE 20:	33
TABELLE 21:	43
TABELLE 22A:	48
TABELLE 23A:	50
TABELLE 24A:	59
TABELLE 25A:	60
TABELLE 26:	88
TABELLE 27:	89
TABELLE 28:	90
TABELLE 29:	92

7.3 Abkürzungsverzeichnis

∞	Unendlich
A	Adenosin
aGvHD	akute Graft versus Host Disease
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Antigen Presenting Cells
ATG	Antithymozyten-Globulin
ATG-F	Antithymozyten-Globulin-Fresenius
BCNU	Carmustin
BEAM	BCNU+Etoposid+Cytarabin+Melphalan
bp	Basenpaare
BSA	Body Surface Area (Körperoberfläche)
Bu	Busulfan
B-Zellen	B-Lymphozyten
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
cGvHD	chronische Graft versus Host Disease
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
Cy	Cyclophosphamid
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
Del	Deletion
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxy-Nukleotidtriphosphat
etc.	et cetera
ETS	E26 transformations-spezifisch
Exo	Exonuklease
FAM	6- Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FLAMSA	Fludarabin, AraC, Amsa
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
fwd.	forward (vorwärts)
G	Guanin
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
ggf.	gegebenenfalls
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL-Effekt	Graft-versus-Leukemia-Effekt
Gy	Gray
h	Hour (Stunde)
H ₂ O	Wasser
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
IBMTR	International Bone Marrow Transplant Registry
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IMDP	National Marrow Donor Program

Ins	Insertion
kbp	Kilobasenpaare
KB	Kilobase
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
KOF	Körperoberfläche
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
MGB	Minor Grove Binder
MgCl	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
min.	Minute
µl	Microliter
ml	Milliliter
µM	Micro Mol
mM	Milli Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRD	Matched related donor (Familienspender)
MS	Microsoft
MUD	Matched unrelated donor (Fremdspender)
N	Number
NA	Not Available
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogramm
NHI	National Institut of Health
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
NMA	Non myoablative conditioning
OR	Odds Ratio
Pat.	Patient
PBSZT	Periphere-Blut-Stammzelltransplantation
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
Q	Quencher
R	Rezeptor
Rα	Rezeptor alpha
Rβ	Rezeptor beta
RCI	Reduced-intensity conditioning
rev.	reverse (rückwärts)
RNA	Ribonukleinsäure
rs-Nummer	reference sequence-Nummer
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SZT	Stammzelltransplantation
T	Thymin
Taq	Taq Polymerase
TBI	Total Body Irradiation (Ganzkörperbestrahlung)

TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TH1	T-Helfer-Zellen Typ 1
TH2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
T-Zellen	T-Lymphozyten
U	Units
VIC	Victoria Green Dye (Fluoreszenzfarbstoff)
VOD	Veno-occlusive Disease
vs	versus
z.B.	zum Beispiel

7.4 GvHD-Fragebogen für die klinische Datenerhebung

Geburtstag:

Datum der Transplantation:

Akute GvHD

Organ	0	1	2	3	4
Haut					
GI-Trakt					
Leber					
weitere					

Grad 1 **Grad 2** **Grad 3** **Grad 4**

Chronische GvHD

Organ	Symptome vorhanden
Haut	
Mund	
Augen	
Genitalien	
GI-Trakt	
Leber	
Lunge	
Muskeln, Faszien, Gelenke	
Nägel	
Kopfhaar und Körperbehaarung	
weitere	

Extensive (ausgedehnt)

Limited (limitiert)

Tod: Ja

Nein

GvHD-bedingt: Ja

Nein

Keine GvHD:

Kommentar:

7.5 Signifikante Ergebnisse in Tabellenform

		Empfänger				Spender			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single- Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl Empfän- ger	Inzidenz chronische GvHD (%)	Odds Ratio	p- Wert	Anzahl Spender	Inzidenz chro- nische GvHD (%)	Odds Ratio	p- Wert
Gesamtkollektiv									
Position -1087	Rezessiv (GG)			2,769	0,002				
G/G		66	43,9			70	37,1		
A/G		170	28,8			160	33,8		
A/A		83	30,1			87	27,6		
MRD									
Position -11777	Dominant (GG/AG)			0,219	0,031				
G/G		1	0,0			0	0,0		
A/G		12	33,3			16	31,2		
A/A		93	44,1			93	44,1		
Position -6208	Rezessiv (GG)			4,714	0,003				
G/G		10	30,0			15	40,0		
C/G		47	48,9			49	46,9		
C/C		31	48,4			26	53,8		
Position -824	Dominant (TT/CT)			3,199	0,007				
T/T		6	16,7			8	25,0		
C/T		35	42,9			36	30,6		
C/C		68	44,1			65	52,3		
MUD									
Position -824	Dominant (TT/CT)							0,401	0,030
T/T		9	11,1			19	10,5		
C/T		76	34,2			73	32,9		
C/C		124	24,2			110	26,4		
T-Depletion									
Position -824	Dominant (TT/CT)			2,488	0,032				
T/T		9	11,1			17	17,6		
C/T		53	30,2			56	23,2		
C/C		87	13,8			69	15,9		
Keine T-Depletion									
Position -1087	Rezessiv (GG)			3,932	0,003				
G/G		34	61,8			37	54,1		
A/G		96	38,5			90	45,6		
A/A		39	41,0			43	34,9		
Haplotyp <i>IL10</i> -3538 A und <i>IL10</i> -2763 A		172	34,9	2,102	0,032	175	36,6	2,011	0,046
Akute Leukämie									
Lymphom									
Position -1087	Additiv (GG>AG> AA)							3,101	0,001
G/G		24	50,0			28	60,7		
A/G		72	29,2			73	34,2		

A/A		39	33,3			35	14,3		
Position R α G351R	Rezessiv (AA)			5,673	0,020				
A/A		12	66,7			13	42,2		
A/G		65	29,2			56	26,8		
G/G		57	33,3			67	37,3		

Tabelle 26: Assoziationen von Zytokin Gen Polymorphismen des IL 10- und IL 10 Rezeptor-Gens in Empfängern und Spendern und der Chronischen GvHD im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom

		Empfänger				Spender			
IL10 und IL 10 Rezeptor Single- Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Anzahl Empfän- ger	Inzidenz akute GvHD (3+4) (%)	Odds Ratio	p- Wert	Anzahl Spender	Inzidenz akute GvHD (3+4) (%)	Odds Ratio	p- Wert
Gesamtkollektiv									
Position R α G351R	Additiv (AA>AG> GG)							1,585	0,024
A/A		30	10,0			38	28,9		
A/G		149	21,5			133	23,3		
G/G		140	21,4			146	16,4		
MRD									
Position R α G351R	Rezessiv (AA)							2,848	0,037
A/A		14	14,3			16	18,8		
A/G		50	16,0			46	30,4		
G/G		44	25,0			47	10,6		
MUD									
Position R α G351R	Dominant (AA/AG)							3,150	0,042
A/A		15	6,7			22	36,4		
A/G		98	24,5			87	19,5		
G/G		96	19,8			96	19,8		
T-Depletion									
Position R α G351R	Rezessiv (AA)							7,559	0,001
A/A		13	7,7			15	46,7		
A/G		67	20,9			62	12,9		
G/G		69	18,8			68	17,6		
Keine T-Depletion									
Position -2763	Dominant (AA/AC)			3,022	0,022				
A/A		13	23,1			17	23,5		
A/C		79	27,8			81	18,5		
C/C		73	15,1			72	26,4		
Akute Leukämie									
Position R β K47E	Dominant (GG/AG)							0,368	0,026
G/G		5	40,0			6	33,3		
A/G		39	15,4			44	18,2		
A/A		72	16,7			64	17,2		
Lymphom									
Position -1087	Additiv (GG>AG> AA)								

G/G		24	25,0			28	14,3		
A/G		72	18,1			73	24,7		
A/A		39	20,5			35	17,1		
Position R α G351R	Rezessiv (AA)								
A/A		12	25,0			13	23,1		
A/G		65	18,5			56	23,2		
G/G		57	21,1			67	17,9		

Tabelle 27: Assoziationen von Zytokin Gen Polymorphismen des IL 10- und IL 10-Rezeptor-Gens in Empfängern und Spendern und der Akuten GvHD im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom

IL10 und IL 10 Rezeptor Single- Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Empfänger (E)				Spender (S)			
		Anzahl Empfän- ger	Verstor- bene Patienten (%)	Ha- zard Ratio	p- Wert	Anzahl Spender	Verstor- bene Patienten (%)	Ha- zard Ratio	p- Wert
Gesamtkollektiv									
Position -824	Rezessiv (TT)			2,544	0,015				
T/T		15	66,7			27	40,7		
C/T		113	45,1			110	45,5		
C/C		192	48,4			177	52,5		
Position R α G351R	Rezessiv (AA)			0,438	0,025				
A/A		30	30,0			38	42,1		
A/G		149	53,0			133	48,9		
G/G		140	45,7			146	50,7		
MRD									
Position -11668	Rezessiv (AA)							0,427	0,016
A/A		12	25,0			16	50,0		
A/G		56	41,1			52	42,3		
G/G		38	44,7			41	36,6		
Position -824	Rezessiv (TT)			6,931	0,001				
T/T		6	50,0			8	37,5		
C/T		35	42,9			36	41,7		
C/C		68	38,2			65	41,5		
Position -597	Additiv (E), Dominant (S)			0,643	0,050			0,595	0,016
A/A		6	50,0			8	37,5		
A/C		35	42,9			36	41,7		
C/C		69	37,7			66	40,9		
Position R α G159S	Dominant (GG/AG)			1,555	0,047				
G/G		2	41,1			5	20,0		
A/G		34	35,3			34	44,1		
A/A		73	41,1			72	41,7		
MUD									
Position -12806	Dominant (TT/CT)			0,474	0,029				
T/T		16	56,2			7	42,9		
C/T		77	44,2			70	57,1		

C/C		112	55,4			126	50,8		
Position R α G351R	Dominant (AA/AG)			0,494	0,033				
A/A		15	40,0			22	50,0		
A/G		98	61,2			87	54,0		
G/G		96	43,8			96	52,1		
Position R β K47E	Rezessiv (GG/AG)							3,062	0,010
G/G		18	50,0			17	47,1		
A/G		66	42,4			80	58,8		
A/A		126	57,1			108	49,1		
T-Depletion									
Position -6208	Dominant (GG/CG)								
G/G		16	56,2			12	58,3		
C/G		38	47,4			40	75,0		
C/C		33	66,7			33	33,3		
Position -597	Dominant (AA/AC)							0,489	0,024
A/A		9	66,7			17	29,4		
A/C		51	31,4			54	37,0		
C/C		89	46,1			71	52,1		
Keine T-Depletion									
Position -11777	Additiv (GG>AG> AA)			1,990	0,021				
G/G		1	100,0			6	33,3		
A/G		18	77,8			23	69,6		
A/A		146	49,3			144	51,4		
Akute Leukämie									
Kombinierte Analyse Pat. 597 / Spender R β K47E G		15	73,3	2,737	0,004				
Lymphom									
Position -3538	Rezessiv (AA)							0,415	0,044
A/A		15	33,3			17	35,3		
A/T		65	49,2			70	50,0		
T/T		55	56,4			50	58,0		
Position -824	Rezessiv (TT)			3,510	0,009				
T/T		8	75,0			8	50,0		
C/T		41	51,2			50	50,0		
C/C		85	48,2			77	53,2		

Tabelle 28: Assoziationen von Zytokin Gen Polymorphismen des IL 10- und IL 10-Rezeptor-Gens in Empfängern und Spendern und dem Gesamtüberleben im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom

IL10 und IL 10 Rezeptor Single- Nucleotide Polymorphism und Genotyp	Modell (additiv, dominant, rezessiv)	Empfänger				Spender			
		Anzahl Empfän- ger	Verstor- ben durch GvHD (%)	Ha- zard Ratio	p- Wert	Anzahl Spender	Verstor- ben durch GvHD (%)	Ha- zard Ratio	p- Wert
Gesamtkollektiv									
Position -12806	Dominant			0,548	0,042				

	(TT/CT)								
T/T		20	10,0			14	14,3		
C/T		125	13,6			115	17,4		
C/C		168	21,4			186	19,4		
Position R α G159S	Dominant (GG/AG)			1,887	0,027				
G/G		11	18,2			9	22,2		
A/G		89	22,5			90	18,9		
A/A		220	15,9			221	17,6		
MRD									
Position R α G159S	Dominant (GG/AG)			2,150	0,022				
G/G		2	50,0			5	20,0		
A/G		34	11,8			34	11,8		
A/A		73	11,0			72	12,5		
Position R α G351R	Rezessiv(AA)							2,830	0,021
A/A		14	14,3			16	12,5		
A/G		50	6,0			46	13,0		
G/G		44	18,2			47	12,8		
MUD									
Position R α G351R	Dominant (AA/AG)			0,346	0,065				
A/A		15	13,3			22	36,4		
A/G		98	25,5			87	18,4		
G/G		96	17,7			96	20,8		
T-Depletion									
Position -7400	Dominant (DelDel/DelIns)							2,520	0,043
Del/Del		12	8,3			8	0,0		
Del/Ins		52	11,5			47	25,5		
Ins/Ins		84	17,9			92	10,9		
Keine T-Depletion									
Position -7400	Dominant (DelDel/DelIns)							0,419	0,019
Del/Del		4	0,0			3	33,3		
Del/Ins		71	22,5			73	16,4		
Ins/Ins		89	20,2			94	25,5		
Akute Leukämie									
Position -11668	Dominant (AA/AG)			0,326	0,047				
A/A		15	0,0			15	6,7		
A/G		59	10,2			58	15,5		
G/G		40	20,0			40	10,0		
Position R α G159S	Dominant (GG/AG)							3,160	0,043
G/G		4	0,0			4	0,0		
A/G		30	13,3			41	22,0		
A/A		81	12,3			70	7,1		
Lymphom									
Position -11777	Additiv (GG>AG>AA)			6,681	0,001				
G/G		1	0,0			5	20,0		
A/G		20	25,0			17	17,6		
A/A		111	14,4			116	17,2		
Position +5876	Dominant			4,162	0,007				

	(TT/CT)								
T/T		3	0,0			3	33,3		
C/T		25	32,0			40	15,0		
C/C		104	12,5			93	17,2		
Position R β K47E	Dominant (GG/AG)			0,248	0,010				
G/G		15	6,7			17	5,9		
A/G		46	8,7			52	17,3		
A/A		74	23,0			68	20,6		

Tabelle 29: Assoziationen von Zytokin Gen Polymorphismen des IL 10- und IL 10-Rezeptor-Gens in Empfängern und Spendern und der GvHD-assoziierten-Mortalität im Gesamtkollektiv, in den Untergruppen MRD, MUD, T-Zell-Depletion, Akute Leukämie und Lymphom

8 Literaturverzeichnis

- Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino P E, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Barbanti M, Sacchi N et al. (2001) Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 98(10), 2942–2947.
- Begue B, Verdier J, Rieux-Laucat F, Goulet O, Morali A, Canioni D, Hugot J-P, Daussy C, Verkarre V, Pigneur B et al. (2011) Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 106(8), 1544–1555.
- Billingham R E (1966) The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 62, 21–78.
- Blay J Y, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, Banchereau J, Favrot M C (1993) Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood* 82(7), 2169–2174.
- Bornhauser M und Kienast J (2008) Stammzelltransplantation; in: Akute myeloische Leukämie, Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose Reihe "Onkologie", hrsg. v. Ehninger G, Link H, Berdel W E unter Mitarbeit namhafter Autoren; Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2008, 121-130
- Buchholz S und Ganser A (2009): Hämatopoetische Stammzelltransplantation. *Internist (Berl)* 50, 572-580
- Cavet J, Middleton P, Segall M, Noreen H, Davies S M, Dickinson A M (1999) Recipient Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-10 Gene Polymorphisms Associate With Early Mortality and Acute Graft-Versus-Host Disease Severity in HLA- Matched Sibling Bone Marrow Transplants, *Blood* 94(11), 3941-3946
- Cooke KR, Kobzik L, Martin T R, Brewer J, Delmonte J Jr, Crawford J M, Ferrara J L (1996) An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin, *Blood* 88, 3230-3239
- Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P (1999) Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42(6), 1101–1108.
- Edinger M, Powrie F, Chakraverty R (2009) Regulatory mechanisms in graft-versus-host responses. *Biol Blood Marrow Transplant* 15(1 Suppl), 2–6.
- Ferrara J L M, Levine J E, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373(9674), 1550–1561.
- Fickenscher H, Hör H, Küpers S, Knappe H, Wittmann A, Sticht S (2002) The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 23(2), 89-96
- Filipovich A H, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard J R, Lee S J, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D et al. (2005) National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease:

- I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 11(12), 945–956.
- Finke J, Bethge W A, Schmoor C, Ottinger H D, Stelljes M, Zander A R, Volin L, Ruutu T, Heim D A, Schwerdtfeger R et al. (2009) Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet* 10(9), 855–864.
- Flomenberg N, Baxter-Lowe L A, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A H, Horowitz M, Hurley M, Kollman C, Anasetti C, Noreen H et al. (2004) 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.
- Flowers M E, Pepe M S, Longton G, Doney K C, Monroe D, Witherspoon R P, Sullivan K M, Storb R (1990) Previous donor pregnancy as a risk factor for acute graft-versus-host disease in patients with aplastic anaemia treated by allogeneic marrow transplantation. *Br J Haematol* 74(4), 492–496.
- Frodsham A J, Zhang L, Dumpis U, Taib N A M, Best S, Durham A, Hennig B J W, Hellier S, Knapp S, Wright M et al. (2006) Class II cytokine receptor gene cluster is a major locus for hepatitis B persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(24), 9148–9153.
- Gale R P, Bortin M M, van Bekkum D W, Biggs J C, Dicke K A, Gluckman E, Good R A, Hoffmann R G, Kay H E, Kersey J H (1987) Risk factors for acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 67(4), 397–406.
- Gibson A W, Edberg J C, Wu J, Westendorp R G, Huizinga T W, Kimberly R P (2001) Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol (Baltimore, Md. : 1950)* 166(6), 3915–3922.
- Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondón G, Anderlini P, O'Brien S, Khouri I, Gajewski J, Mehra R et al. (1997) Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 89(12), 4531–4536.
- Glocker E-O, Kotlarz D, Boztug K, Gertz E M, Schäffer A A, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D et al. (2009) Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361(21), 2033–2045.
- Hahn T, McCarthy P L, Zhang M J, Wang D, Arora M, Frangoul H, Gale R P, Hale G A, Horan J, Isola L et al. (2008) Risk Factors for Acute Graft-Versus-Host Disease After Human Leukocyte Antigen-Identical Sibling Transplants for Adults With Leukemia. *J Clin Oncol* 26(35), 5728–5734.
- Hansen J A, Petersdorf E W, Lin M-T, Wang S, Chien J W, Storer B, Martin P J (2007) Genetics of allogeneic hematopoietic cell transplantation. Role of HLA matching, functional variation in immune response genes. *Immunol Res* 41(1), 56–78.
- Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier B M, Maris M B, Shizuru J A, Greinix H, Cordonnier C, Rio B, Gratwohl A, Lange T et al. (2006) Treatment for acute

- myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol* 24(3), 444–453.
- Heldal D, Brinch L, Tjønnfjord G, Solheim B G, Egeland T, Gadeholt G, Albrechtsen D, Aamodt G, Evensen S A (2002) Donation of stem cells from blood or bone marrow: results of a randomised study of safety and complaints. *Bone Marrow Transplant* 29(6), 479–486.
- Ho V T und Soiffer R J (2001) The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98, 3192-3204.
- Holler E, Roncarolo M G, Hintermeier-Knabe R, Eissner G, Ertl B, Schulz U, Knabe H, Kolb H J, Andreesen R, Wilmanns W (2000) Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25(3), 237–241.
- Jacobsohn D A und Vogelsang G B (2007) Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* 2(1), 35.
- Jacobsohn D A, Hewlett B, Ranalli M, Seshadri R, Duerst R, Kletzel M (2004) Outcomes of unrelated cord blood transplants and allogeneic-related hematopoietic stem cell transplants in children with high-risk acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 34(10), 901–907.
- Keen L J, DeFor T E, Bidwell J L, Davies S M, Bradley B A, Hows J M (2004) Interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha region haplotypes predict transplant-related mortality after unrelated donor stem cell transplantation. *Blood* 103(9), 3599–3602.
- Lech-Maranda E, Bienvenu J, Michallet A-S, Houot R, Robak T, Coiffier B, Salles G (2006) Elevated IL-10 plasma levels correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur Cytokine Netw* 17(1), 60–66.
- Lin M-T, Storer B, Martin P J, Tseng L-H, Grogan B, Chen P-J, Lue P Z, Hansen J A (2005) Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation: synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor genotype of donor. *Blood* 106(12), 3995–4001.
- Lin M-T, Storer B, Martin, P J, Tseng L-H, Gooley T, Chen P-J, Hansen J A (2003) Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 349(23), 2201–2210.
- Luger SM, Ringden O, Zhang M J, Perez W S, Bishop M R, Bornhauser M, Bredeson C N, Cairo M S, Copelan E A, Gale R P et al. (2008) Similar outcomes using myeloablative versus reduced intensity and non-myeloablative allogeneic transplant preparative regimens for AML or MDS, *Bone Marrow Transplant* 47(2), 203-211
- Martin P J (2008) Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach. *Keio J Med* 57(4), 177–183.
- Middleton P G, Taylor P R, Jackson G, Proctor S J, Dickinson A M (1998) Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical

- sibling transplants. *Blood* 92(10), 3943–3948.
- Miura Y, Thoburn C J, Bright E C, Chen W, Nakao S, Hess A D (2002) Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood* 100(7), 2650–2658.
- Moore K W, de Waal Malefyt R, Coffman R L, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol* 19(1), 683–765.
- Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H et al. (2002) The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood* 99(11), 4200–4206.
- Mörmann M, Rieth H, Hua T D, Assouhou C, Roupelieva M, Hu S L, Kreamsner P G, Kube D (2004) Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun* 5, 246–255
- Mosser D M und Zhang X (2008) Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226(1), 205–218.
- Petersdorf E W (2004) HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 11(6), 386–391.
- Renauld J-C (2003) Class II cytokine receptors and their ligands: Key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 3(8), 667–676.
- Rieth H, Mörmann M, Luty A J F, Assouhou-Luty C A, Roupelieva M, Kreamsner P G, Kube D (2004) A three base pair gene variation within the distal 5'-flanking region of the interleukin-10 (IL-10) gene is related to the in vitro IL-10 production capacity of lipopolysaccharide-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Eur Cytokine Netw* 15(2), 153–158.
- Schmid C und Kolb H-J (2007) Die allogene Stammzelltransplantation im Therapiekonzept der akuten myeloischen Leukämie. *Med Klein (Munich)* 102(4), 317–323
- Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb H-J (2005) Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 23(24), 5675–5687.
- Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S et al. (1998) Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 91(3), 756–763.
- Socié G, Clift R A, Blaise D, Devergie A, Ringden O, Martin P J, Remberger M, Deeg H J, Ruutu T, Michallet M et al. (2001) Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood* 98(13), 3569–3574.

- Stanilova S A, Miteva L D, Karakolev Z T, Stefanov C S (2006) Interleukin-10-1082 promoter polymorphism in association with cytokine production and sepsis susceptibility. *Intensive Care Med* 32(2), 260–266.
- Stasi R, Zinzani L, Galieni P, Lauta V M, Damasio E, Dispensa E, Dammacco F, Tura S, Papa (1994) Detection of soluble interleukin-2 receptor and interleukin-10 in the serum of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Identification of a subset at high risk of treatment failure. *Cancer* 74(6), 1792-1800
- Stelljes M, Bornhauser M, Kroger M, Beyer J, Sauerland M C, Heinecke A, Berning B, Scheffold C, Silling G, Buchner T et al. (2005) Conditioning with 8-Gy total body irradiation and fludarabine for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Blood* 106(9), 3314–3321.
- Tiercy J M (2008) The role of HLA in HSCT in: ESH-EBMT Handbook on Haematopoietic stem cell transplantation 5th edition (revised) hrsg. von Apperley J, Carreras E unter Mitarbeit namenhafter Autoren; European School of Haematology, Paris 2008, 46-65.
- Tseng L-H, Storer B, Petersdorf E, Lin M-T, Chien J W, Grogan B M, Malkki M, Chen P-J, Zhao L P, Martin P J, Hansen J A (2009) IL10 and IL10 Receptor Gene Variation and Outcomes After Unrelated and Related Hematopoietic Cell Transplantation. *Transplantation* 87(5), 704–710.
- Turner D M, Williams D M, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott P J, Hutchinson I V (1997) An investigation of polymorphism in the interleukin- 10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 24(1), 1-8.
- Voogt P J, Fibbe W E, Marijt W A, Goulmy E, Veenhof W F, Hamilton M, Brand A, Zwann F E, Willemze R, van Rood J J (1990) Rejection of bone-marrow graft by recipient-derived cytotoxic T lymphocytes against minor histocompatibility antigens. *Lancet* 335(8682), 131–134.
- Wagner J E, Thompson J S, Carter S L, Kernan N A (2005) Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet* 366, 733-741
- Welniak L A, Blazar B R, Murphy W J (2007) Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 25, 139–170.
- Zhou L, Askew D, Wu C, Gilliam A C (2007) Cutaneous gene expression by DNA microarray in murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma. *J Invest Dermatol* 127(2), 281–292.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben, sehr herzlich bedanken.

Mein großer Dank an Prof. Gerald Wulf und Dieter Kube für die vielen hilfreichen Diskussionen vor allem über die Ergebnisse und die freundliche und geduldige Unterstützung in der Erstellung dieser Arbeit.

Vielen Dank an Prof. Trümper für die Möglichkeit der Durchführung einer Doktorarbeit in seiner Abteilung.

Ein großer Dank auch an Frederike von Bonin, für die vielen Stunden Arbeit im Labor und die hilfreiche Beratung bei der Erstellung des Methoden-Teils. Ebenfalls Danke an Angela Lenz für ihre Arbeit im Labor.

Vielen herzlichen Dank an Yesilda Balavarca aus dem Institut für Genetische Epidemiologie für die fabelhafte Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern der hämatologisch-onkologischen Ambulanz, die mich in der Sammlung meiner klinischen Daten tatkräftig und immer freundlich unterstützt haben.

Lebenslauf

Ich wurde am 24. Januar 1986 als erstes Kind der Eheleute Klaus Stephan Michael und Antje Genrich-Michael, geborene Genrich, in Bremen geboren.

Nach vier Jahren Grundschule an der Admiralstraße, Bremen, wechselte ich 1996 an die Orientierungsstufe des Schulzentrums Findorff, wo ich anschließend auch das Gymnasium bis zur 10. Klasse besuchte. Die 11. Klasse verbrachte ich als Austauschschülerin in Kalifornien, USA. Im Anschluss daran erfolgte die Schulausbildung an der gymnasialen Oberstufe Lange Reihe, Bremen, wo ich 2005 das Abitur erfolgreich ablegte.

Im Wintersemester 2005/2006 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Den Vorklinischen Abschnitt beendete ich 2007 mit dem Physikum. Im Sommersemester 2007 arbeitete ich als studentische Aushilfskraft in der Anatomie im Präparierkurs. Von 2007 bis 2011 folgte der klinische Studienabschnitt. Während dieser Zeit arbeitete ich über 2 Semester als Tutorin für Biochemie und von 2008 bis 2010 als studentische Aushilfskraft im evangelischen Krankenhaus Weende, Göttingen. Im Januar 2008 begann ich meine Dissertation in der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen, betreut durch Herrn Prof. Dr. med. Wulf.

Das praktische Jahr absolvierte ich von August 2010 bis Juli 2011 in den Abteilungen Chirurgie (St. Joseph Stift, Bremen), Innere Medizin (Klinikum Bremen Mitte, Bremen) und Pädiatrie (Klinikum Links der Weser, Bremen).

Das Medizinstudium schloss ich 2011 mit dem Staatsexamen an der Georg-August-Universität Göttingen erfolgreich ab.

Im Anschluss an das Medizinstudium habe ich 4 Monate ausschließlich an meiner Doktorarbeit gearbeitet.

Seit Juni 2012 arbeite ich als Assistenzärztin für Pädiatrie am Krankenhaus Cuxhaven.

Am 27. August 2012 habe ich standesamtlich und am 01. September 2012 kirchlich Herrn Falko Wermuth geheiratet.