

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

KLINIK UND POLIKLINIK

FÜR STRAHLENTHERAPIE UND RADIOLOGISCHE ONKOLOGIE

KLINIKUM RECHTS DER ISAR

Hsp70 Protein und Antikörper-Level bei Patienten mit Graft-versus-Host-Disease

Katharina Petra Roth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 26.09.2013 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.02.2014
angenommen.

In Liebe für meinen Mann

„An der Schwelle jeder wissenschaftlichen Betrachtung der Welt steht die Verwunderung.“

- Wilhelm Röpke

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Maligne hämatologische Erkrankungen.....	9
1.1.1 Leukämien	12
1.1.2 Maligne Lymphome	13
1.1.3 Myeloproliferative Erkrankungen	13
1.1.4 Therapie.....	14
1.2 Graft versus Host Disease	20
1.2.1 Einteilung	21
1.2.2 Inzidenz und Bedeutung	21
1.2.3 Pathophysiologie	22
1.2.4 Prophylaxe	24
1.2.5 Therapie.....	25
1.3 Hitzeschockproteine.....	27
1.3.1 Hitzeschockprotein 70	28
1.3.2 Rolle des Hsp70 in der Immunologie und Onkologie.....	29
1.4 Intention und Zielsetzung	32
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Material	33
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kit.....	33
2.1.2 Puffer	34
2.1.3 Antikörper und Protein	34
2.1.4 Plastikmaterial.....	35
2.1.5 Geräte	35
2.1.6 Blutserum.....	35
2.1.7 Sonstiges Material und sonstige Geräte	36
2.2 Methoden.....	37
2.2.1 Blutabnahme.....	37
2.2.2 Serumgewinnung.....	37
2.2.3 ELISA.....	39
2.2.4 Standard Laborparameter.....	48
2.2.5 Bildbearbeitung	48
2.2.6 Statistik	48
3 Ergebnisse.....	49
3.1 Patientenmaterial.....	49

3.2	Auswertung der Daten	52
3.2.1	Patientenkollektiv	52
3.2.2	Messungen: Hsp70-Protein und Antikörper	55
3.2.3	Hsp70-Protein und GvHD	67
3.2.4	Gesamtüberleben der Patienten	72
4	Diskussion	74
4.1	Hsp70 ein Marker für GvHD	74
4.2	Zusammenfassung und Ausblick	83
5	Anhang	86
5.1	Abbildungsverzeichnis	86
5.2	Tabellenverzeichnis	88
5.3	Danksagung	89
5.4	Literaturverzeichnis	90

Zusammenfassung

Die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation (SCT) stellt sich bei schweren hämatopoetischen Erkrankungen bei denen mit konventioneller Radio- oder Chemotherapie keine guten Heilungschancen bestehen. Eine Haupt-Limitation der erfolgreichen SCT stellt das Auftreten der Graft-versus-Host-Reaktion dar, die für eine transplantationsassoziierte Mortalität von 25% mitverantwortlich gemacht wird. Um lebensbedrohliche Komplikationen der GvHD zu vermeiden wäre es wünschenswert einen leicht zugänglichen Biomarker zu identifizieren, der den Ausbruch einer akuten GvHD frühzeitig anzeigt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es lösliches Hsp70 im Serum von Patienten als potentiellen Marker für das Auftreten einer GvHD heranzuziehen. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Leukämie und erhöhten Hsp70 Gehalten konnte bereits in Vorarbeiten hergestellt werden. Meine Arbeit verfolgte das Ziel, die Rolle von Hsp70 im Serum von Leukämiepatienten vor, während und nach allogener SCT zu bestimmen, mit der Zielsetzung die Hsp70 Serumprotein-Gehalte mit dem Risiko des Auftretens einer GvHD zu korrelieren.

Insgesamt wurden Serumproben und die zugehörigen klinischen Daten von 52 Patienten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine signifikante (P-Wert: 0.016) Steigerung der vorhersagbaren Wahrscheinlichkeit an einer GvHD zu erkranken mit steigenden Messwerten des Hsp70 Proteins im Serum einhergeht. Daraus ist zu schließen, dass Hsp70 als Biomarker für die Diagnostik und Vorhersagbarkeit der GvHD in Zukunft gut geeignet sein könnte.

The indication for allogenic stem cell transplantation (SCT) arises with severe hematopoetic diseases for which there is a poor chance of recovery with conventional radio- or chemotherapy. A major limitation of successful SCT represents the occurrence of graft-versus-host reaction, which is partly responsible for a transplant associated mortality of 25%. To avoid life-threatening complications of GvHD it would be desirable to identify an easily accessible biomarker which is early indicative of the onset of acute GvHD. The objective of this work was to use soluble Hsp70 in the serum of patients as

potential marker for the occurrence of GvHD. A correlation between the occurrence of leukemia and increased Hsp70 levels could have already been made in previous literature. My work followed the goal to show the role of Hsp70 in determining the serum of leukemia patients before, during and after allogeneic SCT, with the objective to correlate the serum Hsp70 protein levels with the risk of occurrence of GvHD.

Total serum samples and associated clinical data from 52 patients were examined. The results show that a significant (P-value: 0.016) increase of the predictable probability of developing GvHD is associated with increasing levels of the Hsp70 protein measured in serum. This suggests Hsp70 to be well suited as a biomarker for the diagnosis and predictability of GvHD in the future.

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis inducing Factor, Apoptoseinduzierender Faktor
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-presenting cells, Antigenpräsentierende Zellen
CD	Cluster of Differentiation
CHIP	Carboxyl-terminus of Hsp70 interacting protein
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNI	Calcineurin Inhibitoren
CR	Complete remission, komplette Remission
C-Terminus	Carboxy Terminus
ECP	Extracorporale Photopherese
ELISA	Enzym-linked-Immuno-Assay
ET	Essentielle Thrombozytämie
ET-18-OHC3	Edelfosine, synthetisches Alkyllysophospholipid
FAB	Fragment Antigen Binding
GvHD	Graft-versus-Host-Disease, Graft-versus-Host-Erkrankung
GvL	Graft-versus-Leukämie-Effekt
HIP	Hsp70-interacting-Protein
HLA	Humanes-Leukozyten- Antigen
HOP	Hsp70-organizing Protein
HRP	Horseradish-Peroxidase
HSF	Hitze-Schock-Faktor, Heat-Shock Factor
HSP	Hitze-Schock-Protein, Heat-Shock-protein
ID	Identifikation
Ig	Imunglobulin

IL	Interleukin
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MM	Multiples Myelom
MMF	Myclophenolatmofetil
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MTX	Methotrexat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Rezeptoren, Nucleotide-binding oligomerization domain receptors
OMF	Osteomyelofibrose
PBS	Phosphate buffered saline
PV	Polyzythämia vera
RT	Raumtemperatur
SCT/SZT	Stem-cell transplantation, Stammzelltransplantation
TGF	Transforming Growth Factor, Transformierender Wachstumsfaktor
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
UV-A1	Ultraviolettstrahlung A (definierter Wellenlängenbereich)

1 Einleitung

1.1 Maligne hämatologische Erkrankungen

Leukämie wurde in der Geschichte erstmals 1847 von Rudolf Virchow erwähnt und als „weißes Blut“ beschrieben. Es handelt sich um eine Erkrankung des Blutbildenden Systems. Insgesamt sind maligne hämatologische Erkrankungen mit nur 7% der malignen Erkrankungen als selten einzustufen. Bei dieser Art von Erkrankung kommt es zu einer autonomen Proliferation von weißen Blutkörperchen (Leukozyten), die sich meist in Form von funktionsuntüchtigen Leukozytenvorstufen stark vermehren. Die Expansion dieser malignen Zellklone führt zur generalisierten Ausbreitung der Zellen im blutbildenden Knochenmark, wodurch die dort übliche Blutbildung verdrängt wird. Bedingt durch Ausschwemmung können leukämische Zellen auch vermehrt im peripheren Blut auftreten und extramedulläre Organe, wie beispielsweise Leber, Milz und Lymphknoten infiltrieren und diese damit in ihrer Funktion einschränken.

Die Einteilung der Leukämien in Krankheitsgruppen erfolgt durch die Unterscheidung nach Zelltyp („Muttergewebe“): Myeloische Leukämie oder Lymphatische Leukämie und die Unterscheidung nach Verlauf: akut oder chronisch. Daraus ergeben sich AML = Akute myeloische Leukämie, ALL = Akute lymphatische Leukämie, CML = Chronische myeloische Leukämie und CLL = Chronisch lymphatische Leukämie (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

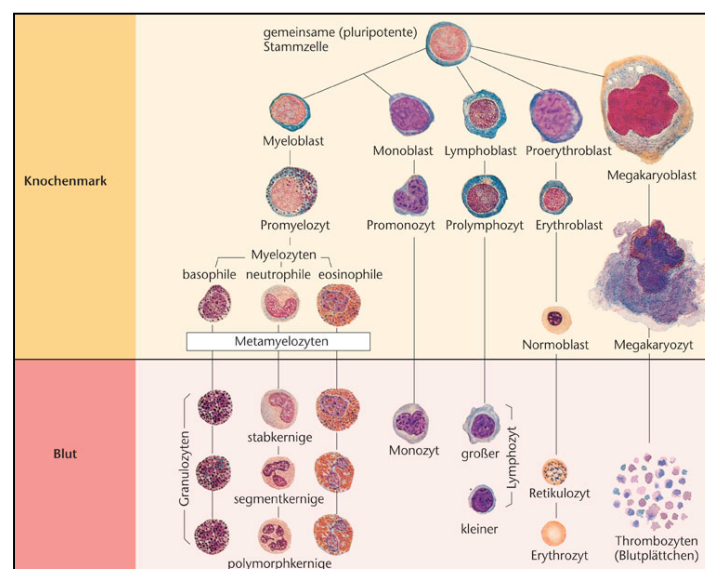


Abbildung 1: Hämatopoetische Zellreihen (Renz-Polster, 2008)

Die Proliferation und Differenzierung der Blut- und Knochenmarkzellen wird als Hämatopoese bezeichnet. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Differenzierungsstufen der jeweiligen Zellreihen dargestellt. Diese sind in einen gelben Bereich (Knochenmark) und einen roten Bereich (Blut) unterteilt. Die Hämatopoese umfasst folgende Vorgänge: Die Myelopoese ist die Bildung der Vorläuferzellen beziehungsweise „markgebundenen“ Zellreihen (Granulozyten, Thrombozyten und Monozyten). Im Rahmen der Lymphopoese werden von der knochenmarkgebundenen Zelle abstammende Zellen gebildet, die früh auswandern und sich in Thymus, Milz und Lymphknoten zu verschiedenen Immunzellen differenzieren (z.B. B- und T-Lymphozyten). Die Erythropoese bezeichnet die Bildung der Erythrozyten (rote Blutkörperchen), die beim Erwachsenen physiologischer Weise ausschließlich im Knochenmark stattfindet (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

Durch maligne Neoplasien der hämatopoetischen Zellen entsteht eine Knochenmarkinsuffizienz, aus der schwerwiegende Symptome resultieren können. Hierzu zählen unter anderem Anämien, Granulozytopenien, Thrombozytopenien, welche durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese zu erklären sind. Daraus folgen unter anderem allgemeine Schwächesymptome, Infekte und erhöhte Blutungsneigung. Durch die Verdrängung der Lymphopoese kommt es zur Schädigung des B- und T-Zell-Systems, worauf ebenfalls eine erhöhte Infektanfälligkeit folgt. Die Infiltration von extramedullären Organen verursacht ebenso schwerwiegende Symptome (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

Im Allgemeinen gestaltet sich die Einteilung der malignen hämatologischen Erkrankungen sehr vielfältig, da die Einteilungsprinzipien historisch bedingt in ihrer Anzahl gewachsen sind und daher teilweise überlappen (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

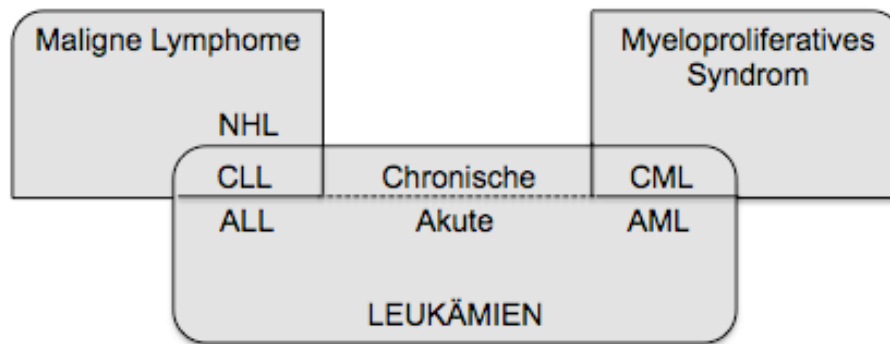


Abbildung 2: Zusammenhänge zwischen Leukämien, malignen Lymphomen und myeloproliferativem Syndrom (nachempfunden aus Herold 2009, S.82)

Die Grafik in Abbildung 2 gibt einen groben Überblick und stellt eine vereinfachte Form der Einteilung dar. Grundsätzlich wird zwischen den im Folgenden aufgeführten Erkrankungen unterschieden. Leukämien beschreiben maligne klonale Neoplasien der hämatopoetischen Zellen. Im Rahmen von malignen Lymphomen kommt es zur autonomen Proliferation lymphatischer Zellen. Diese werden weiter aufgeteilt in Hodgkin (in der Abbildung nicht dargestellt) und Non-Hodgkin Lymphome (=NHL). Hodgkin Lymphome weisen spezifische Zellen (Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen) auf, wohingegen diese bei Non-Hodgkin Lymphomen nicht vorhanden sind. Bei myeloproliferativen Erkrankungen kommt es zur Entartung myeloischer Zellreihen, entweder einzeln, oder in Kombination. Hauptvertreter sind die chronische myeloische Leukämie (=CML), Polycythämia vera (PV), Osteomyelofibrose (OMF) und die essentielle Thrombozythämie (ET) (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

Aus einer sehr heterogenen Gruppe von chronisch verlaufenden Differenzierungsstörungen der Stammzelle ergeben sich die myelodysplastischen Syndrome. Im Rahmen derer kommt es zu einer klonalen Expansion von Vorläuferzellen aller blutbildenden Zellreihen. Die verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen können teilweise ineinander übergehen und ihre Verlaufsformen können sich sehr ähnlich sein (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

1.1.1 Leukämien

Akute Leukämien treten in allen Altersgruppen auf. Insgesamt gesehen sind akute Leukämien selten: Inzidenz der AML 2,5/100.000 pro Jahr, Inzidenz der ALL 1,5/100.000 pro Jahr. Die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters ist die ALL, wohingegen die AML in etwa doppelt so häufig vorkommt und vor allem im Erwachsenenalter auftritt. Diese Häufigkeiten und die Altersverteilung der Leukämien spiegelt auch Abbildung 3 wieder. Die ALL (gelb dargestellt) weist einen Peak bei Patienten jüngerem Alters auf. Die Häufigkeit der AML (rot dargestellt) steigt bei einem Alter der Patienten ab 40 Jahren an. Im Allgemeinen ist zu sagen, dass 80% der akuten Leukämien im Kindesalter ALL sind, wohingegen akute Leukämien im Erwachsenenalter zu 80% AML sind (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

Die chronischen Leukämien CLL und CML werden im Folgenden näher beschrieben.

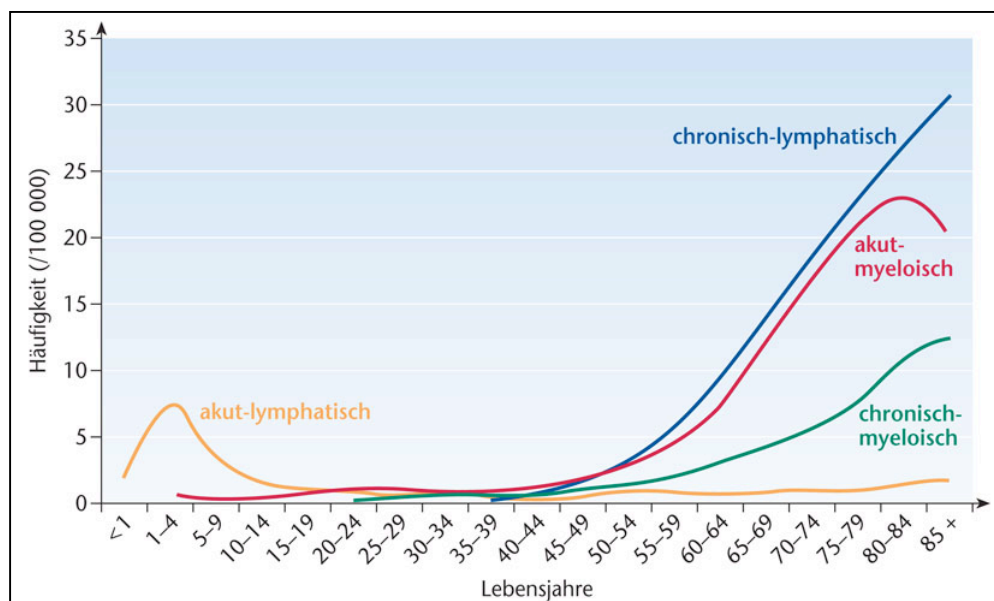


Abbildung 3: Altersverteilung und Häufigkeit der Leukämien (Renz-Polster, 2008)

1.1.2 Maligne Lymphome

1.1.2.1 Morbus Hodgkin

Morbus Hodgkin oder das Hodgkin-Lymphom ist ein monoklonales B-Zell-Lymphom und weist krankheitsspezifische Hodgkin- beziehungsweise Reed-Sternberg-Zellen auf. Je nach vorherrschendem Zelltyp unterscheidet man verschiedene Unterformen (Herold, 2009).

1.1.2.2 Non-Hodgkin Lymphome (NHL)

Non-Hodgkin-Lymphome werden in B- und T-Zell-NHL unterteilt, je nachdem aus welcher Zellreihe sie ihren Ursprung haben. Des Weiteren erfolgt eine klinische Einteilung in indolente (niedrig maligne) und aggressive (hoch maligne) NHL (Herold, 2009).

1.1.2.3 CLL - Chronisch-lymphatische Leukämie

Die CLL zählt per definitionem zu den indolenten B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen, da es zu einer klonalen Proliferation von immuninkompetenten B-Lymphozyten kommt. Diese Krankheitsform kommt zumeist bei älteren Menschen vor und stellt mit einer durchschnittlichen Inzidenz von 3/100.000 pro Jahr die insgesamt häufigste Leukämieform dar (siehe Abbildung 3, blau dargestellt) (Herold, 2009).

1.1.2.4 Multiples Myelom (MM) - Plasmozytom

Das Multiple Myelom ist ein aggressives B-Zell-NHL mit diffuser oder multilokulärer Infiltration des Knochenmarks. Plasmozytomzellen bilden monoklonale Immunglobuline und stimulieren Osteoklasten. Insgesamt gesehen handelt es sich um den häufigsten Tumor von Knochenmark und Knochen mit einer Inzidenz von 4/100.000 pro Jahr (Herold, 2009).

1.1.3 Myeloproliferative Erkrankungen

Diese Krankheitsgruppe umfasst: CML, PV, OMF und ET. Zu Beginn der Erkrankung ist eine klare Zuordnung der myeloproliferativen Erkrankungen meist schwierig. Es besteht auch die Möglichkeit von Übergängen zwischen den verschiedenen Erkrankungen.

1.1.3.1 CML - Chronische myeloische Leukämie

Die Inzidenz der CML liegt bei 1/100.000 pro Jahr mit einem Altersgipfel im mittleren Lebensalter (siehe auch Abbildung 3, grün dargestellt). In über 90% der CML Erkrankungen findet sich eine Translokation t (9,22) beziehungsweise das bcr-abl Fusionsgen. Diese Form der Leukämie wird als klassische CML mit Philadelphia-Chromosom bezeichnet. In Diagnostik und Therapie spielt der Nachweis eines Philadelphia-Chromosoms eine entscheidende Rolle (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

1.1.4 Therapie

Die Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen erfolgt meist an Zentren, oftmals im Rahmen von Studien und nach individuellen Therapieprotokollen. Der Subtyp der Erkrankung und die vorhandenen Risikofaktoren sind wichtige Entscheidungsgrundlagen für die geplante Therapie, welche auch als risikogruppenadaptierte Therapie bezeichnet wird. Die drei Hauptsäulen der Therapie bilden die symptomatische Therapie, die zytostatische Therapie, sowie die Knochenmark- beziehungsweise Stammzelltransplantation (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

1.1.4.1 Symptomatische Therapie

Die symptomatische Therapie ist eine unterstützende Behandlung („supportive care“), welche vor allem die durch Knochenmarksverdrängung und durch erhöhten Zellumsatz hervorgerufenen Folgen behandelt. Einerseits spielt die Infektbehandlung und -prophylaxe eine wichtige Rolle, welche in Form von antibiotischer und antimykotischer Medikation, sowie sorgfältiger Hygiene z.B. keimarmen Räumen umgesetzt wird. Andererseits kommt der Prophylaxe des Tumorlysesyndroms beziehungsweise einer Uratnephropathie eine große Bedeutung zu. Schwerpunkte liegen hier in der ausreichenden Gabe von Flüssigkeit und der Gabe von Allopurinol. Auch die Substitution von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten bei Bedarf, beispielsweise Anämie, zählt zum Prinzip der symptomatischen Therapie (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

1.1.4.2 Zytostatische Therapie

Das Ziel der zytostatischen Therapie ist die Vernichtung oder Reduktion der Anzahl entarteter Zellen. Je nach verfolgtem Ziel handelt es sich um einen kurativen Ansatz (Ziel ist die Heilung) oder um einen palliativen Therapieansatz (Ziel ist eine verbesserte Lebensqualität). Spezialisierte Zentren führen solche Therapien nach Studienprotokollen durch und passen sie individuell an den Patienten und seine Krankheitssituation an. Ziel der Therapie ist die komplette Remission (= CR). Das bedeutet eine Normalisierung von Blutbild und Knochenmark, v.a. die blastären Zellen betreffend, deren Anteil dann $<5\%$ ist. Eventuell vorhandene extramedulläre Manifestationen sollten im Rahmen einer CR verschwunden sein. Um dies zu erreichen wird die zytostatische Therapie in mehrere Abschnitte unterteilt (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

Remissionsinduktionstherapie: Ziel dieses Therapieabschnitts ist die komplette Remission. Die Anzahl bösartiger Zellen muss hierbei um mindestens drei Zehnerpotenzen verringert werden. Dies wird durch die Gabe von Zytostatika nach festem Schema erreicht. Das führt zu einer Aplasie im Knochenmark mit Agranulozytose und meistens damit einhergehender Thrombozytopenie.

Konsolidierungstherapie: Die durch Induktionstherapie erreichte Remission soll nun stabilisiert werden. Die Anzahl an residualen Blasten soll durch die Konsolidierungstherapie weiter reduziert werden. Je nach zu Grunde liegender Erkrankung wird eine Polychemotherapie angewendet oder eine Blutstammzelltransplantation eingeleitet.

Erhaltungstherapie: Zur weiteren Erhaltung der Remission muss die Chemotherapie oft über längere Zeiträume appliziert werden. Auch hier sollen verbliebene Blasten in ihrer Proliferation gehemmt werden.

Rezidivtherapie: Im Falle eines Rezidivs wird eine Re-Induktionstherapie eingeleitet (erneute Induktion). Die komplette Remission kann dann aber nur schwer erreicht werden (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

1.1.4.3 Stammzelltransplantation

Eine Stammzelltransplantation (SCT) erhalten Patienten im Zuge der Konsolidierungstherapie. Transplantiert werden können entweder durch Punktion gewonnenes Knochenmark oder periphere hämatopoetische Stammzellen, die

durch Leukapherese gewonnen werden können. Nabelschnurblut wird nur in seltenen Fällen transplantiert. In Abbildung 4 ist einer von vielen möglichen Abläufen einer SCT exemplarisch dargestellt. Solche Abläufe sind sehr individuell und variieren je nach Patient und angewendetem Therapieschema.

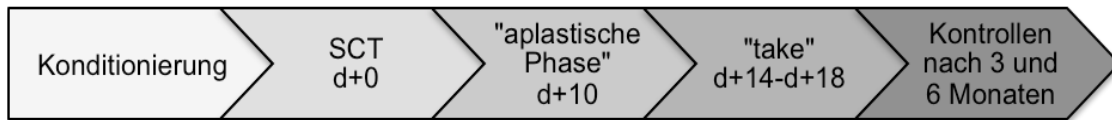


Abbildung 4: Möglicher Ablauf einer Stammzelltransplantation (SCT); Zeitangabe d = Tage

Zuerst werden nahezu alle blutbildenden Zellen des Patienten ausgelöscht und das Immunsystem unterdrückt. Dies nennt sich myeloablative Therapie, wobei die Myeloablation durch intensive Chemotherapie und Bestrahlung erreicht wird. Diese Vorbereitung auf die eigentliche Übertragung der Stammzellen nennt man auch Konditionierung. Mittlerweile werden auch in ihrer Dosis reduzierte Konditionierungen durchgeführt, die weniger myeloablativ sind, da festgestellt wurde, dass auch der „Graft-versus-Leukämie“ - Effekt (GvL) eine Rolle im Heilungsprozess spielt und das „Anwachsen“ der Zellen beeinflusst. Beim GvL handelt es sich um eine Immunreaktion der Spenderzellen („Graft“) gegen die Leukämiezellen (Andreesen, 2005).

Nach der Konditionierung können gesunde hämatopoetische Stammzellen transplantiert werden, die das Knochenmark neu besiedeln. Die Regeneration der Blutbildung (Hämatopoese) dauert in der Regel 10-14 Tage. Bei der Transplantation können Stammzellen verwendet werden, die vom Patienten selbst stammen. Dies wird als autologe Transplantation bezeichnet. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer allogenen Transplantation. Hier werden „fremde“ hämatopoetische Stammzellen (Spenderstammzellen) transplantiert. Die Indikation zur allogenen SCT wird bei schweren hämatopoetischen Erkrankungen und bei Erkrankungen des Immunsystems gestellt, wenn trotz vorhandener Sensitivität mit der konventionellen Radio-oder Chemotherapie nur geringer Chancen auf Heilung bestehen (Armitage, 1994). In Tabelle 1 sind zur Übersicht die Indikationen im Sinne maligner Erkrankungen für eine Stammzelltransplantation aufgeführt. Auch bei einigen nicht-malignen Erkrankungen kann eine SCT als Therapiemöglichkeit in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise bei aplas-

tischen Anämien oder schweren Immundefekten (Link et al., 1997; Travnik et al., 2011a).

Tab. 1 Indikationen für eine Stammzelltransplantation
Maligne Erkrankungen
Akute lymphatische Leukämie
Akute myeloische Leukämie
Chronisch-myeloische Leukämie
Myelodysplastische Syndrome
Myeloproliferative Syndrome
M. Hodgkin
Non-Hodgkin-Lymphome
Plasmozytom
Nicht-seminomatöse Keimzelltumoren
Ewing-Sarkom

Tabelle 1: Indikationen für eine Stammzelltransplantation (SCT) bei malignen Erkrankungen (Travnik et al., 2011a)

Da die Patienten im untersuchten Patientenkollektiv ausschließlich durch allogene Stammzelltransplantation (PBSCT, KMT) behandelt wurden, soll im Folgenden darauf näher eingegangen werden (Herold, 2009; Renz-Polster, 2008).

Nach der Konditionierung werden die Stammzellen intravenös infundiert. Die erste Phase, unmittelbar nach der Transplantation wird als „Aplastische Phase“ bezeichnet, da das neue Knochenmark noch nicht und das alte nicht mehr funktionstüchtig ist. In dieser Phase müssen sich die Patienten vor Infektionen schützen (z.B. durch Isolationsmaßnahmen) und es kommt häufig zu Schleimhautentzündungen, Fieber, Blutungsneigung und körperlicher Schwäche. Ab dem 10. Tag nach der Transplantation bemerken die Patienten meist eine Besserung des Zustands. Dies sind meist erste Anzeichen des Anwachsens der Spenderzellen, einige Tage später spiegelt sich dies auch im Blutbild wieder. Wenn die Granulozyten über 500/ μ l ansteigen wird dieser Zeitpunkt als „take“ bezeichnet (Andreesen, 2005).

Allgemein sind vier Faktoren für das Auftreten von Komplikationen nach einer Stammzelltransplantation verantwortlich (Link et al., 1997). Dazu zählen: die Grunderkrankung, die Intensität und Konditionierung mit Chemotherapie oder kombinierter Radiochemotherapie, die Zeitdauer und Ausprägung der Knochenmarkinsuffizienz und die Herkunft der hämatopoetischen Stammzellen,

sowie die daraus folgende Inzidenz der Graft-versus-Host-Erkrankung (Travnik et al., 2011a).

Im Folgenden werden die häufigsten Komplikationen nach Stammzelltransplantation kurz beschrieben. Ausgelöst durch unmittelbar toxische Effekte der myeloablativen Therapie treten häufig Schleimhautentzündungen mit Stomatitis, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, hämorrhagische Zystitis und Haarausfall, sowie Nebenwirkungen der Zytostatika, die sich organspezifisch manifestieren auf. Als Spätfolgen der ablativen Therapie kann es zu Gonadeninsuffizienz und sekundären Malignomen kommen. Oftmals kommt es vor allem in den ersten drei Wochen nach Transplantation zu agranulozytosebedingten bakteriellen und mykotischen Infektionen beziehungsweise zur Sepsis. Auch im weiteren Therapieverlauf kann es durch die immunsuppressive Behandlung zu schweren Infektionen kommen. Bei ca. 20% der Patienten kommt es im Verlauf zu einem Rezidiv (Renz-Polster, 2008). In Tabelle 2 sind weitere mögliche Komplikationen, aufgeteilt nach akuten Komplikationen und Langzeitschäden, aufgeführt.

Tab. 2 Komplikationen der Stammzelltransplantation (SCT)	
Akute Komplikationen der SCT	Langzeitschäden nach SCT
Akute GvHD	Chronische GvHD
Mukositis, Stomatitis	Infektionen
Arzneimittelreaktionen	Rezidiv
Virale, bakterielle, mykotische Infektionen	Chronische Lebererkrankungen
Hauttoxizität	Chronische Lungenerkrankungen
Panzytopenie	Fertilitätsstörungen
Gastroenteritis/Diarrhö	Autoimmunerkrankungen
Pankreatitis	Sekundärmalignome
Leberschäden	Schilddrüsenfunktionsstörungen
Kardiotoxizität	Wachstums- und Entwicklungsstörungen
Nephrotoxizität	Katarakt
Hämorrhagische Zystitis	Hyposplenismus
Flüssigkeits-/Elektrolytverschiebungen	Chronische Nervensystemerkrankungen
Interstitielle Pneumonien	Geschmacksstörungen
Transplantatabstoßung	Schäden an Zähnen, Haaren und Nägeln
Neurotoxizität	

Tabelle 2: Komplikationen der Stammzelltransplantation (SCT) (Travnik et al., 2011a)

Die Hauptkomplikation der hämatopoetischen Stammzelltransplantation ist die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD = graft-versus-host-disease). Es handelt sich um eine „Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion“ des Immunsystems, die verschiedene Organsysteme, unter anderem Darm, Leber, Haut und Lunge in Mitleidenschaft zieht (Ferrara et al., 2009).

1.2 Graft versus Host Disease

GvHD ist die Abkürzung für die englische Bezeichnung Graft-versus-Host-Disease, was mit „Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung“ ins Deutsche übersetzt werden kann. Die im Transplantat enthaltenen Immunzellen des Spenders zeigen hierbei eine Abwehrreaktion gegen das Empfängergewebe. Das Spender-Transplantat erkennt das Gewebe des Empfängers als fremd an und greift deshalb die Empfängerorgane an (Andreesen, 2005). Als nützlicher Effekt der akuten und vor allem der chronischen GvHD ist der Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL), welcher je nach Erkrankung auch als Graft-versus-Tumor Effekt bezeichnet wird, zu beobachten (de Lima et al., 2001). Dieser ist von großer klinischer Bedeutung, da hier fremde Antigene auf Tumorzellen des Empfängers von Spender T-Zellen erkannt und von diesen zerstört werden. Der GvL-Effekt ist häufig mit der akuten und chronischen GvHD assoziiert und mit Ausnahme der myeloproliferativen Erkrankungen nicht tumorzellspezifisch. Durch die beschriebene Tumorzellreduktion im Rahmen dieses Effektes trägt so vor allem die chronische GvHD zur Verminderung von Rezidiven bei (Travnik et al., 2011a).

Die Organmanifestationen einer GvHD betreffen am häufigsten Haut und Schleimhäute. Im Prinzip können aber alle Organe, die lymphoide Zellen enthalten betroffen sein, wie die Leber der Gastrointestinaltrakt, Lunge, Augen und der neuromuskuläre Apparat. Eine chronische GvHD kann nahezu jede Autoimmunerkrankung imitieren, wie beispielsweise Myasthenia gravis oder Autoimmunthrombozytopenie (Travnik et al., 2011a).

In der Behandlung zahlreicher hämatologischer Erkrankungen und verschiedener Zustände des Knochenmarkversagens ist die Übertragung von Knochenmark und Blutstammzellen als Standardtherapieverfahren etabliert. Die Prognose von Patienten mit Leukämie oder anderen hämatologischen Krankheiten nach SCT konnte durch Fortschritte auf dem Gebiet der Stammzellgewinnung, sowie der Prophylaxe und Therapie der GvHD verbessert werden. Trotzdem bleibt die chronische und die akute GvHD die führende Ursache für die weiterhin signifikante Morbidität und Mortalität von ungefähr 30% (Cowen, 2009; Hausermann et al., 2008; Travnik et al., 2011a).

1.2.1 Einteilung

Die klassische Einteilung der GvHD in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der klinischen Manifestation wird zunehmend durch die aktuell gültige Klassifikation des National Institute of Health aus dem Jahr 2005 ersetzt. Für die Auswertung des Kollektivs wurde jedoch noch die klassische Einteilung verwendet, demnach tritt eine akute GvHD innerhalb von 100 Tagen nach SCT auf und eine chronische GvHD ab Tag 100 nach SCT. Angesichts der Fortschritte in der Kenntnis von Klinik und Pathophysiologie muss diese strenge Zeitgrenze als willkürlich und damit als obsolet angesehen werden (Brazzelli et al., 2010). Eine neue Klassifikation der GvHD, die sowohl klinische als auch pathologische Kriterien beinhaltet, konnte sich in den letzten Jahren durchsetzen (Filipovich et al., 2005).

Die aktuell gültige National Institutes of Health Klassifikation umfasst folgende Kategorien:

- die klassische akute GvHD bis Tag 100,
- eine „late-onset“ akute GvHD ab Tag 100,
- ein Overlap-Syndrom mit Charakteristika einer akuten und chronischen GvHD, sowie
- die klassische chronische GvHD ohne Zeitlimit (Filipovich et al., 2005; Travnik et al., 2011a).

1.2.2 Inzidenz und Bedeutung

Die GvHD ist trotz ständig weiterentwickelter Transplantationstechniken im Bereich der allogenen Transplantation (SCT), wie beispielsweise optimierte Konditionierungsregimes, mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität assoziiert. Während die Inzidenz der chronischen GvHD in den letzten 10 Jahren zunahm, blieb die Inzidenz der akuten GvHD weitgehend unverändert (Travnik, Beckers et al. 2011). Die Inzidenz der GvHD insgesamt ließ sich innerhalb der letzten 20 Jahre nicht signifikant senken (Gilliam, 2004; Mielcarek et al., 2003). Sowohl der Beginn, als auch Schweregrad und Inzidenz korrelieren direkt mit dem Ausmaß der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger (Karrer, 2003). Das Risiko einer GvHD erhöht sich bei HLA-Inkompatibilität trotz immunsuppressiver Prophylaxe um 70-80%. Die Geschlechtsdifferenz stellt einen weiteren Risikofaktor dar, der wichtigste Risikofaktor für eine chronische

GvHD ist jedoch eine vorausgegangene akute GvHD, auch das Alter spielt als Risikofaktor eine Rolle (Travnik, Beckers et al. 2011).

1.2.3 Pathophysiologie

Die akute GvHD resultiert aus einem äußerst komplexen Zusammenspiel von konditionierungsassoziiertes Entzündung (Ferrara, 1997), der Einschwemmung von Endotoxinen und der Aktivierung von alloreaktiven Zellen. Diese Zusammenhänge sind bis heute nicht vollständig verstanden und weiterhin Gegenstand der derzeitigen Forschung (Ferrara et al., 2009; Hofmeister et al., 2004). Als Mediatoren und Effektoren der GvHD spielen die zytotoxischen T-Lymphozyten des Spenders eine entscheidende Rolle. Proinflammatorische Zytokine, welche sowohl in den Zellen des Spenders, als auch in den Zellen des Empfängers gebildet werden sind ebenfalls von großer pathogenetischer Bedeutung (Holler et al., 1993). Bei Patienten mit akuter GvHD konnten unter anderem erhöhte Serumkonzentrationen proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2 und IL-6 nachgewiesen werden (Holler et al., 1998; Holler et al., 1993). Die akute GvHD ist die pathophysiologischen Mechanismen betreffend bis heute besser untersucht und verstanden als die Pathogenese der chronischen Form (Hausermann et al., 2008). Des Weiteren wird die Frage diskutiert, ob es sich bei akuter und chronischer GvHD um zwei voneinander abgrenzbare Phasen derselben Erkrankung handelt, oder ob diese zwei voneinander unabhängige Erkrankungen, assoziiert mit hämatopoetischer SCT, darstellen. (Hausermann et al., 2008)

Im Folgenden soll die Pathophysiologie der akuten GvHD in Grundzügen näher erläutert werden.

Anhand des in Abbildung 5 dargestellten 3-Phasen-Modells lässt sich die Pathophysiologie der akuten GvHD vereinfacht erläutern. (Ferrara et al., 2009; Hill et al., 2000; Hofmeister et al., 2004; Karrer, 2003)

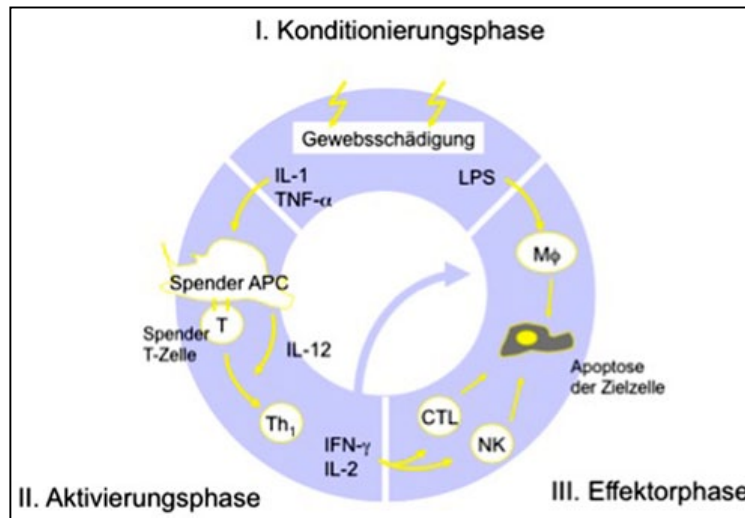


Abbildung 5: Pathophysiologie der durch Konditionierung ausgelösten akuten GvHD. Im Rahmen der Konditionierung wird das Gewebe durch Strahlung und Chemotherapie geschädigt. Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) werden freigesetzt und antigenpräsentierende Zellen (APC) werden aktiviert. In der Aktivierungsphase aktivieren die APC mit Hilfe von Zytokinen (IL-12) alloreaktive T-Zellen des Spenders, welche sich dann in Effektorzellen differenzieren (T \rightarrow Th₁). Das Muster der Zytokine mit Interferon γ (IFN- γ) und Interleukin 2 (IL-2) entspricht dem einer Th₁-Antwort. Während der Effektorphase kommt es zur Schädigung des Empfänger-Zielgewebes durch aktivierte Makrophagen (M ϕ), natürliche Killerzellen (NK) und zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), sowie zur Apoptose der Zielzellen. (Hill et al., 2000; Travnik et al., 2011a)

Entzündungsmediatoren, sowie unterschiedliche Zellpopulationen von Spender und Empfänger interagieren in einer Kaskade, welche dann zur Apoptose von Zellen in den Zielorganen der GvHD führt (Travnik et al., 2011a).

I. Konditionierungsphase: Das Gewebe wird beispielsweise durch Strahlung oder Chemotherapie geschädigt. Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) werden freigesetzt und aktivieren Antigenpräsentierende Zellen (APC) (Ferrara, 1997; Holler et al., 1997).

II. Aktivierungsphase: Die APC aktivieren mit Hilfe von Zytokinen (IL-12) alloreaktive T-Zellen des Spenders, welche proliferieren und sich dann in Effektorzellen (CD4-Helfer-Zellen und CD8-zytotoxische Zellen) differenzieren (Ferrara et al., 2003). Das Muster der Zytokine mit Interferon γ (IFN- γ) und Interleukin 2

(IL-2) entspricht dem typischen Muster einer Th1-Antwort der Lymphozyten (Hausermann et al., 2008).

III. Effektorphase: Zytotoxische T-Lymphozyten, aktivierte Makrophagen, sowie natürliche Killerzellen setzen proinflammatorische Zytokine frei, dies führt zur Apoptose der Zielzellen und zur konsekutiven Schädigung des Zielgewebes (Ferrara, 1997; Holler et al., 1998).

Verschiedene genetische Polymorphismen, sowie Toll-like-Rezeptoren, NOD-like Rezeptorproteine und regulatorische T-Zellen spielen in der Pathophysiologie der GvHD ebenfalls eine Rolle, darauf soll hier allerdings nicht näher eingegangen werden (Cavet et al., 1999; Holler et al., 2008; Holler et al., 2006).

In der Pathophysiologie der chronischen GvHD spielen neben den alloreaktiven T-Zellen, welche bei der akuten GvHD von tragender Bedeutung sind, auch autoreaktive T-Zellen, sowie auto- und alloreaktive B-Zellen eine wichtige Rolle. Das Zytokinmuster im Falle einer chronischen GvHD unterscheidet sich ebenfalls von dem einer akuten Form der Erkrankung. Von Bedeutung sind hier beispielsweise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , sowie TGF- β .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich eine chronische GvHD häufig aus einer akuten entwickelt. Während bei der chronischen GvHD ein gemischtes Th1-/Th2-Zytokinmuster vorliegt, findet sich bei einer akuten GvHD vornehmlich ein Th1-Zytokinmuster (Hofmeister et al., 2004; Travnik et al., 2011a).

1.2.4 Prophylaxe

Im Rahmen der Primärprophylaxe der akuten GvHD spielt die Wahl des Spenders mit gut übereinstimmenden Histokompatibilitätsmerkmalen die wichtigste Rolle. Um das Risiko einer GvHD zu vermindern ist jedoch auch die medikamentöse Prophylaxe von großer Bedeutung (Travnik et al., 2011b). Da Erstmanifestationen der akuten GvHD häufig an der Haut auftreten, ist es wichtig Sonnenexposition zu vermeiden und entsprechende Lichtschutzpräparate anzuwenden (Socie et al., 2010; Travnik et al., 2011b). Bereits vor Transplantation wird mit der Basisprophylaxe, bestehend aus einem Calcineurininhibitor, in der Regel Ciclosporin A, welcher gegebenenfalls mit Methotrexat (MTX) als Kombination verabreicht wird. Teilweise wird im Zuge einer solchen systemischen Prophylaxe Ciclosporin A durch Tacrolimus ersetzt. Auch Mycophenolatmofetil

(MMF) als Ersatz für MTX kam in Studien zum Einsatz (Vogelsang, 2001; Wolff et al., 2009). Als Standard der GvHD-Prophylaxe wird weiterhin MTX in Kombination mit einem Calcineurininhibitor angesehen (Grauer et al., 2010; Greinix et al., 2011). Durch die prophylaktischen Maßnahmen wird das Risiko für eine akute GvHD deutlich gesenkt. Jedoch entwickeln trotz Prophylaxe 25-60% der Patienten eine therapiebedürftige akute GvHD (Vargas-Diez et al., 2005; Wolff et al., 2009). Betreffend die Primärprophylaxe im Rahmen der chronischen GvHD sind effektive prophylaktische Maßnahmen der akuten GvHD von größter Bedeutung (Travnik et al., 2011b).

1.2.5 Therapie

Die systemische medikamentöse Therapie der akuten GvHD setzt sich aus Glukokortikoiden, wie Prednisolon oder Methylprednisolon zusammen, die unter der Fortsetzung der Calcineurininhibitor-Prophylaxe verabreicht werden. Im Falle eines isolierten Hautbefalls kann bei unter 50% Ausdehnung eine topische Therapie mit Kortikosteroiden, Calcineurininhibitoren oder eine Phototherapie durchgeführt werden. Besteht eine Ausdehnung über 50% der Hautoberfläche ist eine systemische Therapie mit Steroiden erforderlich. Bei Steroidresistenz sind weitere Therapieoptionen verfügbar. Hierzu zählen beispielsweise extracorporale Photopherese (ECP), Antithymozytenglobuline, MMF, MTX, mTOR-Inhibitoren, Pentostatin, sowie mono- oder polyklonale Antikörper gegen Mediatoren des Immunsystems (Carcagni et al., 2008; Jacobsohn et al., 2002; Travnik et al., 2011b). Nicht zu vernachlässigen ist, dass eine zusätzliche Immunsuppression das Infektionsrisiko erhöht. Da Infektionen die Haupttodesursache bei Patienten mit akuter und chronischer GvHD darstellen, ist neben der ausreichenden medikamentösen Therapie auch ein engmaschiges Infektionsmonitoring sehr wichtig (Travnik et al., 2011b).

Die Behandlung der chronischen GvHD umfasst zunächst eine ausführliche Diagnostik um alle beteiligten Organsysteme zu erfassen. Dies bedarf einer koordinierten interdisziplinären Zusammenarbeit (Filipovich et al., 2005).

Als First-Line-Therapie bei chronischer GvHD können bei lokalisiertem Befall der Haut ebenfalls lokale Steroide oder Calcineurininhibitoren angewendet werden (Elad et al., 2003; Wolff et al., 2011a). Des Weiteren stellen neben der sys-

temischen Verabreichung von Steroiden in Kombination mit Calcineurininhibitoren oder MMF, auch Photochemotherapie und UVA1-Lichttherapie wirksame Therapiealternativen dar (Wolff et al., 2010; Wolff et al., 2011b). Wenn die initiale Erstlinien-Therapie nach 8-12 Wochen nicht anschlägt, existiert kein Therapiestandard, viel mehr muss aus den zahlreichen zur Verfügung stehenden Therapieoptionen individuell ausgewählt werden (Travnik et al., 2011b). Als Zweitlinientherapie kommt neben Steroiden eine systemische Therapie mit MMF in Kombination mit Tacrolimus in Frage (Vogelsang, 2001). Weitere wichtige Therapieoptionen stellen die Extrakorporale Photopherese, Calcineurininhibitoren (CNI) und anstatt der CNI mTOR-Inhibitoren dar. Es existiert eine Reihe an seltener eingesetzten Therapieoptionen, wie beispielsweise Thyrosinkinaseinhibitoren, Retinoide, Rituximab, sowie Cyclophosphamid oder Etanercept. Jede immunsuppressive Therapie erhöht potenziell die Morbidität und Mortalität der Patienten, daher sind geringe Nebenwirkungsraten im Rahmen der Therapiemodalitäten wünschenswert. Die unerwünschten Wirkungen der oben genannten Therapien sind meist eine weitere Zunahme der Immunsuppression, Schädigung diverser Organe, wie beispielsweise Niere, Leber, Knochenmark und die Induktion von Tumoren (Travnik et al., 2011b).

1.3 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (Hsp, auch als Heat-Shock-Proteins bezeichnet) wurden erstmals 1962 von Ferruccio Ritossa beschrieben (Ritossa, 1962). Diese so genannten molekularen Chaperone sind Proteine, welche eine Vielzahl von Funktionen ausüben, beispielsweise helfen sie neu synthetisierten Proteinen sich korrekt zu falten. Darüber hinaus unterstützen Hitzeschockproteine andere Proteine beim Transport und bei Prozessen der Antigenpräsentation. Die Bezeichnung Chaperon, gleichbedeutend mit Anstandsdame, wurde gewählt, da sie unreife Proteine vor schädlichen Kontakten bewahren (Csermely, 2001; Sherman, 2007). Durch exogene oder endogene Stimulation, wie beispielsweise Hitze, oxidativer Stress oder Einwirkung von Chemikalien, werden Hitzeschockproteine vermehrt synthetisiert. Die vermehrte Bildung von HSPs kann sowohl durch die genannten Stressfaktoren getriggert werden, als auch unter physiologischen Bedingungen erfolgen. Hitzeschockproteine sind hochkonserviert und kommen sowohl bei Prokaryonten als auch Eukaryonten vor und sind in den verschiedensten Zellkompartimenten vertreten (Lindquist, 1986; Lindquist et al., 1988; Todryk et al., 2003).

Die Klassifikation der Hitzeschockproteine erfolgt entsprechend ihrer Molekulargewichte in die Haupt-Familien: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 und den kleinen (small) HSPs. Innerhalb einer Familie sind die Mitglieder sehr homolog, wohingegen sich HSP verschiedener Familien hinsichtlich Struktur und Expression unterscheiden (Schmitt et al., 2007). Mitglieder der HSP70-Familie kommen in nahezu allen zellulären Kompartimenten vor und können auch in den extrazellulären Raum sezerniert werden (Feige et al., 1994). Im Folgenden soll auf die Funktion des Hsp70 sowie die Rolle der Hsp70-Familie in der Onkologie und Immunologie näher eingegangen werden.

1.3.1 Hitzeschockprotein 70

Die Hauptvertreter der HSP70-Familie sind, das durch Stress induzierbare Hsp70 mit einem Molekulargewicht von 72 kDa, sowie das konstitutiv exprimierte Hsc70, dessen Molekulargewicht 73 kDa beträgt (Feige et al., 1994). Neben Hsc70, welches in den Zellen konstitutiv exprimiert ist und nur schwach durch äußere Reize induzierbar ist, konnte im Gegensatz dazu, beim nur gering konstitutiv exprimierten Hsp70, unter Einwirkung von Stressfaktoren eine starke Induktion nachgewiesen werden. Das stress-induzierbare Hsp70 wird in der neueren Literatur auch als HSPA1A bezeichnet (Kampinga et al., 2009). Wie bereits erwähnt kann Hsp70 in nahezu allen zellulären Kompartimenten nachgewiesen werden. Im Einzelnen können Vertreter der HSP70-Familie intrazellulär im Zellkern, Zytosol, Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien, sowie (Haas, 1994; Jolly et al., 2002) auf der Zellmembran (Multhoff et al., 1995; Multhoff et al., 2011) und extrazellulär (Asea et al., 2000; Feige et al., 1994; Pockley et al., 2008; Vega et al., 2008) nachgewiesen werden. Die Regulation von Hsp70 erfolgt unter anderem durch Hitzeschockfaktoren (Heat-Shock-Factors, HSF), welche als Transkriptionsfaktoren die Expression regulieren. Die am besten untersuchten Hitzeschockfaktoren sind HSF-1 und HSF-2. Der Hitzeschockfaktor 1 reagiert rasch bei Stimulation durch äußere Reize, wie beispielsweise Chemikalien oder Hitze. Im Gegensatz dazu zeigt HSF-2 eine langsamere und weniger effektive Aktivierung (Mathew et al., 2001).

Hsp70 ist an unterschiedlichsten intrazellulären Prozessen beteiligt. Wie bereits erwähnt zählen hierzu die Hilfe bei der korrekten Faltung neusynthetisierter Proteine, aber auch die Protein Degradation (Mathew et al., 1998). Verschiedene Partnermoleküle modifizieren durch Bindung an Hsp70 dessen Funktion. Hinsichtlich der Proteinfaltung spielen Hsp70- interacting protein (Hip) und Hsp70-organizing protein (Hop) eine Rolle. Am Abbau von Proteinen ist unter anderem CHIP (Carboxyl-terminus of Hsp70 interacting protein) beteiligt (Hartl et al., 2002; Hohfeld et al., 2001; Hohfeld et al., 1997; Meacham et al., 2001). Auch bei diversen Transportvorgängen in der Zelle spielt Hsp70 als Partnermolekül eine wichtige Rolle: Transport von Proteinen in die Mitochondrien (Gupta et al., 2008; Stuart et al., 1994), ins Endoplasmatische Retikulum (Haas, 1994; Nishikawa et al., 2005) und in die Lysosomen (Mambula et al., 2006; Terlecky,

1994). Das Hitzeschockprotein 70 ist auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, indem es mit Kontrollmolekülen, wie beispielsweise dem Tumorsuppressorprotein p53 interagiert (Zylicz et al., 2001). Auch die DNA-Replikation wird von Hsp70 beeinflusst (Helmbrecht et al., 2000).

Die Beteiligung von Mitgliedern der HSP70-Familie an diversen zellulären Prozessen zeigt die Bedeutung von Hsp70 als Partnermolekül für eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse.

1.3.2 Rolle des Hsp70 in der Immunologie und Onkologie

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Funktionen von Hsp70 unter physiologischen Bedingungen ist die Hauptaufgabe von Hsp70 nach Stress, der Schutz der Zelle vor Apoptose und die Unterstützung von Reparaturvorgängen.

Diese protektiven Eigenschaften von Hsp70 bieten auch für entartete Zellen eine Reihe von Vorteilen. Durch eine erhöhte Expression von Hsp70 wird in Tumorzellen eine anti-apoptotische Wirkung erzielt (Gabai et al., 1998; Jaattela, 1999; Wei et al., 1995). Hsp70 ist in vielfältiger Weise an apoptotischen Vorgängen beteiligt. Beeinflusst werden sowohl AIF (apoptosis inducing factor)-abhängige, als auch AIF-unabhängige Prozesse im Apoptose-Signalweg (Jaattela, 1999; Jaattela et al., 1998; Ravagnan et al., 2001).

Im Rahmen von Immunprozessen ist Hsp70 membrangebunden und in extrazellulärer Form an diversen Vorgängen beteiligt (De Maio, 1999; Shu, 2008). Etwas genauer betrachtet wurden Effekte des Hsp70 auf antigenpräsentierende Zellen (APC), T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) beschrieben, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Einer der immunstimulatorischen Mechanismen von Hsp70 als Transportmolekül für antigene Peptide wurde von Srivastava beschrieben (Srivastava, 1994). Die antigenen Peptide entstammen virus- und tumorinfizierten Zellen und können im Falle einer Nekrose der Zelle in Form eines Hsp70-Antigen-Komplexes in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (Srivastava, 1994; Udono et al., 1994). Diese Hsp70-Antigen-Komplexe werden von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie beispielsweise dendritischen Zellen oder Makrophagen über Rezeptoren aufgenommen. Nach Prozessierung, welche intrazellulär stattfindet,

werden die Hsp70-präsentierenden Peptide auf membranständigem MHC-I-Molekülen der Zellen präsentiert. Dadurch kann eine antigenspezifische Immunantwort vermittelt durch zytotoxische T-Zellen (CD8+) ausgelöst werden (Arnold-Schild et al., 1999; Basu et al., 2000; Schild et al., 1999; Singh-Jasuja et al., 2000). Des Weiteren beschreibt Asea immunregulatorische Effekte von Hsp70 durch die Bindung an TLR2 und TLR4 (Toll-like-Rezeptoren) der Monozyten. Dadurch induziert Hsp70 über einen CD14 (Cluster of Differentiation) - abhängigen Signalweg eine vermehrte Expression und damit eine verstärkte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und kann somit das angeborene Immunsystem stimulieren. Indirekt fördert Hsp70 damit auch eine Antwort des spezifischen Immunsystems (Asea et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe von Multhoff hat 1995 die Lokalisation von Hsp70 auf der Membran von humanen Tumorzellen, nicht aber auf gesunden Zellen nachgewiesen (Hantschel et al., 2000; Multhoff et al., 1995). Sowohl durch Hitzeschock, als auch durch membraninteraktive Substanzen, wie beispielsweise ET-18-OCH₃, lässt sich die Hsp70 Membranexpression bei Tumorzellen weiter steigern (Botzler et al., 1999). Die Expression von membrangebundenem Hsp70 korreliert mit einer gesteigerten Sensitivität für die durch NK-Zellen vermittelte Lyse der Tumorzellen (Botzler et al., 1996; Multhoff et al., 1997; Multhoff et al., 1995; Multhoff et al., 2000). Über ein Epitop am C-Terminus von Hsp70 binden die NK-Zellen an die Tumorzelle. Daraufhin werden durch Exozytose zytotoxische Granula freigesetzt welche zur Lyse der Tumorzellen führen (Botzler et al., 1998). Multhoff und Botzler zeigten ebenfalls, dass es durch Inkubation der NK-Zellen mit einem TDK-Peptid (Sequenz bestehend aus 14 Aminosäuren an der Hsp70-Substrat-Bindedomäne) und IL-2 zu einer vermehrten Proliferation mit gesteigerter lytischer Aktivität gegen Hsp70-positive Tumorzellen kommt (Botzler et al., 1998; Multhoff et al., 2001).

Neben Kopf-Hals Tumoren, Knochentumoren, Lungenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, konnte auch bei leukämischen Blasten eine Hsp70 Membranexpression nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Tumorzellen und leukämische Blasten, die membranpositiv für Hsp70 sind, durch NK-Zellen (durch Zytokine und TDK-Peptid aktiviert) erkannt und zerstört werden können. Hieraus

könnten sich in Zukunft Therapieoptionen im Sinne einer Immuntherapie ergeben (Gross et al., 2008; Stangl et al., 2008). Des Weiteren wurde in Studien gezeigt, dass Patienten mit de novo akuter myeloischer Leukämie (AML) häufig membranpositiv für Hsp70 sind (Gehrmann et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Leukämiezellen nach Stress in Form von Hitze, Bestrahlung oder Chemotherapie (Gehrmann et al., 2008) und Zellen die Patienten mit Relapse oder persistierender Erkrankung entnommen wurden, eine erheblich stärkere Hsp70-Membranpositivität aufweisen (Steiner et al., 2006). Auch Hinweise für einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Hsp70 Expression und der Graft-versus-host-Erkrankung wurden in verschiedenen Studien beschrieben (Jarvis et al., 2003). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Hsp70 eine wichtige Rolle in der Immunologie und Onkologie spielt und in diesem Zusammenhang auch bei Leukämien von Bedeutung ist.

1.4 Intention und Zielsetzung

Leukämien können sich in jedem Lebensalter manifestieren. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 49 bis 54% (Robert-Koch-Institut, 2012).

Trotz innovativer Therapiekonzepte, wie beispielsweise neuen Transplantationstechniken oder optimierten Konditionierungsregimes stellt die Graft-versus-Host Erkrankung nach wie vor eine der größten Limitationen für eine erfolgreiche Stammzelltransplantation dar. Die GvHD wird für die transplantationsassoziierte Mortalität von 25% mitverantwortlich gemacht (Jarvis et al., 2003). Die Inzidenz der akuten GvHD blieb über die letzten Jahre nahezu unverändert, während die Inzidenz der chronischen GvHD in den letzten 10 Jahren zunahm. Häufig bereitet vor allem die GvHD der Haut bis heute differentialdiagnostische Schwierigkeiten, da zum Beispiel Virusexantheme oder Arzneimittelreaktionen zu ähnlichen klinischen Bildern führen können und histologische Ähnlichkeiten aufweisen können (Travnik et al., 2011a).

Die aktuelle Diagnostik und Einteilung der Graft-versus-Host-Erkrankung orientiert sich an klinischen und pathologischen Kriterien. Wünschenswert wäre es einen möglichst wenig invasiven Marker als Unterstützung für die Diagnostik der GvHD zur Hand zu haben. Vor allem in unklaren Fällen könnte dieser Marker hinzu gezogen werden. Auch Therapiekonzepte, sowohl im präventiven Sinne als auch bei bestehender GvHD könnten mit Hilfe eines solchen Biomarkers individuell gestaltet und angepasst werden.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Hsp70 als potentieller Marker hierfür in Frage kommen könnte. Konkret soll gezeigt werden, ob ein Zusammenhang zwischen den mittels ELISA gemessenen Hsp70 Protein und Antikörper Werten und dem Risiko eine GvHD zu entwickeln besteht. Dafür wurden Hsp70 Protein und Antikörper in Serumproben von Patienten mittels ELISA gemessen, die daraus entstandenen Messwerte wurden ausgewertet und es wurde versucht ein Zusammenhang mit den klinisch erfassten Patientendaten nachzuweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kit

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
Albumine, bovine serum, BSA, A 9647-100G		Sigma, MO, USA
Albumine, bovine serum, BSA, A 7030-100G		Sigma, MO, USA
Aqua ad iniectabilia		Delta Select, Dreieich, D
EDTA	0,4 M	Invitrogen, NY, USA
Ethanol	70%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Isopropanol		Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Natriumcarbonat	m = 105,99 g/mol	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	99,5%, m = 84,01 g/mol	Merck, Darmstadt, D
Substrat Reagent Pack		R&D Systems, MN, USA
Sulfuric acid	99,99%	Sigma, MO, USA
Triton X-100		Sigma, MO, USA
Tween 20		Calbiochem, CA, USA

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung Kit	Hersteller
DuoSet IC Human/Mouse/Rat Total Hsp70	R&D Systems, MN, USA

Tabelle 4: Verwendetes Kit

BSA, DuoSet Total Hsp70 und Substrat Reagent Pack wurden bei +4°C im Kühlschrank gelagert, die Übrigen bei Raumtemperatur (RT).

Kitlösungen	Herstellung
Diluent No.1	1% BSA in PBS; pH = 7,2-7,4
Diluent No.4	1 mM EDTA zusammen mit 0,5% Triton X-100 in PBS; pH = 7,2-7,4
H ₂ SO ₄ 2N	5,6 ml 100% H ₂ SO ₄ ad 100 ml sterilem Wasser
Sodium Carbonat Puffer 0,1M	2,12 g Na ₂ CO ₃ in 100 ml sterilem Wasser gelöst (Lösung 1); 3,36 g NaHCO ₃ in 200 ml sterilem Wasser gelöst (Lösung 2); 8 ml Lösung 1+ 17 ml Lösung 2 + 25 ml sterilem Wasser; steril filtriert; bei RT gelagert; pH = 9,6
Substrat	Substrat Reagent Pack; 1:1 Mixtur aus Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)
PBS/T;Waschpuffer 0,05%	0,05% Tween®20 in PBS; pH = 7,2-7,4

Tabelle 5: Kitlösungen und Herstellung

2.1.2 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Verwendung
Phosphate Bufferred Saline (PBS)	gem. Hersteller	Invitrogen, Paisley, UK	Standardpuffer

Tabelle 6: Puffer

PBS wurde bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

2.1.3 Antikörper und Protein

Bezeichnung (Klon)	Ursprung	Isotyp	Konjugat	Firma
Anti Human	Goat	IgG	Peroxidase conjugated	Sigma, MO, USA
anti-Hsp70, AF1663	Rabbit	IgG		R&D Systems, MN, USA
anti.h/m/r Hsp70, MAB1663	Mouse	Monoclonal IgG 2a		R&D Systems, MN, USA
Hsp70 Protein 1.6 mg/ml; recombinant human				Assay Designs,

Tabelle 7: Antikörper und Protein

Alle Antikörper und das Protein wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.4 Plastikmaterial

Artikel	Hersteller
96 well EIA/RIA Plate	Costar, NZ, USA
96 well Nunc-immuno Plate	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Einmalhandschuhe S/M/L	Sempermed, Vienna, A
Einwegpipette 1 ml / 2 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml / 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einwegpipettenspitzen 10 µl / 200 µl / 300 µl / 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcontubes 15 ml	TPP
Falcontubes 50 ml	Sarstedt, Nümrecht, D
Flüssigkeitsreservoirs 200 ml	Roth, Karlsruhe, D
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
SealPlate	Roth, Karlsruhe, D

Tabelle 8: Plastikmaterial

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
ELISAreader	BioTek, VT, USA
Incubator	Heraeus, Hanau, D
Pipette 10 ml / 100 ml / 1000 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette 12-Kanal	BioHit Proline,
Pipette 8-Kanal	Roth, Karlsruhe, D
Tischzentrifugen	Heraeus, Hanau, D

Tabelle 9: Geräte und Hersteller

2.1.6 Blutserum

Material	Ursprung	Serum wurde entnommen von	Projektzeitraum
Blutserum	Universitätsklinikum Regensburg	Patienten der Klinik für Hämatologie und Onkologie	07/2003-08/2007

Tabelle 10: Blutserum

Für das untersuchte Kollektiv und das als Referenz verwendete Normalkollektiv genehmigte die Ethikkommission die Materialentnahme. Das positive Votum der Ethikkommission der Universitätsklinik Regensburg für die Entnahme der Serumproben liegt vor. Die Patienten wurden über die Probenentnahmen aufgeklärt und erklärten schriftlich ihr Einverständnis. Den Patienten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Serum und EDTA-Blut abgenommen. Die Verarbeitung erfolgte jeweils zeitnah nach der Entnahme. Alle Daten wurden in verschiedenen Datenbanken dokumentiert (Microsoft Excel Versionen ab 2007).

2.1.7 Sonstiges Material und sonstige Geräte

Sonstiges Material und nicht erwähnte Geräte wurden über entsprechende Firmen, wie Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) oder Laborcenter bezogen und waren als „für wissenschaftliche Zwecke geeignet“ ausgewiesen.

Die Inkubationsschränke (Heraeus, Hanau, D) und Tischzentrifugen (Roth GmbH, Karlsruhe, D), sowie sämtliche Arbeitsgeräte wurden regelmäßig sterilisiert und gewartet.

2.2 Methoden

2.2.1 Blutabnahme

Den Patienten/Probanden wurde eine oberflächlich gelegene Vene punktiert und Blut mit dem dafür vorgesehenen Entnahmesystem (Butterfly-Kanüle, Serumröhrchen siehe Abbildung 6) gewonnen. Die Serumröhrchen wurden unmittelbar bei RT in das Labor transportiert.



Abbildung 6: Butterfly-Kanüle (links) zur venösen Blutentnahme, Serumröhrchen (rechts) zur Gewinnung und Transport der Blutprobe

2.2.2 Serumgewinnung

Für die Hsp70-Analyse des Blutes mittels ELISA verwendet man Blutserum, kurz Serum genannt. Hierbei handelt es sich um den flüssigen Anteil des Blutes, den man als Überstand nach Zentrifugation der geronnenen Blutprobe erhält.

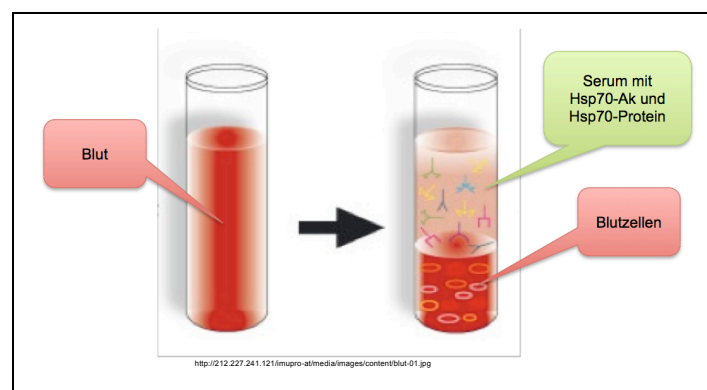


Abbildung 7: Blutserum; Abbildung modifiziert

Der Überstand ist klar bis trüb, je nach Anteil der Lipide, Bilirubin verursacht die gelbliche Färbung. Hsp70-Antikörper und Hsp70-Protein befinden sich in gelöster Form im Serum wie in Abbildung 7 dargestellt.

Alle Arbeitsschritte waren an der Sterilbank auszuführen. Die Proben wurden als potentiell infektiös behandelt und gängige Sicherheitsstandards wurden eingehalten. Alle Materialien, die mit dem Patientenmaterial in Berührung kamen, wurden als potentiell infektiös getrennt entsorgt. Leserliche genaue Beschriftung der Probe mit ID, Menge, Inhalt, Datum und Kürzel des Wissenschaftlers wurde standardisiert durchgeführt.

Blut wurde frisch entnommen und ins Labor transportiert. Sofort nach Erhalt der Serumröhrchens, wurde der Inhalt in ein 15 ml Falcontube überführt und danach bei RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und gevortext. Aliquots von 150 µl wurden erstellt und diese wurden unverzüglich bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 ELISA

ELISA steht für **Enzym Linked Immunosorbent Assay**. Es handelt sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (Assay), das sich enzymatische Farbreaktion zu Nutze macht. In diesem Falle wurden 2 verschiedene ELISA verwendet, einer zum Nachweis des Hsp70-Antikörpers und einer zum Nachweis des Hsp70-Proteins.

Materialien, die mit dem Patientenserum in Berührung kamen, wurden als potentiell infektiös getrennt entsorgt. Als Arbeitsutensilien wurden bevorzugt Einmalartikel verwendet. Bei allen Schritten wurden Einmalhandschuhe getragen. Bedingt durch die Sensitivität des jeweiligen ELISA wurde zu Beginn des Arbeitens der Arbeitsplatz mit Ethanol gereinigt, um eventuelle Proteinspuren zu beseitigen.

Für jede Inkubation wurde die Platte mit einem Sealer verschlossen und in eine Plastikbox mit Deckel gelegt. Die Temperatur des Inkubators war standardmäßig auf 27 °C festgelegt.



Abbildung 8: Box mit Sealer verschlossenen ELISA-Platten (links); Inkubator mit Box (rechts)

Bei allen verwendeten Materialien handelt es sich um sterile Einwegwaren. Chemikalien wurden auf ihre Haltbarkeit geprüft und Rahmenparameter wie beispielsweise der pH-Wert geprüft. Alle Reagenzien und Verdünnungen wurden bei RT bearbeitet und wenn nicht, unverzüglich verwendet danach auf Eis gestellt.

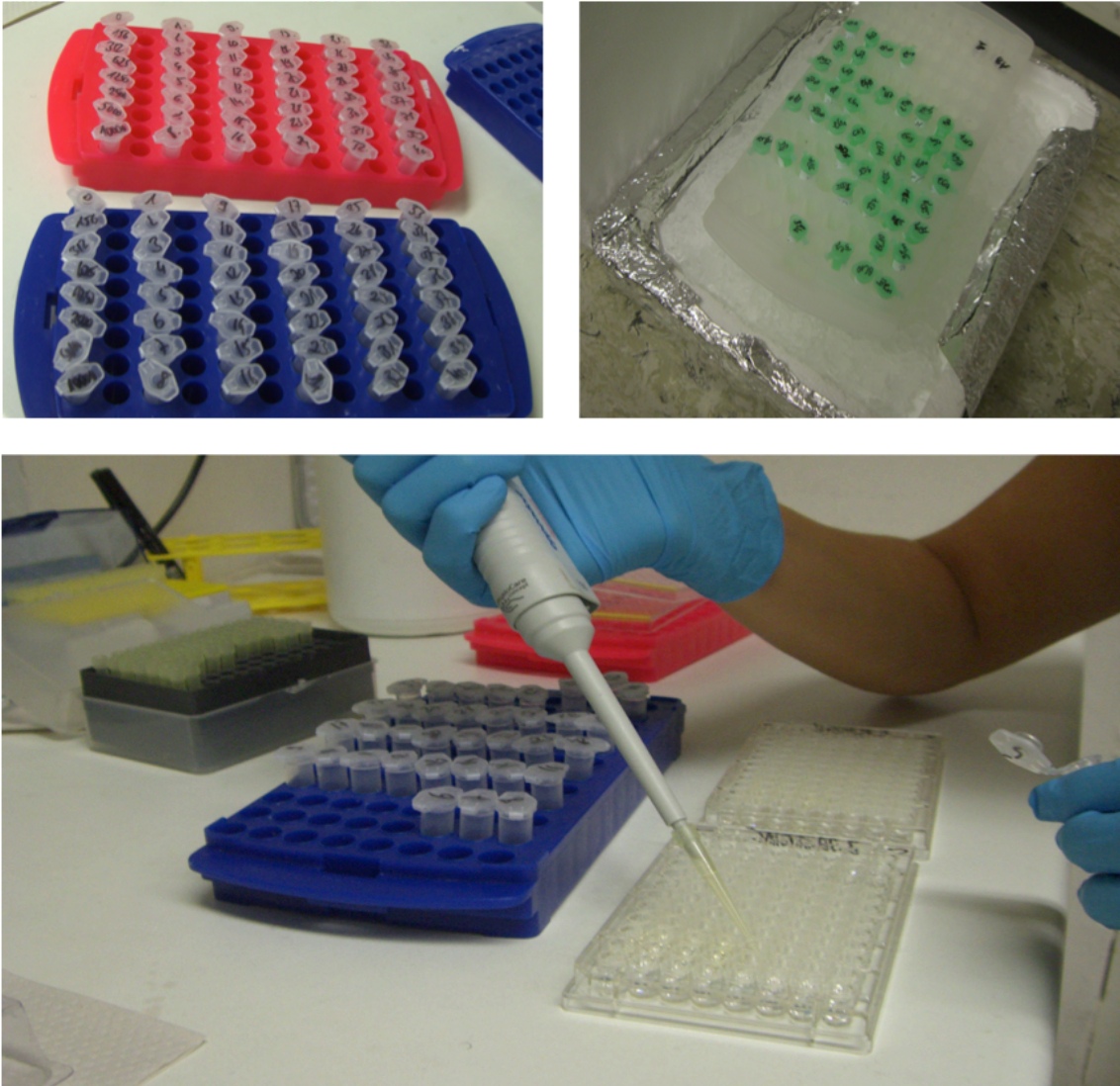


Abbildung 9: Tubes für Probenverdünnung (oben links); Proben verdünnt auf Eis (oben rechts); Pipettierschritt Proben (unten)

Final wurden die Platten mithilfe eines ELISReaders ausgelesen und mithilfe eines Computers ausgewertet.



Abbildung 10: ELISAreader (oben, mitte) und dazugehöriger Computer (unten)

2.2.3.1 Protokoll Hsp70-AK

Für die Messung des Hsp70-AK wurde ein eigener ELISA entwickelt. Folgende Schritte wurden nacheinander durchgeführt:

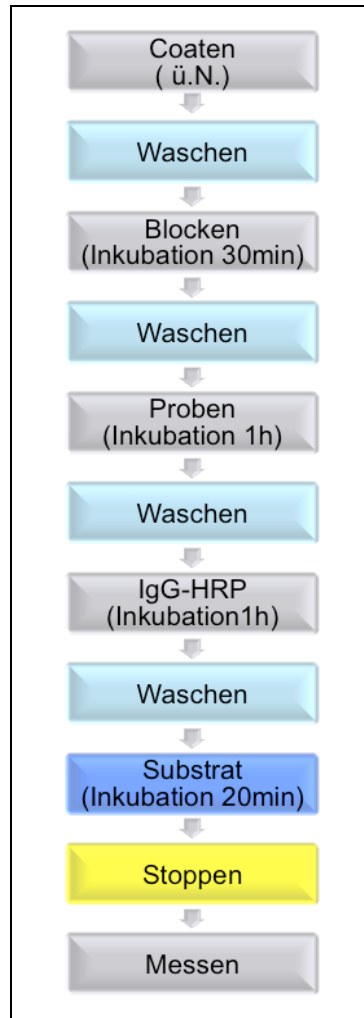


Abbildung 11: Arbeitsschritte Hsp70-Antikörper-ELISA

Die Arbeitsschritte des Hsp70-AK-ELISA (siehe Abbildung 11) werden im Folgenden näher erläutert. Rekombinantes humanes Hsp70 wurde 1:2000 in Carbonatpuffer (0,1 M; pH = 9,6) verdünnt. 96-well-Platten wurden mit 100 µl dieser Lösung pro well gecoatet und ü.N. bei +4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte 3x mit dem Waschpuffer (250 µl/well) gewaschen. Geblockt wurde mit 150 µl/well Diluent No.1 für 30 min im Inkubator. Die Serumproben wurden 1:100 in PBS auf Eis vorverdünnt. Der Standard Hsp70-Ak wurde ebenfalls auf Eis vorverdünnt (1:800; 1:400; 1:12,5). Die Platten wurden erneut gewaschen (wie oben beschrieben), dann wurden 100 µl/well der

Probe aufgetragen und daraufhin wurden die Platten mit aufgetragener Probe für 1 h im Inkubator platziert. Abermals wurde (s.o.) gewaschen. IgG-HRP (= horseradish peroxidase) wurde 1 : 10.000 in PBS/T verdünnt und 100 µl/well aufgetragen. Erneut wurde für 1 h im Inkubator inkubiert. Ein letztes Mal wurde (s.o.) gewaschen und dann wurde 100 µl/well Substrat Solution aufgetragen und daraufhin wurden die Platten für 20 min in den Inkubator gestellt. Die Farbreaktion wurde mit 2 N Schwefelsäure (50 µl/well) gestoppt. Danach wurden die Samples bei der Wellenlängen 450 nm und gegen die Referenzwellenlänge 570 nm am ELISAreader gemessen. Zusammenfassend sind in Abbildung 12 die Kernschritte des Hsp70-AK-ELISA grafisch dargestellt.

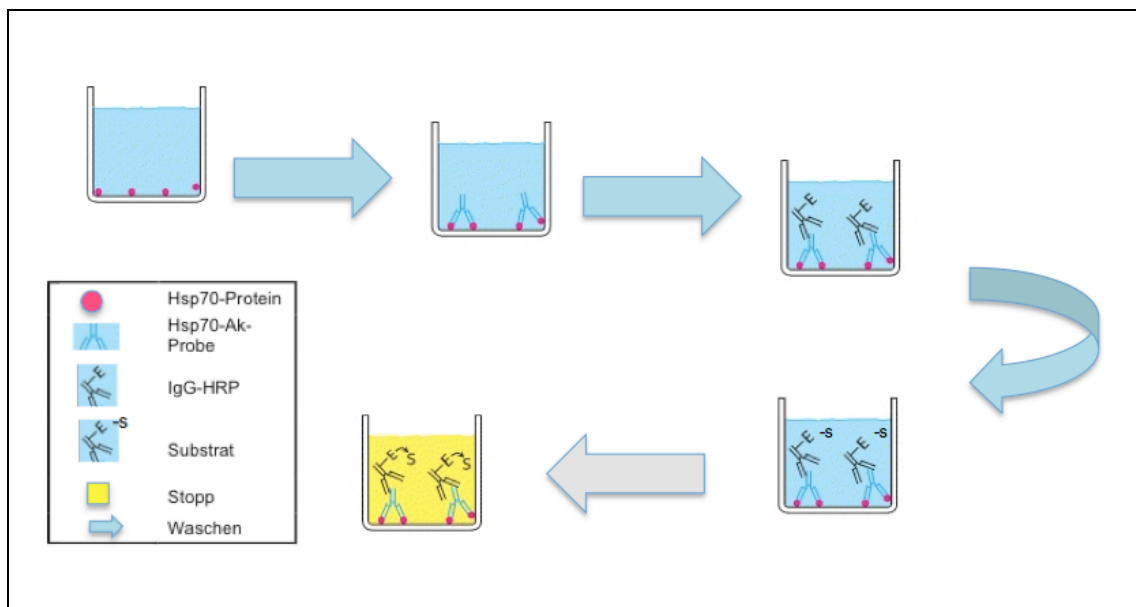


Abbildung 12: Übersicht Hsp70-AK-ELISA (modifiziert nach <http://exploreable.files.wordpress.com/2011/05/ch4f35.jpg>)

2.2.3.2 Protokoll Hsp70-Protein

Für die Hsp70-Protein Messung wurde das DuoSet IC Human/Mouse/Rat Total Hsp70 von der Firma R&D Systems, MN, USA als Grundlage verwendet. Im Allgemeinen wurden die Anweisungen des Kits befolgt. Es wurde modifizierend in das Protokoll eingegriffen, um den ELISA für unsere Zwecke verwenden zu können.

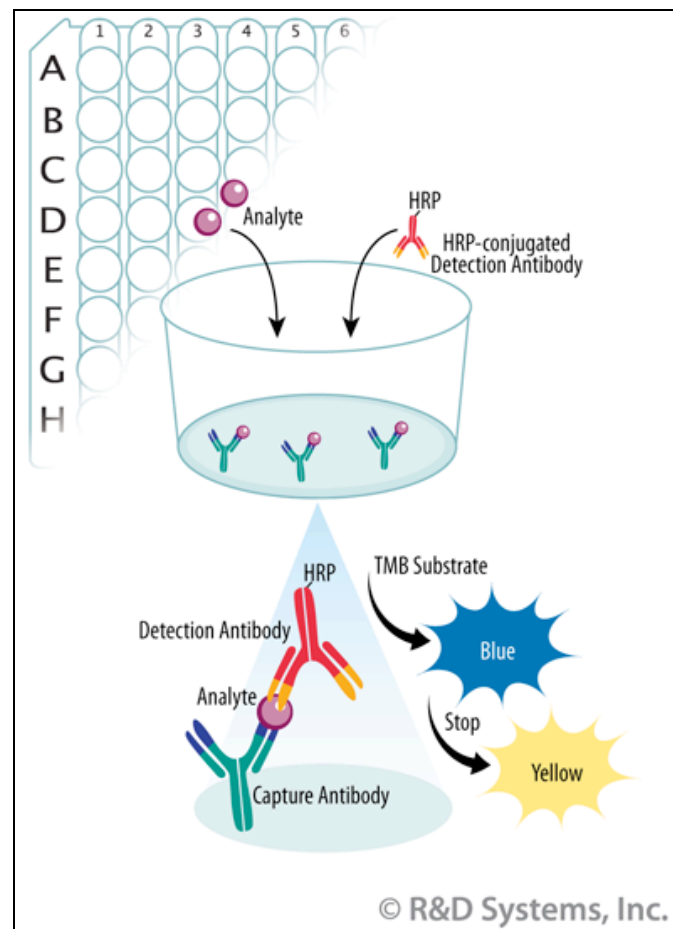


Abbildung 13: Übersicht Hsp70-Protein-ELISA; R&D Systems

In Abbildung 13 ist oben links angeschnitten die 96-well-Platte dargestellt. Die lilafarbenen (Analyte) Punkte stellen das zu analysierende Serum dar. Dieses bindet den, auf dem Boden der Platte befindlichen, grün/blauen Antikörper (Capture Antibody). Um die enzymatische Farbreaktion zu nutzen, wird ein roter Antikörper (Detection) benötigt, der mit HRP (= horseradish peroxidase) konjugiert wurde.

Mit Hilfe dieser Reaktion kann farbkodiert, durch das Substrat (blue), der Hsp70-Protein-Gehalt dargestellt werden. Final wird die enzymatische Reaktion gestoppt (yellow) und ausgelesen. Stoppvorgang siehe auch Abbildung 14.

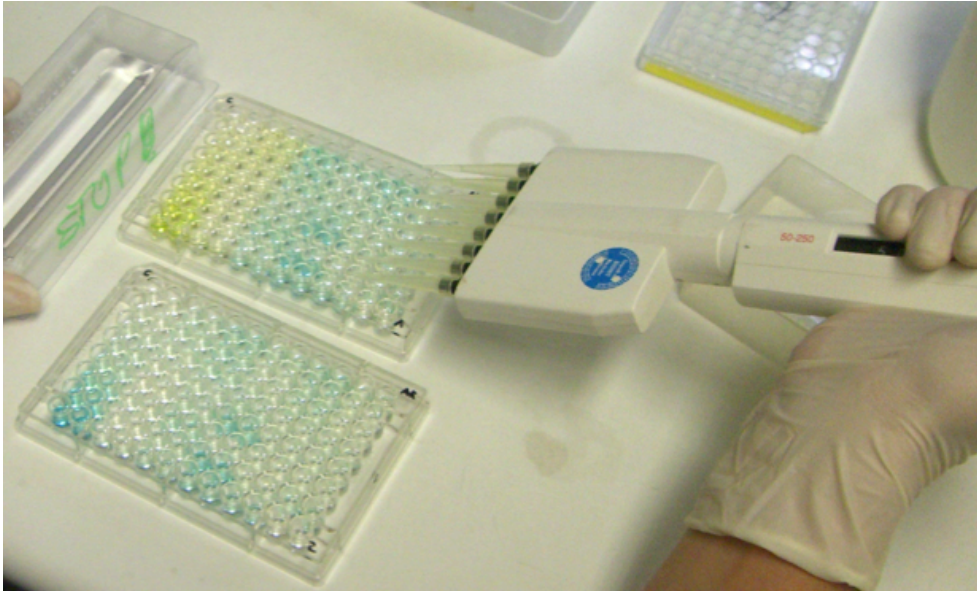


Abbildung 14: Pipettierschritt Stoppvorgang

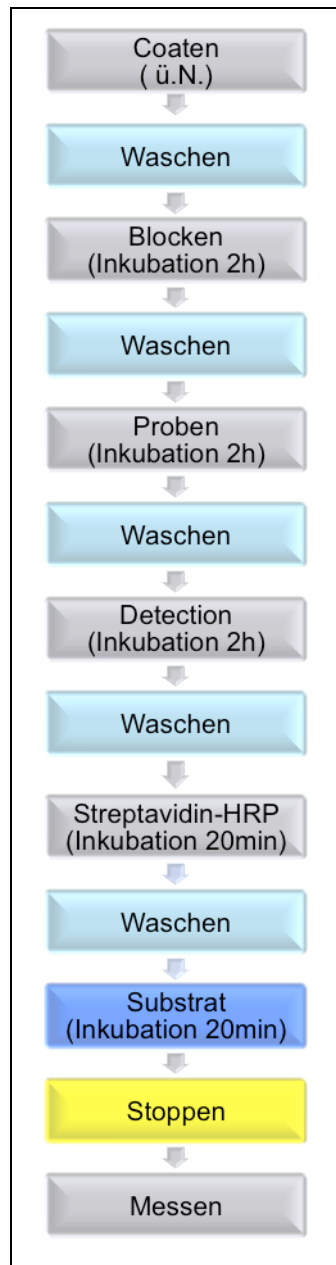


Abbildung 15: Arbeitsschritte Hsp70-Protein-ELISA

Im Folgenden werden diese Arbeitsschritte, in Abbildung 15 als Übersicht dargestellt genauer erläutert. Zum Coaten wurde der Capture-Antikörper 2,0 µg/ml in PBS verdünnt, 100 µl/well wurden ü.N. bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde zuerst 3x mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Geblockt wurde mit Diluent No.1 250 µl/well dann wurden die Platten für 2 h im Inkubator platziert.

Proben und Standard wurden in Diluent No.4 verdünnt. Die Verdünnung wird so eingestellt, dass die Probe in einem linearen Normbereich der Standardkurve liegt. Der höchste Standard war 10.000 pg/ml und wurde in 7 Schritten herunter

verdünnt. 100 µl/well wurden aufgetragen und für 2 h in den Inkubator gestellt. Abermals wurde (s.o.) gewaschen. Der Detection-Antikörper wurde in die Konzentration 100 ng/ml in Diluent No.1 gebracht. 100 µl/well wurden für weitere 2 h im Inkubator belassen. Der Waschschrift wurde wiederholt (s.o.), daraufhin wurde 1,0 ml Streptavidin in Diluent No.1 verdünnt und 100 µl/well für 20 min in den Inkubator gestellt. Ein letztes Mal wurde gewaschen (s.o.), dann wurden 100 µl/well der Substrat Solution für 20 min im Inkubator gelagert. Die Farbreaktion wurde mit 2 N Schwefelsäure (50 µl/well) gestoppt. Danach werden die Samples bei der Wellenlängen 450 nm und gegen die Referenzwellenlänge 570 nm am ELISAreader gemessen.

Die oben aufgeführten Arbeitsschritte sind in Abbildung 16 nochmals grafisch dargestellt.

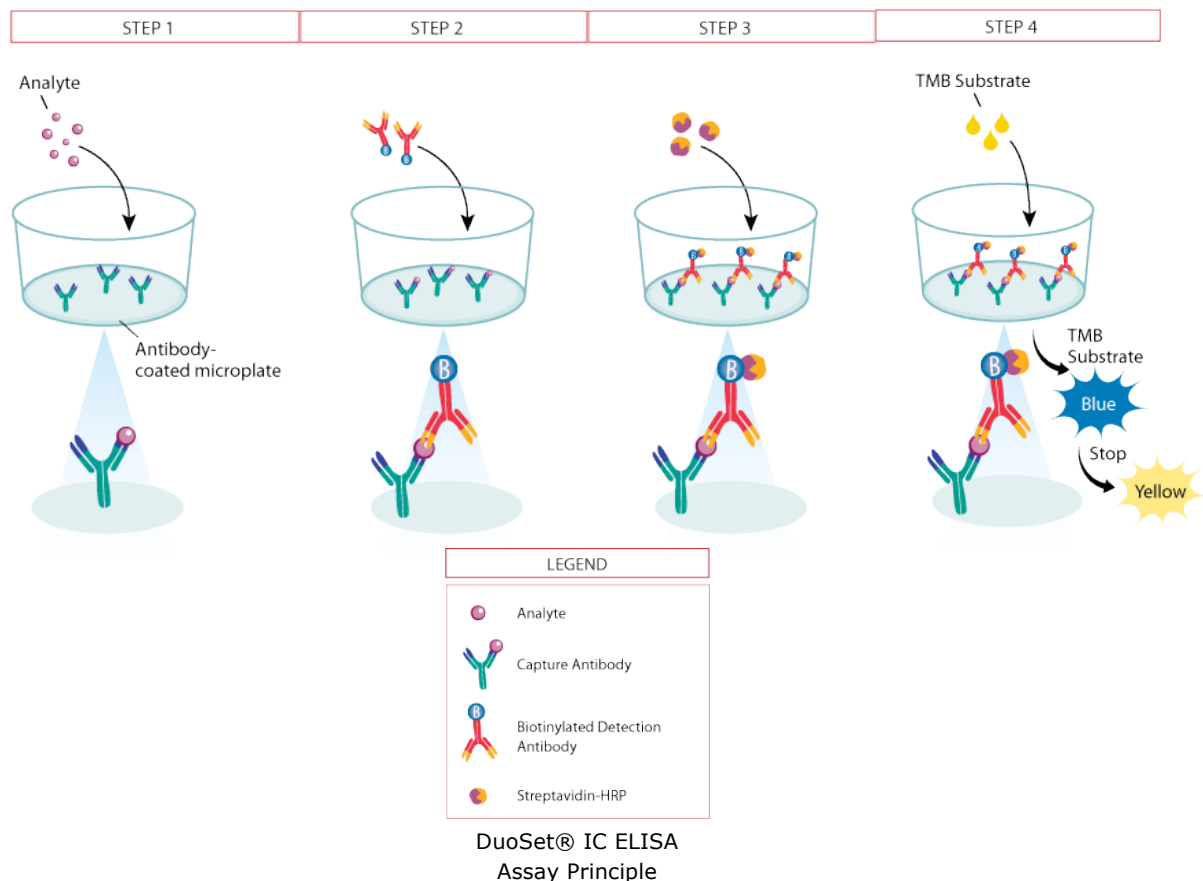


Abbildung 16: Arbeitsschritte Hsp70-Protein ELISA

2.2.4 Standard Laborparameter

Bei allen im Ergebnisteil mitgeteilten Werten handelt es sich um Routinebefunde des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg. Sie unterliegen dem deutschen Standard für Labor Diagnostik.

2.2.5 Bildbearbeitung

Bildaufnahmen wurden mit einer Digitalkamera von Casio gemacht. Anschließend auf einen PC übertragen und mit Adobe Photoshop oder Paint bearbeitet. Graphen und Schaubilder wurden mit Microsoft Excel, Sigma Plot oder IBM SPSS-Statistics® hergestellt.

2.2.6 Statistik

Fehlerbalken resultieren aus dem SEM (Standardfehler), die Quantifizierung erfolgt aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen, zumeist jedoch mehr. Statistische Auswertungen wurden mit Microsoft Excel oder IBM SPSS-Statistics® angefertigt.

Anderweitige statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durch Dr. Schuster erstellt. Folgende statistische Tests wurden zur Analyse der Daten verwendet: T-Test, Wald-Chi-Quadrat-Test, Log-Rank-Test (Mantel Cox). Daraus wurden Parameterschätzer, sowie verallgemeinerte Schätzungsgleichungen erstellt. Des Weiteren wurden verallgemeinerte lineare Modelle, unter anderem mit Hilfe der Quasi-Likelihood-Funktion unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien, erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenmaterial

Die Serumproben der Patienten wurden von Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik Innere Medizin III (Abteilung für Hämatologie und Onkologie) der Universitätsklinik Regensburg entnommen und gesammelt. Die Erfassung der Patientendaten und Proben erstreckte sich über den Zeitraum vom Juli 2003 bis August 2007, danach erfolgte eine regelmäßige und engmaschige Überwachung („Follow-up“) der Patienten in der Transplantationsambulanz des Klinikums der Universität Regensburg. Vor Ort wurden im Januar 2011 die aktuell vorliegenden Daten anhand der vorliegenden Patientenakten von mir erhoben. Eine Genehmigung der Ethikkommission durch das Klinikum der Universität Regensburg liegt für das Vorhaben vor.

Insgesamt wurden 52 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bis zum Ende der Untersuchung überlebten 24 Patienten. 8 der Patienten mit ALL/AML verstarben an den Folgen eines Rezidivs der Leukämie, in einzelnen Fällen war dies mit einer Sepsis assoziiert ($n = 3$). Multiples Organversagen ($n = 2$), Graft-versus Host Disease ($n = 4$), Blutungen oder embolische Ereignisse ($n = 2$), sowie Infektionen wie Toxoplasmose, EBV, Pneumonie oder Pilzinfektionen ($n = 6$) wurden als weitere Todesursachen erhoben. Teilweise wurden auch mehrere der oben genannten Ursachen als Todesursache angegeben.

Das durchschnittliche Gesamtüberleben aller Patienten beträgt 30,4 Monate. Das Gesamtüberleben der untersuchten Patienten bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt („last follow-up“) betrug 1 Monat bis 74 Monate. Weiterhin wurden wichtige klinische Ereignisse, wie z.B. schwere Infektionen, GvHD-assoziierte-Ereignisse und das Auftreten von anderen bösartigen Erkrankungen dokumentiert.

Als Laborwerte wurde die Anzahl der Leukozyten, Thrombozyten, die LDH (Laktat-Dehydrogenase), das Hämoglobin, CRP (C-reaktives Protein) und Temperatur dokumentiert. Auch die Medikation betreffenden Daten (Immunsuppressiva, Prophylaxe, GvHD-Behandlung) wurden von mir erhoben.

Die Serumproben der Patienten wurden zu 8 definierten Zeitpunkten entnommen (siehe Tabelle 11). Diese Zeitpunkte reichen von der Entnahme vor Konditionierung bis mindestens 80 Tage nach der Knochenmarktransplantation. Die entnommenen Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme kryokonserviert.

Erhebungszeitpunkt	N		Median	Perzentile			
	Gültig	Fehlend		2,5	25	75	97,5
1	52	0	-21,00	-181,68	-33,00	-10,25	-4,33
2	52	0	+17,00	-1,05	15,00	20,00	166,85
3	52	0	+27,00	13,65	21,00	34,00	185,75
4	52	0	+40,00	18,98	33,00	47,50	228,85
5	43	0	+77,00	26,00	41,00	84,00	182,30
6	39	0	+141,00	22,00	78,00	168,00	
7	29	0	+169,00	41,00	84,00	348,50	
8	21	0	+342,00	62,00	139,50	504,00	

Tabelle 11: Zeitpunkte der jeweiligen Probeentnahme pro Patient

Die Entnahmezeitpunkte 1-8 befinden sich in der linken Spalte, die Anzahl der Messungen (N), hier als ‚gültig‘ bezeichnet sind in der zweiten Spalte von links aufgeführt. Die Spalte ‚Median‘ gibt die Entnahmezeitpunkte an, welche in Tagen vor (-) oder nach (+) Transplantation angegeben sind. Die Perzentilen zeigen die statistische Streuung der erhobenen Werte an.

Durchschnittlich wurden die Serumproben 20 Tage vor Transplantation (als Zeitpunkt d-20 bezeichnet) und im Verlauf jeweils an d+20, d+30, d+40, sowie d+80 abgenommen. Die exakten Zeitpunkte können aus Tabelle 11 entnommen werden und wurden mittels Berechnung des Median zu den jeweils spezifischen Entnahmezeitpunkten eines jeden Patienten berechnet.

Bis d+40 wurden bei allen 52 Patienten zu regelmäßigen Zeitpunkten Proben entnommen, siehe auch (Abbildung 17) Nach diesem Zeitpunkt wurden die Proben zu zunehmend unregelmäßigeren Zeitpunkten entnommen.

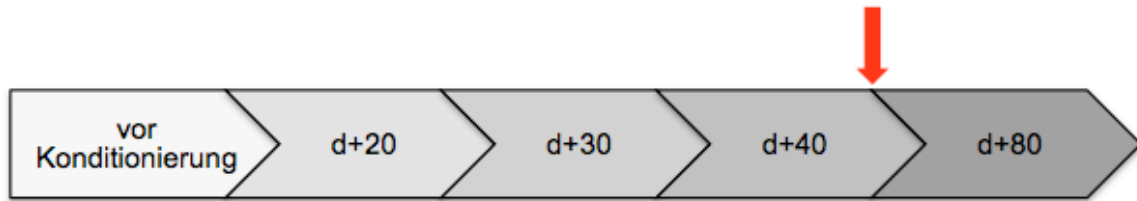


Abbildung 17: Entnahmezeitpunkte der Serumproben im Überblick

In Abbildung 17 sind die Entnahmezeitpunkte der Serumproben im Einzelnen für jeden der 52 im Kollektiv untersuchten Patienten dargestellt. Die Patienten sind als Identifikationsnummern (ID) 1-52 auf der x-Achse zu den Entnahmezeitpunkten (in Tagen vor bzw. nach Knochenmarktransplantation) aufgetragen.

Gut erkennbar in Abbildung 18 ist die Regelmäßigkeit und Vollständigkeit der Probeentnahmen bzw. der zugehörigen Zeitpunkte zu Beginn, sowie die tendenzielle Unregelmäßigkeit und Unvollständigkeit ab d+90 und darüber hinaus.

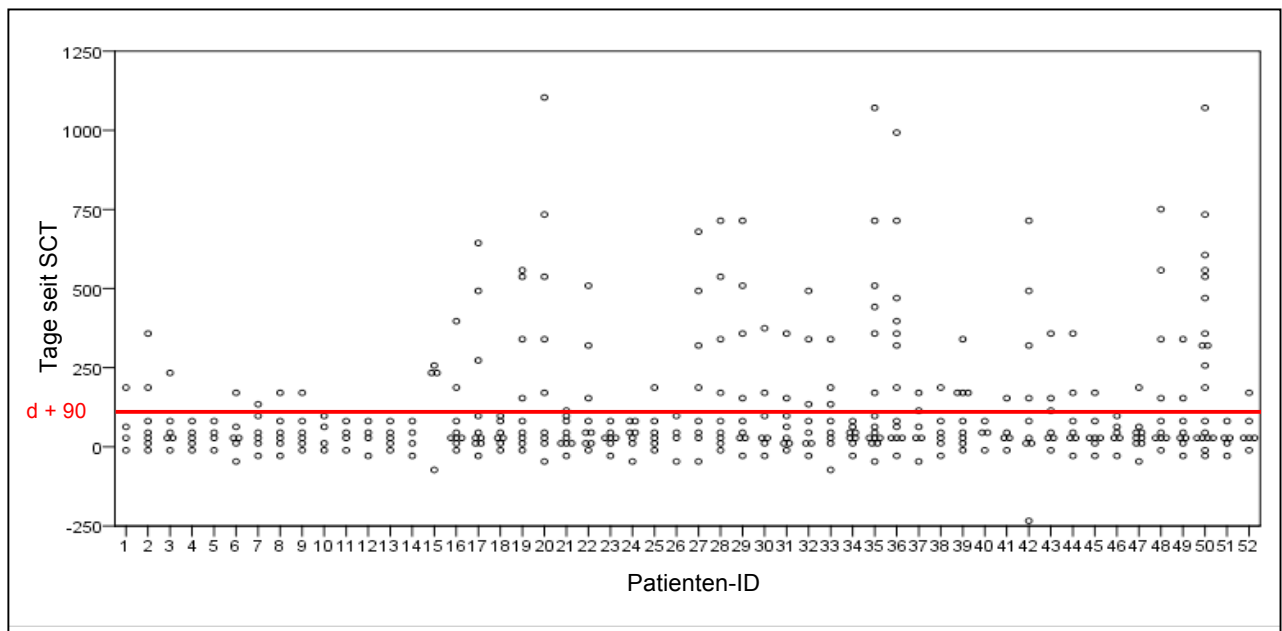


Abbildung 18: Übersicht der Probeentnahmezeitpunkte pro Patient

3.2 Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Instituts für medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE), Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

3.2.1 Patientenkollektiv

Bei allen Patienten im untersuchten Kollektiv lag eine Leukämie oder eine andere maligne hämatologische Erkrankung als Diagnose zu Grunde. In Tabelle 12 sind die Diagnosen der Patienten als Übersicht dargestellt. Die meisten Patienten ($n = 22$) wiesen als Diagnose eine akute myeloische Leukämie (AML) auf. Dieses Erkrankungsbild entspricht 42% der Erkrankungen im Kollektiv. Als zweithäufigste Erkrankung ($n = 11$) erwiesen sich die Non-Hodgkin Lymphome (NHL), welche die Multiplen Myelome (MM) ($n = 6$) beinhalten und 22% der Diagnosen darstellen. Die Entität der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ($n = 9$) stellt mit 17% die dritthäufigste Diagnose im Kollektiv dar.

Underlying diagnosis	Number of patients included (n)	percent (%)
AML	22	42
NHL	11	22
ALL	9	17
others	5	9
CML	3	6
CLL	2	4

Tabelle 12: Zugrundeliegende Diagnose (= underlying diagnosis), Anzahl der Patienten (= number of patients included = n), Prozentangabe (= percent %); AML = akute myeloische Leukämie, NHL = Non-Hodgkin-Lymphom, ALL = akute lymphatische Leukämie, others = sonstige Erkrankungen, CML = chronische myeloische Leukämie, CLL = chronische lymphatische Leukämie

Zu den sonstigen Erkrankungen (others) zählen myelodysplastische Syndrome (MDS), myeloproliferative Erkrankungen wie beispielsweise Osteomyelofibrose (OMF), die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) als korpuskuläre

hämolytische Anämie mit erworbenem Membrandefekt und unspezifische maligne hämatologische Erkrankung (MHD; malignant haemological disorder).

Die chronische myeloische Leukämie (CML) (n = 3) wurde hier auf Grund der besseren Übersichtlichkeit separat aufgeführt, kann aber zu den chronischen myeloproliferativen Erkrankungen gezählt werden.

Bei der seltensten Diagnose im untersuchten Kollektiv handelt es sich um die chronische lymphatische Leukämie (n = 2) (CLL) mit einem Anteil von 4% der Gesamtdiagnosen.

Maligne hämatologische Erkrankungen können als primäre oder sekundäre Erkrankungen auftreten. In Tabelle 13 ist die Verteilung der primären und sekundären Erkrankungen im untersuchten Patientenkollektiv als Übersicht dargestellt.

	number of patients (n)	percent (%)
primary disease	41	79
secondary disease	11	21

Tabelle 13: Anzahl der Patienten (= number of patients) mit primärer Erkrankung (= primary disease) und sekundärer Erkrankung (= secondary disease), Prozentangabe (= percent%)

41 der untersuchten Patienten im Kollektiv wiesen eine primäre maligne hämatologische Erkrankung auf (79%). Als primäre Erkrankungen werden hier solche bezeichnet, denen keine weitere Erkrankung, auch keine weitere maligne hämatologische Erkrankung zu Grunde liegt oder damit einhergeht. Die Risikofaktoren entsprechen in diesem Fall den allgemeinen Risikofaktoren einer Leukämie. Eine sekundäre Erkrankung wurde bei 11 der Patienten (21%) nachgewiesen, hier liegt eine andere hämatologische Erkrankung zu Grunde, die zur Entstehung einer Leukämie beiträgt. Beispiele dieser Grunderkrankungen sind das myelodysplastische Syndrom, das Plasmozytom, Morbus Hodgkin, das Non-Hodgkin-Lymphom und die essentielle Thrombozythämie aus dem Panel der hämatologischen Erkrankungen. Eine durchgeführte immunsuppressive Therapie, wie z.B. Chemotherapie und/oder Strahlentherapie als Risikofaktoren

für sekundäre hämatologische Erkrankungen bei Mammakarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Hodenkarzinom, Nierenzellkarzinom und Morbus Crohn waren ebenfalls zu jeweils n = 1 im Kollektiv vorhanden.

Die Altersverteilung der Patienten lag zwischen 23 bis 64 Jahren, das mediane Alter der Gesamtanzahl an Patienten betrug 50,2 Jahre. Der geschlechtsbezogene Medianwert betrug bei den Frauen 50,4 Jahre und bei den Männern 50,1 Jahre, wobei die Altersverteilung der Männer einen größeren Bereich abdeckte. Das Patientenalter wurde jeweils zum Zeitpunkt der hämatopoetischen Stammzelltransplantation bestimmt. In Tabelle 14 ist die Alters- und Geschlechterverteilung des Kollektivs dargestellt. Von den insgesamt 52 Patienten waren 22 Patienten weiblich (42,3%) und 30 männlichen Geschlechts (57,7%).

gender	median age (years) at SCT (range)
female (n = 22)	50,4 (40-63)
male (n = 30)	50,1 (23-64)
overall patients (n = 52)	50,2 (23-64)

Tabelle 14: Geschlecht (Anzahl = n): female = weiblich, male = männlich, overall = gesamt und Alter (Median, in Jahren) bei SCT = Stammzelltransplantation

In Abbildung 19 ist die bereits erläuterte Alters- und Geschlechtsverteilung als Boxplot dargestellt. Diese graphische Darstellung verdeutlicht die ähnlichen Medianwerte bei beiden Geschlechtern. Aufgrund der sehr ähnlichen Medianwerte lassen sich beide Gruppen gut vergleichen.

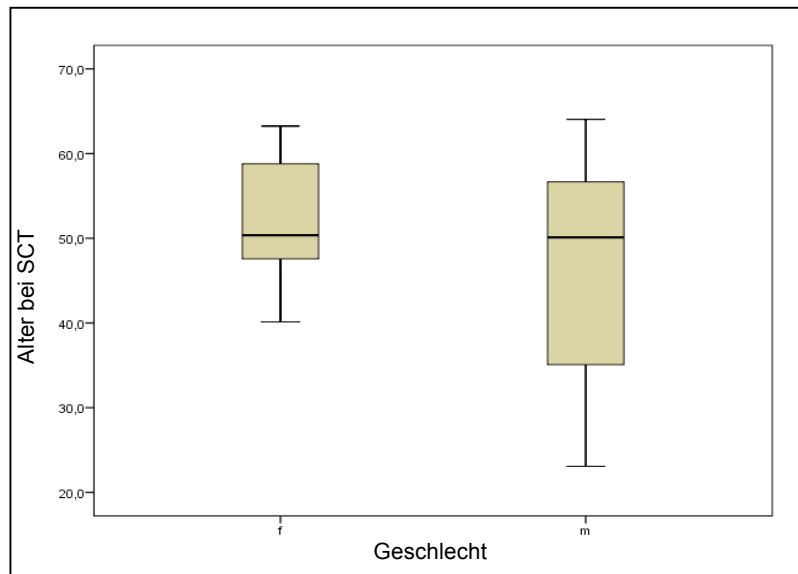


Abbildung 19: Alter bei Stammzelltransplantation (= SCT); Geschlecht f = weiblich, m = männlich

3.2.2 Messungen: Hsp70-Protein und Antikörper

Pro Patient wurden zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt der Serumprobe insgesamt 4 Messungen ($n = 4$) an unterschiedlichen Tagen gemacht. Die Messungen erfolgten mittels ELISA-Technik nach der im Kapitel "Material und Methoden" erläuterten Methode. Es wurden jeweils Hsp70-Protein- und Antikörpergehalte bestimmt. In wenigen Ausnahmefällen, wenn z.B. zu wenig Probenmaterial vorhanden war oder die Messung aus unbekanntem Gründen technisch nicht ordnungsgemäß funktioniert hat, gibt es Abweichungen von der Anzahl der gemessenen Proben pro Patient. Bei den im Folgenden angegebenen Werten handelt es sich sowohl bei den Proteinwerten, als auch bei den Antikörperwerten um Mittelwerte, die aus den 4-fach gemessenen Serumproben errechnet wurden.

Wie in den folgenden Abbildungen darstellt, zeigten die Verläufe der Hsp70-Protein Messungen ein heterogenes Muster auf.

In Abbildung 20 sind die Verläufe der gemessenen Proteinmittelwerte (pg/ml) geordnet nach Patient (1-52) dargestellt. Der Zeitverlauf auf der x-Achse ist in Tagen vor beziehungsweise nach Stammzelltransplantation eingeteilt und ist vorliegend auf 1000 Tage als Maximum festgelegt. Der Zeitpunkt der Stammzelltransplantation ist mit einer roten gestrichelten senkrechten Linie in der jeweiligen Patientengraphik markiert.

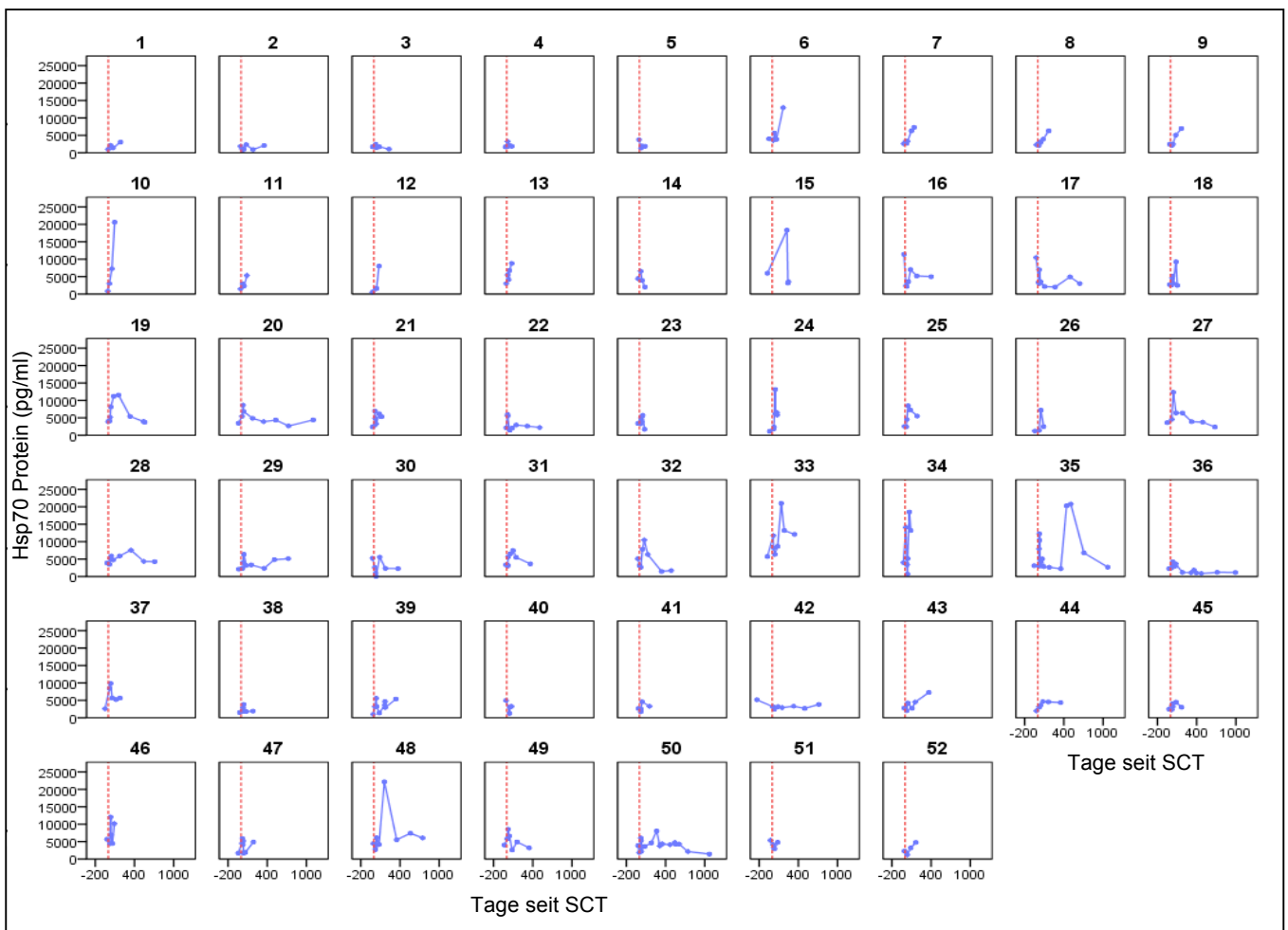


Abbildung 20: Gesamtverläufe der Hsp70-Protein Messungen (pg/ml) für Patienten 1-52 als Übersicht. Zeitangabe in Tagen seit SCT (= Stammzelltransplantation)

In Abbildung 21 sind in einem Zeitraum von 200 Tagen dargestellt die Hsp70-Protein-Verläufe aller Patienten dargestellt. In diesem Zeitraum erfolgten die Blutentnahmen der Serumproben regelmäßig.

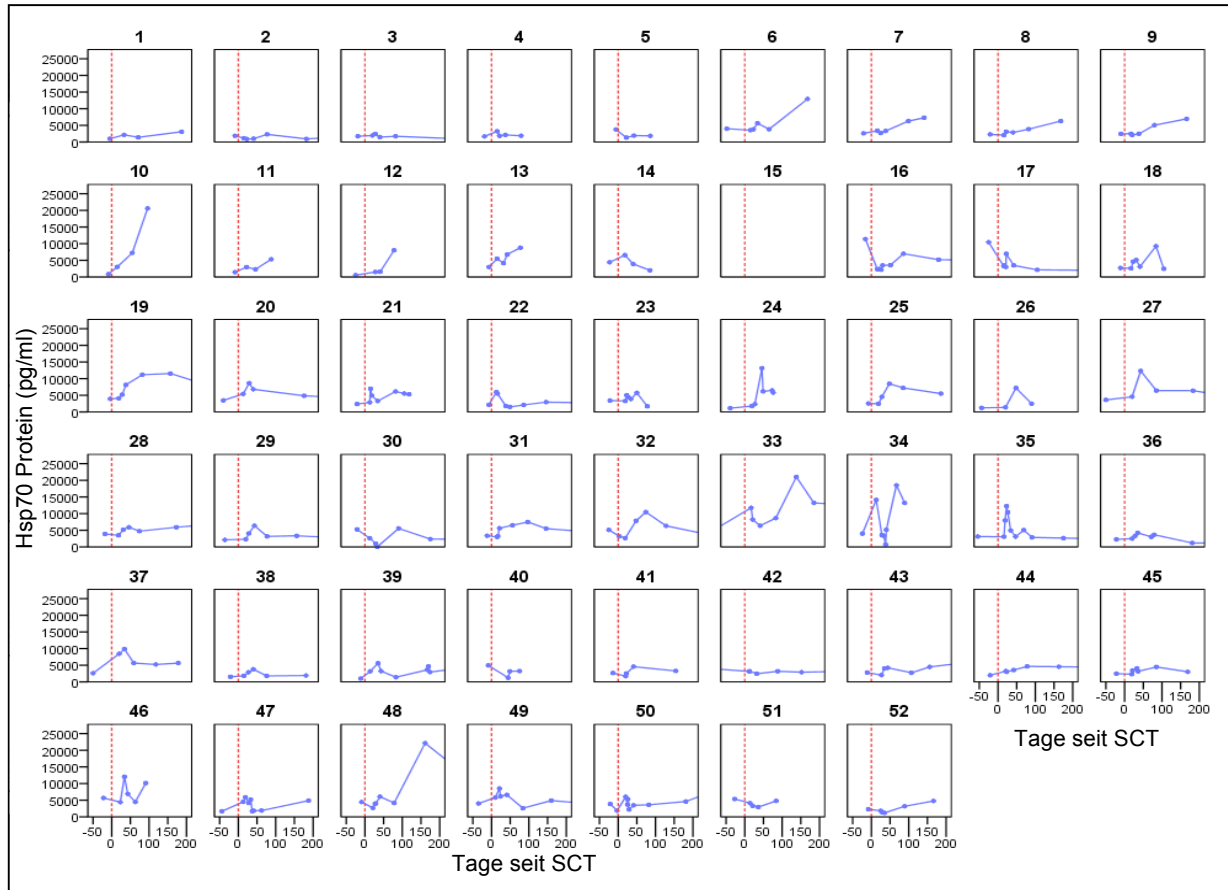


Abbildung 21: Gesamtverläufe der Hsp70-Protein Messungen (pg/ml) für Patienten 1-52 als Übersicht. Zeitangabe in Tagen seit SCT (= Stammzelltransplantation)

Auch in diesem Zeitfenster stellen sich die Verläufe der Hsp70-Protein Mittelwerte heterogen dar. Einige Verläufe, wie z.B. die der Patienten 1-5, sowie 42-45 weisen hinsichtlich der Hsp70-Protein-Werte einen eher gleichbleibenden Verlauf auf, der keine auffälligen Peaks (Spitzen) aufweist. Die Patienten 42-45 weisen im Vergleich zu 1-5 ein höheres Niveau der Hsp70-Proteinwerte auf.

Die Mehrzahl der zeitlichen Verläufe zeigen einen Anstieg in den Hsp70-Werten. Die Patientengruppen 6-13 und 50-52 weisen diese Tendenz auf.

Die Steigung in den Hsp70-Protein-Werten kann langsam (flacher Verlauf) z.B. Patient 8 oder schnell (steiler Verlauf) z.B. Patient 10 erfolgen.

Neben den eher konstanten und im Verlauf ansteigenden Verläufen weisen einige der Patienten höhere Spitzenwerte (Peaks) als andere auf. Die Patienten 16-49 weisen mehrere hohe Spitzen im Verlauf auf. Beispielsweise liegt bei Patient 26 ein eher geringerer Peak zu Beginn des zeitlichen Verlaufs vor, wohingegen beispielsweise bei Patient 43 zwei eher hohe Peaks vorliegen und zum Beispiel Patient 48 einen hohen Peak gegen Ende des zeitlichen Verlaufs vorweist.

Zusammenfassend sind die Verläufe als heterogen zu bezeichnen, jedoch lassen sich innerhalb der Gesamtübersicht kleinere Gruppen von Patienten abgrenzen, dessen Verläufe ähnlich erscheinen. Die vorliegenden Patientenverläufe anhand der Grafik könnten in eine „konstante“, eine „tendenziell ansteigende“ und eine sich durch „peaks“ auszeichnende Gruppierung aufteilen.

Um die Messungen zu quantifizieren ist es wichtig zu überblicken, in welchen Messbereichen sich die gemessenen Hsp70-Protein und Antikörperwerte bewegen. Hierbei ist es von Interesse, die Veränderung der Werte vor und nach Stammzelltransplantation genauer zu betrachten. In Tabelle 15 sind die Veränderungen dieser Werte dargestellt: 1 = vor Stammzelltransplantation, 2 = nach Stammzelltransplantation. Aufgrund der relativ großen Schwankungen wurde der Medianwert für die Darstellung ausgewählt.

Erhebung		N	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
		Gültig						25	75
value protein (mean pg/ml)	1	52	3333	2753	2080	534	11383	2013	4014
	2	52	3799	3016	3164	1117	18325	2088	4123
value antibody (mean ng/ml)	1	52	115	83	120	2	612	33	150
	2	52	84	65	81	9	525	39	106

Tabelle 15: Hsp70 Protein Mittelwerte (pg/ml) und Hsp70 Antikörper Mittelwerte (ng/ml), Median, Standardabweichung, Range und Perzentilen für alle Untersuchten Patienten zusammengefasst. 1 = vor Stammzelltransplantation, 2 = nach Stammzelltransplantation.

Die Hsp70-Protein-Werte liegen im Median vor Stammzelltransplantation (SCT) bei 2753 pg/ml und steigen bis zur ersten Messung nach SCT auf 3016 pg/ml an. In einem von Kathrin Hube gemessenen Kollektiv gesunder Spender (n = 20), das als Vergleichskollektiv herangezogen wurde, belaufen sich die Werte der Hsp70-Proteins im Mittel auf 2579 pg/ml, der Median beträgt 2624 pg/ml. Der Median im Vergleich ist in Abbildung 22 dargestellt.

Im Vergleich zu den gesunden Spendern sind die Hsp70-Protein-Serumwerte bei Leukämiepatienten und Patienten mit anderen hämatologischen Erkrankungen erhöht.

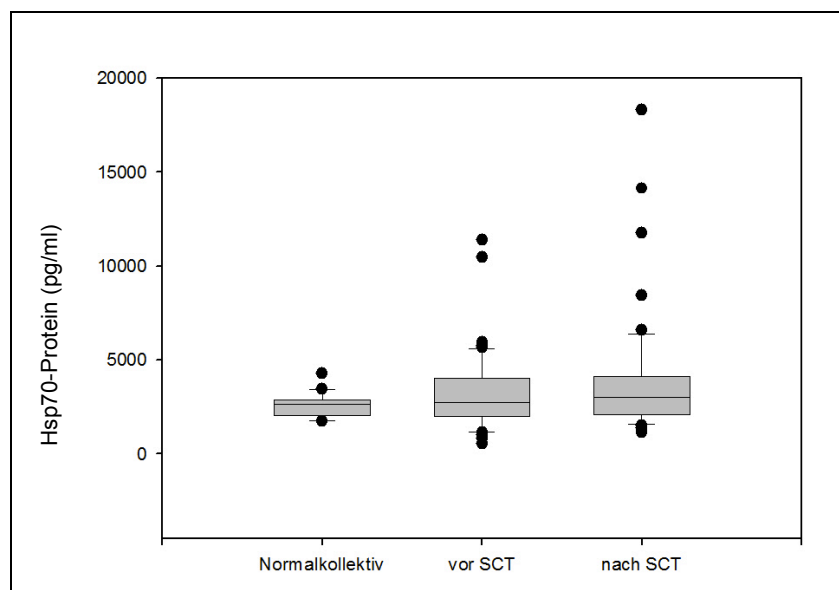


Abbildung 22: Hsp70-Protein (pg/ml) Normalkollektiv, vor und nach SCT

Eine erste Unterteilung der gemessenen Hsp70-Protein-Werte erfolgte in Bezug auf das Geschlecht. Es ließ sich feststellen, wie in Abbildung 23 dargestellt, dass die Hsp70-Protein-Werte der Männer tendenziell etwas höhere Messwerte aufwiesen, als die der weiblichen Patienten. Die weiblichen Patienten wurden mit 1 und die Männer mit 2 bezeichnet.

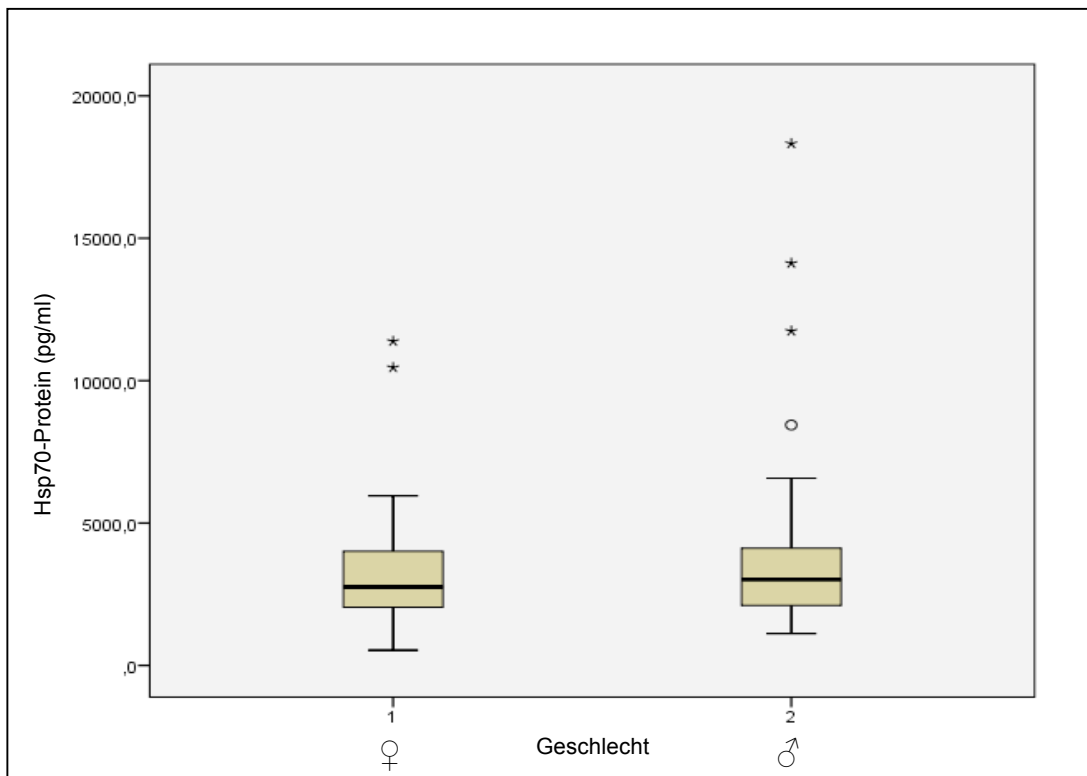


Abbildung 23: Hsp70-Protein (pg/ml) Gesamtverteilung aufgeteilt nach Geschlecht:

1 = weiblich, 2 = männlich

Des Weiteren wurden die gemessenen Hsp70-Protein Mittelwerte nach Geschlecht und Zeitpunkt (vor und nach SCT) aufgeteilt, um potentielle Unterschiede zwischen Männern und Frauen feststellen zu können. In Abbildung 24 wurden die Frauen mit f bezeichnet und die Gruppe der Männer mit m dargestellt. Die blauen ausgefüllten Boxen (1) stellen die Messung vor SCT und die grünen Boxen (2) stellen die erste Messung nach SCT dar.

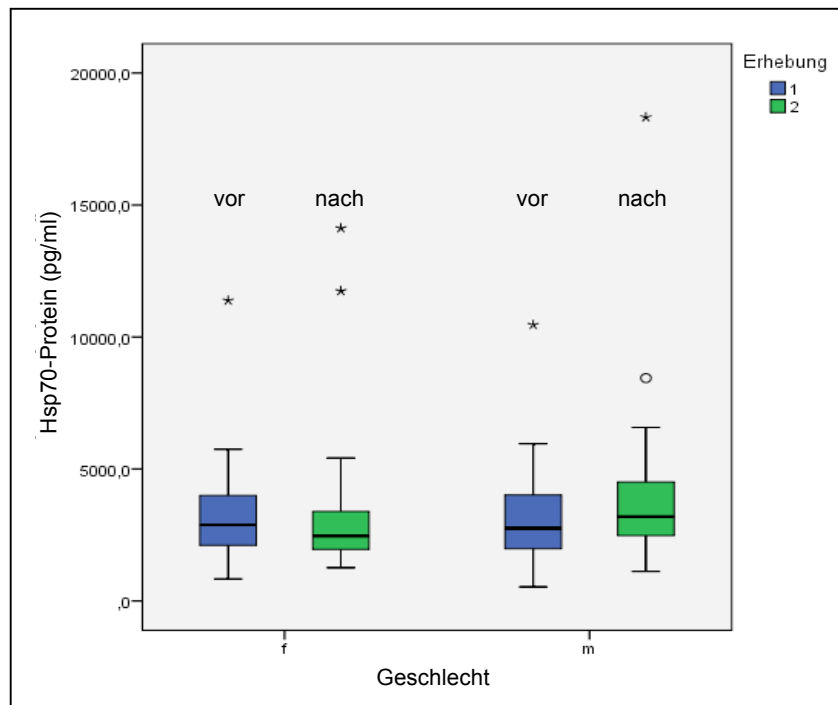


Abbildung 24: Hsp70-Protein (pg/ml) jeweils vor (1, blau) und nach (2, grün) Stammzelltransplantation (SCT); nach Geschlecht f (= female, weiblich) und m (= male, männlich) aufgeteilt

Der Hsp70-Protein Mittelwert ist in der Gruppe der Frauen leicht abfallend, betrachtet man den Median, fällt dieser von 2884 pg/ml vor SCT auf 2463 pg/ml nach SCT. Bei den männlichen Patienten steigt der Hsp70-Protein Mittelwert von 2753 pg/ml vor SCT auf 3196 pg/ml nach SCT. In Tabelle 16 sind die Zahlenwerte aufgeführt. Zu beachten ist, dass die Werte eine hohe Standardabweichung aufweisen. Würde man den Mittelwert betrachten, steigt dieser auch bei den weiblichen Patienten von 3404 pg/ml vor SCT auf 3592 pg/ml nach SCT an.

Gender			N Gültig	Mittelwert	Median	Standardab- weichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
									25	75
value protein (mean pg/ml)	f	1	22	3404	2884	2305	834	11383	2012	4239
		2	22	3592	2463	3203	1262	14122	1928	3571
	m	1	30	3282	2753	1937	534	10460	1953	4118
		2	30	3951	3196	3182	1117	18325	2432	4521
value antibody (mean ng/ml)	f	1	22	112	98	82	5	305	44	161
		2	22	70	60	39	9	167	45	96
	m	1	30	117	79	142	2	612	32	127
		2	30	94	71	101	9	525	35	112

Tabelle 16: Hsp70-Protein (pg/ml), Hsp70-Antikörper (ng/ml) Mittelwerte, unterteilt nach Geschlecht (gender): f = weiblich m = männlich. 1 = Messung vor SCT, 2 = Messung nach SCT. Mittelwerte, Median, Standardabweichung, Range und Perzentilen jeweils von Messung 1 und 2 aller Patienten

Betrachtet man die Hsp70-Antikörper Medianwerte kann festgestellt werden, dass die Werte hier, im Gegensatz zu den Proteinwerten, vor SCT höher liegen und nach SCT abfallen. Wie aus Tabelle 16 zu entnehmen ist, liegen die Werte vor SCT bei 83 ng/ml im Median, nach SCT fällt der Medianwert auf 65 ng/ml ab. Der Median des Normalkollektivs beträgt 46 ng/ml.

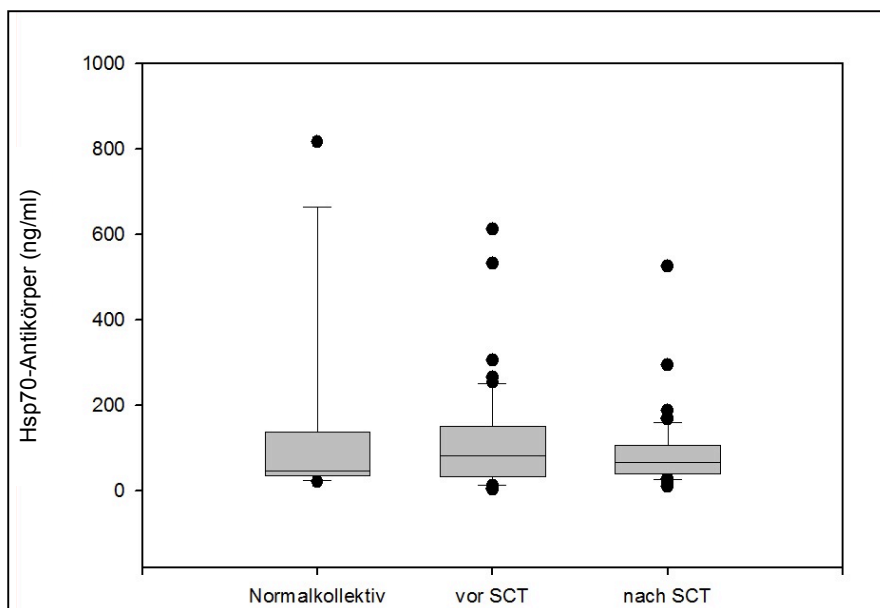


Abbildung 25: Hsp70-Antikörper (ng/ml) Normalkollektiv, vor SCT und nach SCT

In Abbildung 25 ist der tendenziell geringere Median des Normalkollektivs (schwarze Linie in Box) erkennbar.

Die Mittelwerte des Hsp70 Antikörpers im untersuchten Kollektiv liegen bei 115 ng/ml vor SCT und 84 ng/ml nach SCT. Der Mittelwert im Normalkollektiv beträgt 139 ng/ml. Im Vergleich zum vorliegenden Normalkollektiv (n = 19) liegen diese Mittelwerte deutlich darunter. Da die immunologische B-Zell-Antwort eng mit der Hsp70 Antikörper-Produktion zusammenhängt, war zu erwarten, dass der Hsp70 Antikörper-Wert unter Konditionierungs- beziehungsweise Transplantationsbedingungen erniedrigt ist. Daher sind die im Kollektiv gemessenen Werte auch hier mit den im Normalkollektiv gemessenen Werten vergleichbar.

Die Auswertung der Messungen des Hsp70-Antikörpers (ng/ml) ergab Folgendes: Die gemessenen Werte der Frauen sind tendenziell höher als die der Männer und erstrecken sich über einen größeren Messbereich (Range). Die männlichen Patienten hingegen weisen im Vergleich niedrigere Werte auf und bewegen sich zudem in einer kleineren Range. Siehe Abbildung 26.

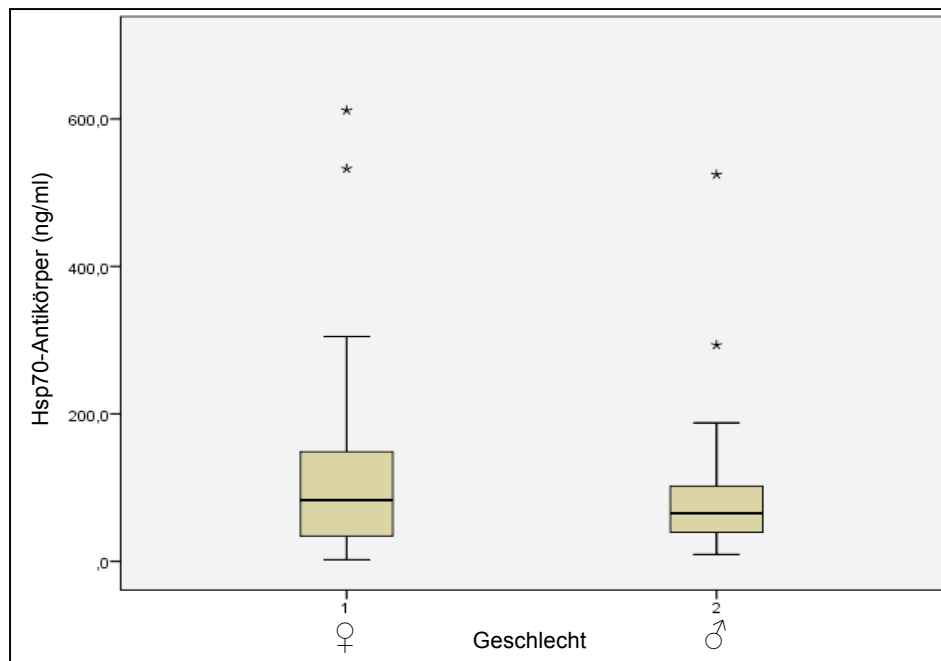


Abbildung 26: Hsp70-Antikörper (ng/ml) Gesamtverteilung aufgeteilt nach Geschlecht:

1 = weiblich, 2 = männlich

Die weitere zeitliche Aufteilung, in 1 = vor SCT und 2 = nach SCT, ergibt hier bei den weiblichen Patienten (f) eine fallende Tendenz, wenn die Werte vor und nach SCT verglichen werden. Wie in Abbildung 27 dargestellt, ergibt die Gruppe der Männer (m) eher gleichbleibende, allenfalls leicht abfallende Werte der Hsp70-Antikörper-Werte im Vergleich vor und nach SCT.

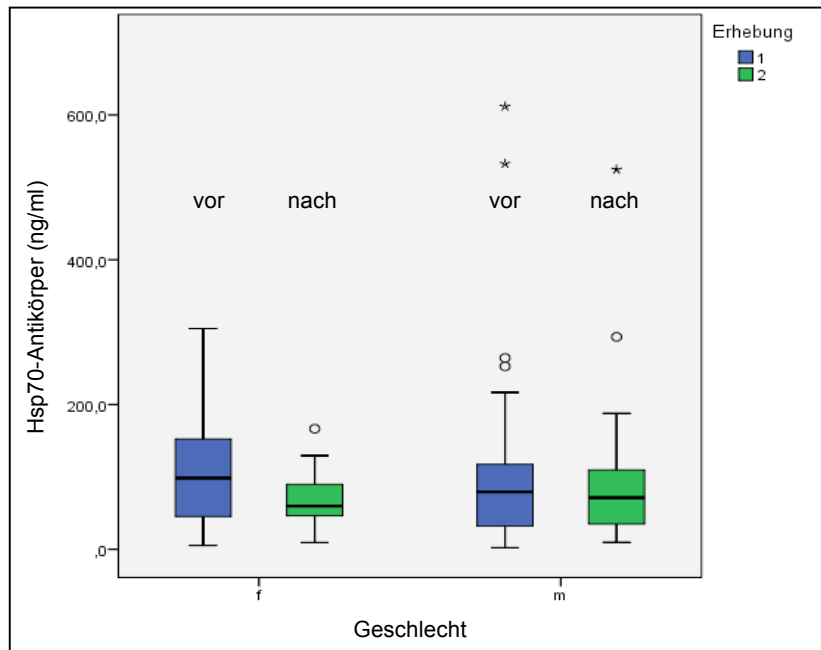


Abbildung 27: Hsp70-Antikörper (ng/ml) jeweils vor (1, blau) und nach (2, grün) SCT, sowie aufgeteilt nach Geschlecht f (= female, weiblich) und m (= male, männlich)

Der Gesamtverlauf aller Hsp70-Protein Werte zeigt in der Übersichtsdarstellung (Abbildung 28) vor der SCT (in der Graphik mit einer vertikalen blauen Linie dargestellt) einen leichten Abfall (rote Linie), nach der SCT steigen die Werte leicht an. Im Gesamtverlauf wirkt es in Abbildung 28 als ob die Werte im weiteren Verlauf tendenziell eher abfallen. Als schwarze Kreise sind die einzelnen Messungen (Mittelwerte) aller 52 Patienten dargestellt, die rote Linie repräsentiert die Trendlinie im Verlauf.

In Abbildung 29 sind die ersten 100 Tage nach SCT (d) vergrößert dargestellt um den Verlauf besser darzustellen. Hier zeigt sich im Verlauf ein Anstieg in 2 Stufen: der erste kleine Peak befindet sich zeitlich ca. bei d+10 und der zweite bei ca. d+50.

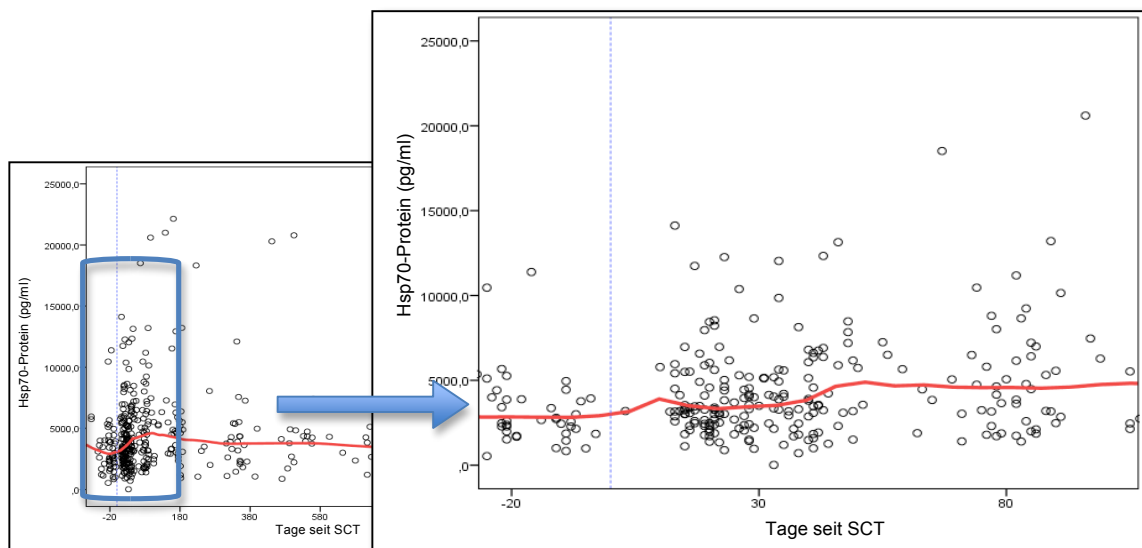


Abbildung 28 und Abbildung 29: Hsp70-Protein (pg/ml) aller 52 Patienten (schwarze Bläschen) in Tagen seit SCT (= Stammzelltransplantation) im Gesamtverlauf und die ersten 100 Tage vergrößert dargestellt (rechte Abbildung), vertikale Linie bei 0 = Zeitpunkt der SCT; Trendlinie (rote Linie)

Die Hsp70-Antikörper-Werte betreffend bestätigt die folgende Abbildung 30 die bereits genannten Ergebnisse: Nach SCT (hier ebenfalls als vertikale Linie bei 0) sinken die Werte insgesamt ab. Dann verhalten sich die Werte konstant und stagnieren tendenziell auf gleichbleibendem Niveau.

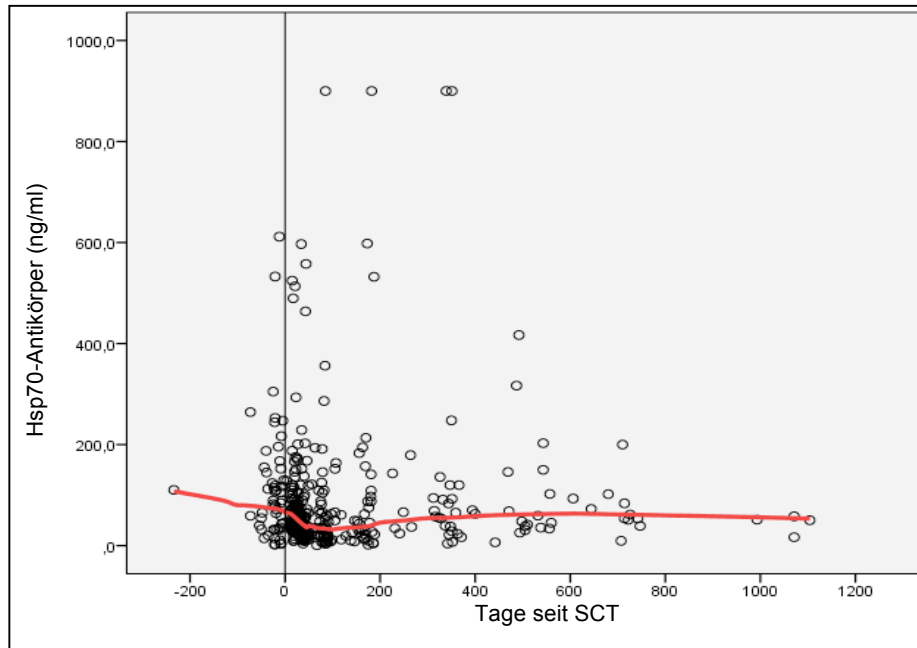


Abbildung 30: Hsp70-Antikörper Mittelwerte (ng/ml) aller 52 Patienten (schwarze Bläschen) in Tagen seit SCT (= Stammzelltransplantation) im Gesamtverlauf, vertikale Linie bei 0 = Zeitpunkt der SCT; Trendlinie (rote Linie)

3.2.3 Hsp70-Protein und GvHD

Im Folgenden werden nur die Werte des Hsp70-Proteins aufgeführt, da die Hsp70-Antikörper Werte keine signifikanten Unterschiede aufweisen.

Die Erfassung der Daten bezogen auf eine GvHD ließ sich bezogen auf die Schwere der Erkrankung und die Organspezifität betreffend nur unvollständig aus den klinischen Dokumentationen entnehmen. Die Verteilung der GvHD im Kollektiv ist im folgenden Diagramm dargestellt. Der Erkrankungsmodus wurde jeweils am Tag der Probeentnahme erfasst. Auf Grund des Entnahmezeitraumes ab 2003 ist diese nicht ausschließlich auf Grundlage der aktuellen NIH-Klassifikation erfolgt. Im Kollektiv von insgesamt 52 untersuchten Patienten, wiesen 10 Patienten (19%) keine GvHD auf, 25 Patienten (48%) erlitten eine akute GvHD (aGvHD), weitere 10 Patienten (19%) erkrankten zusätzlich zu einer aGvHD an einer chronischen GvHD (cGvHD) und 7 Patienten (14%) entwickelten eine cGvHD ohne vorausgehende aGvHD. Auf Grund teilweise unvollständiger Dokumentation konnte eine Auswertung hinsichtlich der von GvHD betroffenen Organe nicht erfolgen.

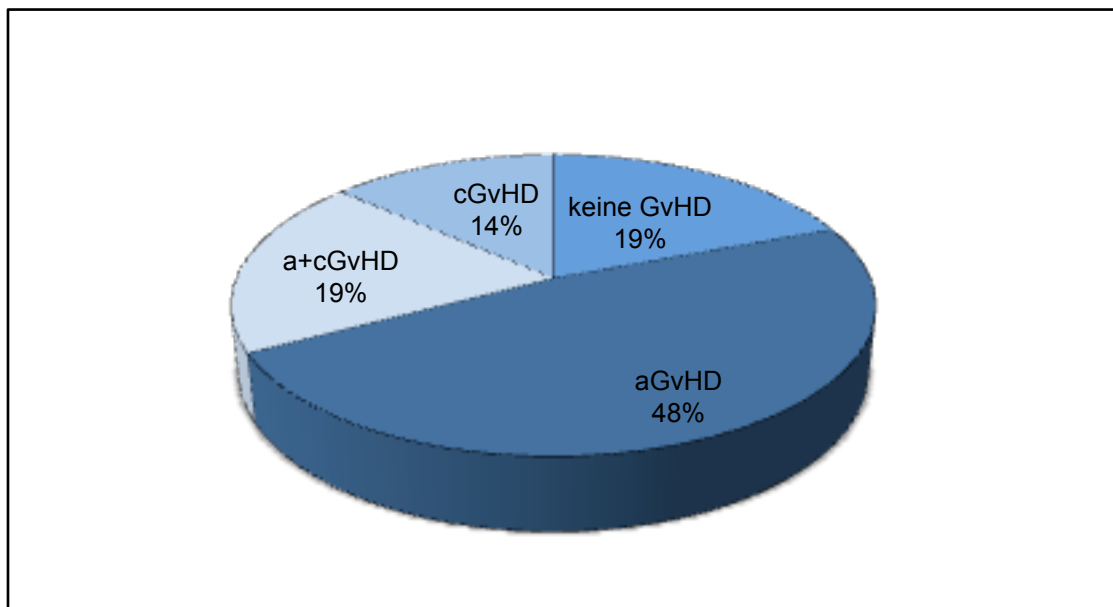


Abbildung 31: Verteilung nach Art der GvHD Erkrankungen im Kollektiv

Berechnet wurde nun die vorhersagbare Wahrscheinlichkeit für eine GvHD zum Zeitpunkt der Serumprobeentnahme. In Abbildung 32 ist diese Wahrscheinlich-

keit (in Prozent) auf der y-Achse aufgeführt. Die Mittelwerte des Hsp70-Protein-Wertes wurden zwecks übersichtlicherer Darstellung durch 1000 geteilt und sind auf der x-Achse dargestellt. Das Patientenalter bei SCT ist anhand der Größe der Kreise erkennbar, je größer die Kreise, desto älter der Patient (siehe Legende Abbildung 32).

Die Einteilung nach Geschlecht erfolgte anhand der Farben: f = blau = weiblich, m = grün = männlich.

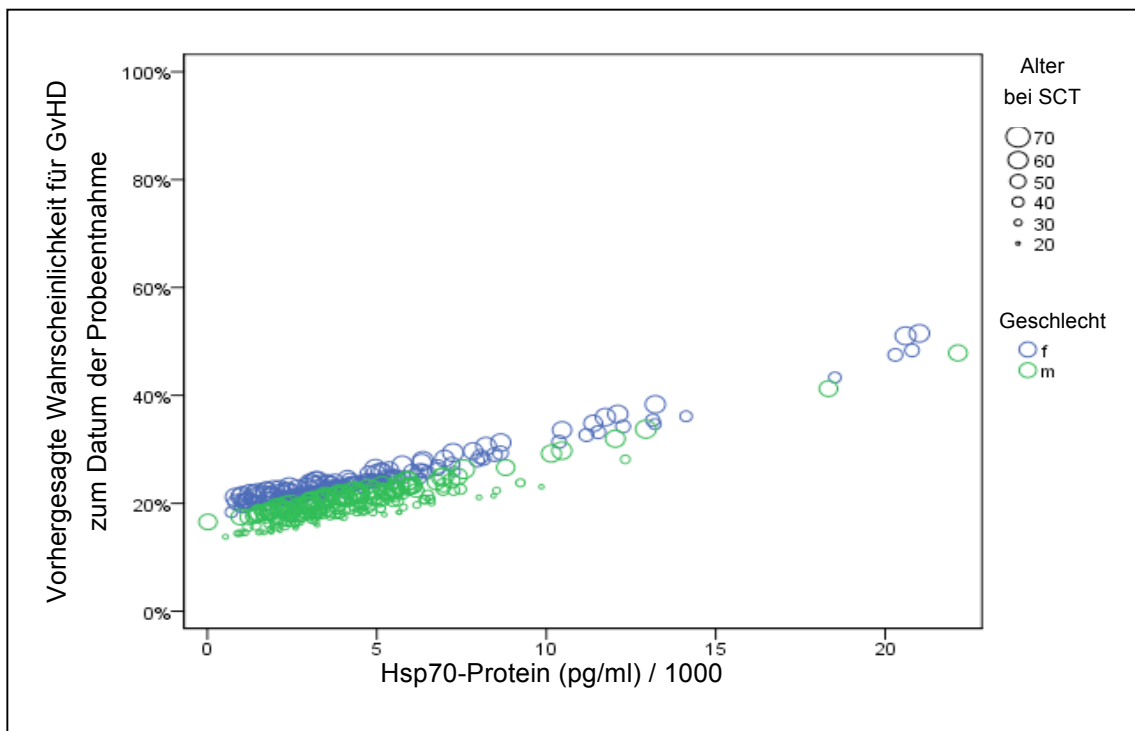


Abbildung 32: Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit eine GvHD zum Zeitpunkt der Probeentnahme und den gemessenen Hsp70-Protein Werten ((pg/ml)/1000) mit einbezogenem Alter zum Zeitpunkt der SCT und Geschlecht.

Es zeigt sich anhand Abbildung 32 und den dazugehörigen Berechnungen ein signifikanter Zusammenhang (p -Wert: 0.016) zwischen den gemessenen Hsp70 Protein-Werten ((pg/ml)/1000) und dem Risiko eine GvHD zu entwickeln. Beispielsweise ist das Risiko einer GvHD bei einem Hsp70-Protein-Werten von 10 000 pg/ml bei ca. 30%.

Je größer die Kreise in der Abbildung dargestellt sind, desto höher das Alter des Patienten. Tendenziell weisen ältere Patienten höhere Hsp70-Protein-Werte, sowie ein höheres Risiko eine GvHD zu entwickeln auf. Frauen (blau dargestellt) zeigen hier tendenziell ein erhöhtes Risiko an einer GvHD zu erkranken. Männer (grün dargestellt) weisen tendenziell ein geringeres Risiko für die Entwicklung einer GvHD auf.

Die meisten berechneten Wahrscheinlichkeitsangaben auf eine GvHD bezogen befinden sich im Bereich bis 50%, daher lassen sich oben genannte Fakten in Abbildung 33 noch detaillierter darstellen.

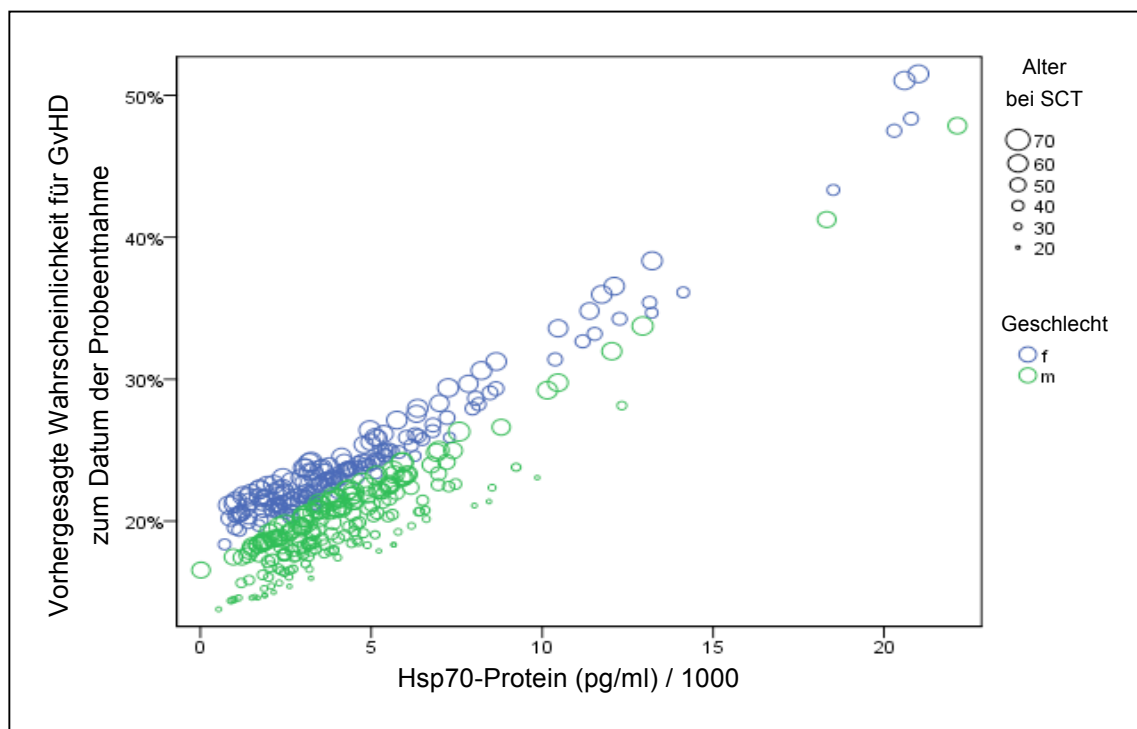


Abbildung 33: Zeitpunkt der Probeentnahme und den gemessenen Hsp70-Protein Werten ((pg/ml)/1000) mit einbezogenem Alter zum Zeitpunkt der SCT und nach Geschlecht.

Um die Beschreibung der Abbildungen 32 und 33 quantitativ darzustellen wurde die Berechnungsgrundlage des zugrundeliegenden statistischen Modells analysiert.

Parameter	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	95% Wald-Konfidenzintervall		Hypothesentest			Odds Ratio	95% Wald-Konfidenzintervall für Odds Ratio	
			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi-Quadrat	df	Sig.		Unterer Wert	Oberer Wert
(Konstanter Term)	-2,069	,7386	-3,517	-,621	7,847	1	,005	,126	,030	,537
[gender=f]	,192	,3969	-,586	,970	,233	1	,629	1,211	,557	2,637
[gender=m]	0*							1		
ageTx	,006	,0154	-,022	,038	,276	1	,599	1,008	,978	1,039
value protein mean pg/ml_1000	,069	,0266	,013	,125	5,772	1	,016	1,071	1,013	1,133

Tabelle 17: Berechnungsgrundlagen, Modellberechnung

Wie Tabelle 17 zu entnehmen (rot markierte Zahlen) ergibt sich pro 1000 Einheiten des Proteinwertes eine Steigerung des Risikos an einer GvHD zu erkranken um 7% (95% Konfidenzintervall: 1,3-13%). Dies ist signifikant bei einem P-Wert von 0,016. Des Weiteren kann festgehalten werden, dass mit dem Alter des Patienten das Risiko an einer GvHD zu erkranken tendenziell steigt. Im vorliegenden untersuchten Kollektiv haben Frauen tendenziell ein 20% höheres Risiko an einer GvHD zu erkranken. Insgesamt gesehen steigt das Risiko, eine GvHD zu entwickeln, im Verlauf tendenziell um 0,8% pro Jahr an.

Weder die akute GvHD, noch die chronische GvHD ergab einen signifikanten Einzelzusammenhang mit den gemessenen Hsp70-Serum-Protein-Werten.

Allerdings zeigte sich ein signifikanter alters- (p -Wert: 0,037) und geschlechtsspezifischer (p -Wert: 0,014) Zusammenhang im Hinblick auf das Risiko eine chronische GvHD zu entwickeln, siehe Abbildung 34.

Das Risiko eine chronische GvHD zu entwickeln ist im untersuchten Kollektiv bei Männern im Vergleich zu Frauen höher. Dies ist abzugrenzen vom Gesamtrisiko eine GvHD zu entwickeln (akut und chronisch).

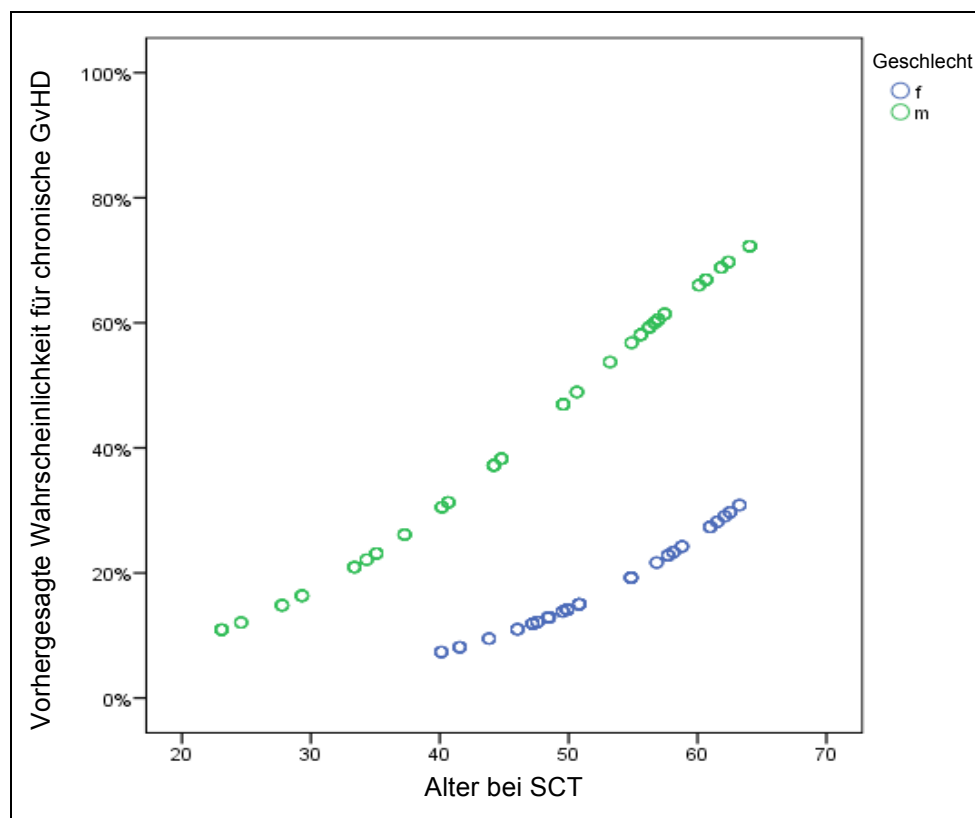


Abbildung 34: Vorhergesagte Wahrscheinlichkeit für eine chronische GvHD in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

3.2.4 Gesamtüberleben der Patienten

Mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven wurde das Gesamtüberleben und die Überlebensraten der Patienten im untersuchten Kollektiv dargestellt.

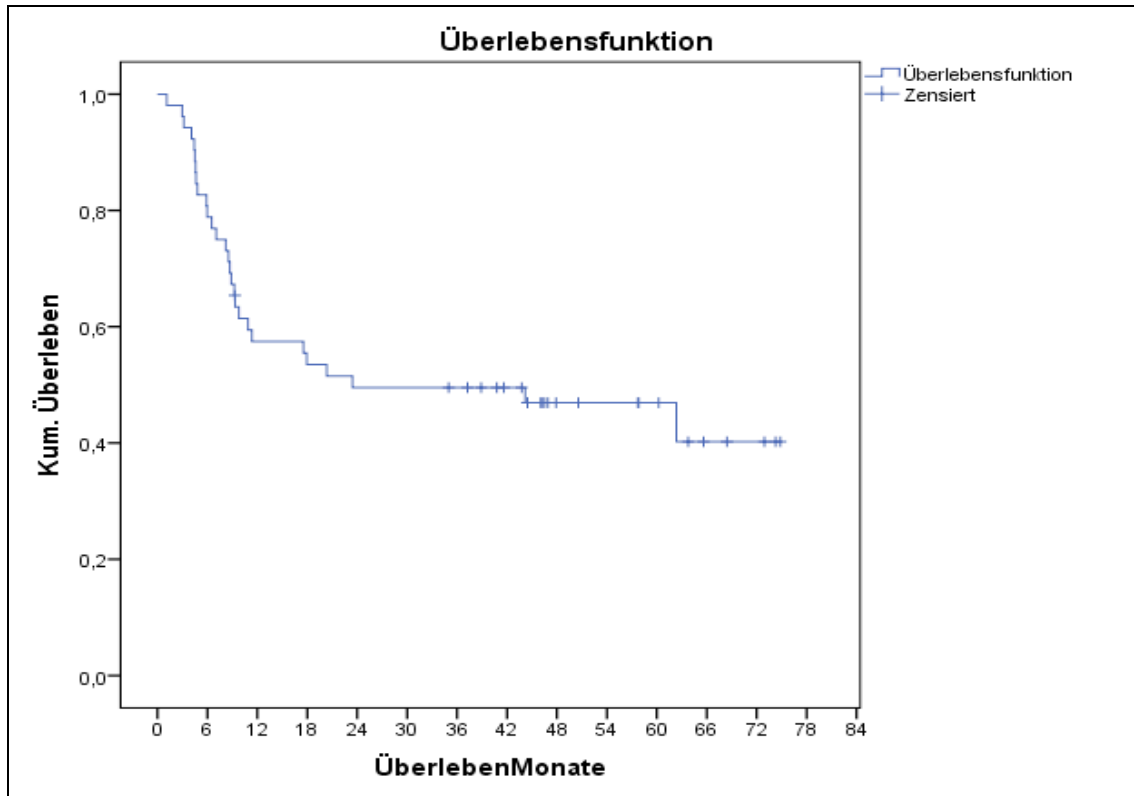


Abbildung 35: Kumulatives Gesamtüberleben (Monaten) dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve

Die folgenden Überlebensraten ergeben sich aus Abbildung 35 und den dazugehörigen Berechnungsmodellen: Die 1-Jahres-Überlebensrate beträgt 58% +/- 6,9%, wohingegen die 2-Jahres-Überlebensrate 50% +/- 7% beträgt, betrachtet man die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt diese 40% +/- 8,7%.

Die Aufteilung der Überlebensfunktionen nach Geschlecht zeigt Abbildung 36.

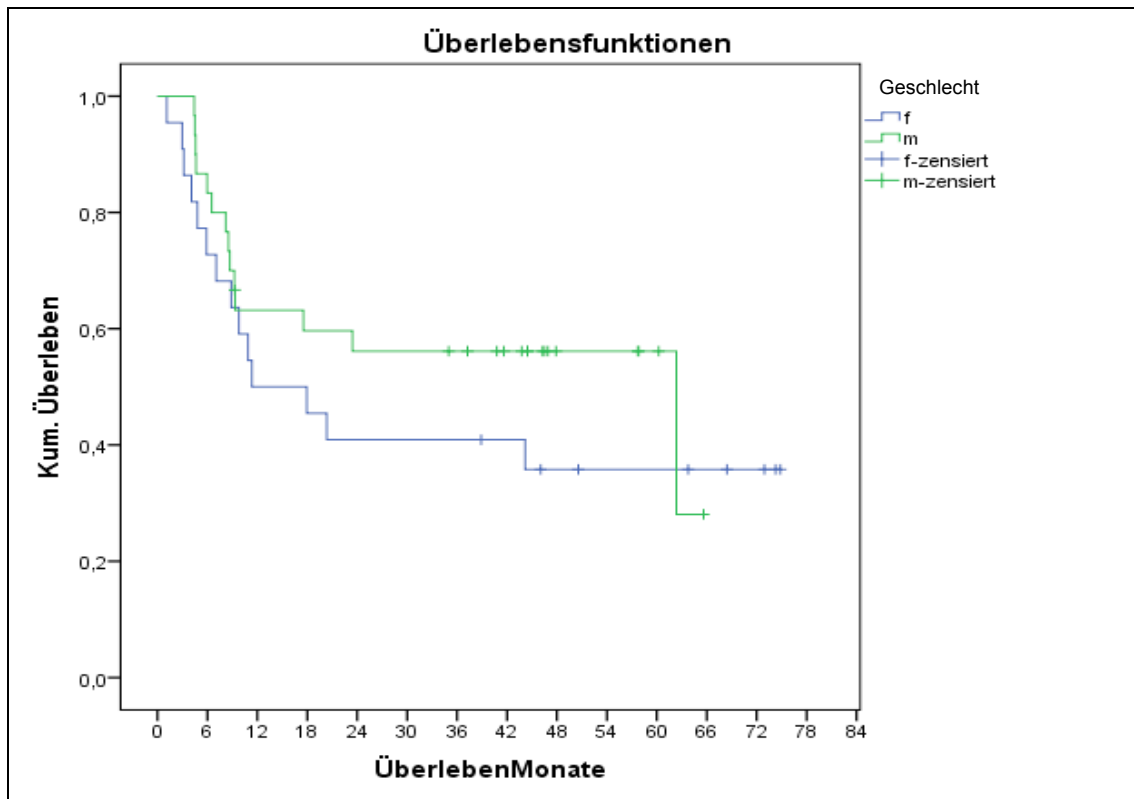


Abbildung 36: Kumulatives Überleben (in Monaten) nach Geschlecht aufgeteilt: f = blau = weiblich, m = grün = männlich

Das Langzeitüberleben betreffend, ist ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten erkennbar (siehe Abbildung 36).

Tendenziell haben männliche Patienten im vorhandenen Kollektiv eine bessere Langzeitüberlebensprognose als weibliche Patienten. Dies betrifft vor allem die ersten 60 Monate. Eine Signifikanz lässt sich aus den dargestellten Daten nicht berechnen.

4 Diskussion

4.1 Hsp70 ein Marker für GvHD

Das molekulare Chaperon Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) ist auf vielfältige Weise in zelluläre Prozesse involviert und kann durch endogene und exogene Stimuli induziert werden. Hsp70 wird eine duale Funktion zugeschrieben, je nach Lokalisation intra- oder extrazellulär werden einerseits protektive Eigenschaften und andererseits Funktionen, die das Immunsystem stimulieren beschrieben (Multhoff, 2007; Sherman, 2007).

Eine vermehrte intrazelluläre Hsp70-Expression konnte bereits in unterschiedlichen soliden Tumoren des Menschen nachgewiesen werden (Sherman, 2007). Oft korreliert die Expression von Hsp70 mit erhöhter Zellproliferation, Lymphknotenmetastasen, schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie und niedrigen Überlebensraten (Calderwood et al., 2006; Ciocca et al., 2005; Jaattela, 1999).

Die Zielsetzung meiner Doktorarbeit war es zu untersuchen, ob Hsp70 als potentieller Marker für GvHD in Frage kommen könnte. Konkret sollte gezeigt werden, ob ein Zusammenhang zwischen den mittels ELISA gemessenen Hsp70 Protein und Antikörper Werten und dem Risiko eine GvHD zu entwickeln besteht. Dafür wurden Hsp70 Protein und Antikörper in Serumproben von Patienten mittels ELISA gemessen, die daraus entstandenen Messwerte wurden ausgewertet und es wurde versucht ein Zusammenhang mit den klinisch erfassten Patientendaten nachzuweisen. Im Folgenden werden die Ergebnisse und Auswertungen der vorliegenden Arbeit anhand bereits vorliegender Literatur diskutiert.

In den entnommenen Serumproben von 52 Patienten wurden durch eine bereits etablierte Methode mittels ELISA die Serumlevels von Hsp70-Protein und Hsp70-Antikörper bestimmt. Das herangezogene Patientenkollektiv ist ausreichend repräsentativ im Vergleich zu allgemeinen epidemiologischen Daten. Im Kollektiv weisen 42% der Patienten eine AML auf, das entspricht abgesehen von der CLL die relativ gesehen am häufigsten vorkommt, im Wesentlichen auch dem Auftreten als häufigste akute Leukämie. Da chronische Leukämien

deutlich seltener mit einer SCT therapiert werden, ist das Vorkommen von AML (6%) und CLL (4%) im Kollektiv gut zu vereinbaren. Beim Universitätsklinikum Regensburg handelt es sich um ein Zentrum für hämatologische Erkrankungen, daher ist auch das Auftreten von ALL (17%) und NHL (22%) im Patientenkollektiv nicht ungewöhnlich. Das Alter der 52 Patienten im Kollektiv ist mit einem Median von 50,2 Jahren und der Aufteilung nach Geschlecht (weiblich 42,3% und männlich 57,7%) ausreichend repräsentativ. Auch die errechneten 5-Jahres-Überlebensraten von 40 +/-8,7% stimmen in etwa mit den 5-Jahres-Überlebensraten des Robert-Koch-Institutes (49-54%) von 2012 überein. Der Beobachtungszeitraum schließt ca. 4 Jahre (Juli 2003 bis August 2007) ein. Innerhalb dieser Zeit wurden jeweils vor SCT, dann regelmäßig 20, 30, 40 und 80 Tage nach SCT Serumproben entnommen. Erst ab ca. dem 90. Tag nach SCT wurden die Probeentnahmen unregelmäßiger. Trotz der eher geringen Anzahl an Patienten (n = 52) war es so möglich die entnommenen Serumproben jeweils n = 4 zu messen und die Verläufe, sowie die zugehörigen statistischen Berechnungen zuverlässig auszuwerten.

Zu Beginn der statistischen Auswertung wurden die Hsp70-Protein-Werte vor und nach SCT verglichen. Anhand des Medianwertes der gemessenen Hsp70 Protein-Werte ergibt sich ein Anstieg von 2753 pg/ml (vor SCT) auf 3016 pg/ml (nach SCT), dies würde für eine Beteiligung des Hsp70 im Rahmen der immunologischen Prozesse einer SCT sprechen. Der errechnete Median des Hsp70 Protein-Wertes in einem zur Verfügung gestellten Normalkollektiv beträgt 2624 pg/ml. Der Mittelwert des Hsp70-Protein-Wertes steigt von 3333 pg/ml (vor SCT) auf 3799 pg/ml (nach SCT) an. Im Vergleich dazu befindet sich der Hsp70 Protein-Mittelwert des herangezogenen Normalkollektivs bei 2579 pg/ml. Anhand dessen kann die Aussage getroffen werden, dass die im vorliegenden Kollektiv gemessenen Werte die des Normalkollektivs übersteigen. Nach Geschlecht aufgeteilt, ergeben die Hsp70-Protein-Werte der weiblichen Patienten im Kollektiv, betrachtet im Median, einen leichten Abfall im Vergleich der Werte vor und nach SCT (siehe Ergebnisteil). Es ist anzunehmen, dass sich dies durch die hohe Standardabweichung ergibt, da der Mittelwert, nur auf die Frauen bezogen ebenfalls von vor SCT auf nach SCT ansteigt. In der Literatur wird Stressproteinen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Transplantations-Immunität zugeschrieben (Duquesnoy, 1996). Die Beteiligung der Hitzeschockproteine an

stimulierenden und regulatorischen Vorgängen, sowohl auf proinflammatorische als auch auf immunregulatorische Zytokine, ist ebenfalls von großer Bedeutung (Bajramovic et al., 2000; Xie et al., 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die Aussage, dass Hsp70 an transplantationsbedingten immunologischen Vorgängen beteiligt ist.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass erhöhte intrazelluläre Hsp70-Werte in Tumorzellen sowohl einen Einfluss auf die Tumorbilogie, als auch auf die Therapieresistenz besitzen (Shu, 2008). Zusätzlich zum intrazellulär lokalisierten Hsp70 wurde bei vielen Tumorentitäten, nicht jedoch in gesundem Gewebe, eine Membranexpression von Hsp70 nachgewiesen (Multhoff et al., 1995; Multhoff et al., 2011). Membrangebundenes Hsp70 kann in unterschiedlicher Weise mit dem Immunsystem interagieren (Didelot et al., 2007; Shu, 2008). Studien zeigen häufig eine Überexpression von Hitzeschockproteinen in menschlichen Tumoren (Sedlackova et al., 2011). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Patienten mit de novo AML mit ungünstiger oder mittelmäßiger zytogentischer Prognose häufig eine Membranpositivität für Hsp70 aufweisen (Gehrmann et al., 2003). Des Weiteren wurde in Studien die Expression des stress-induzierten Hsp70 auf Leukämiezellen von Patienten mit CML, T-Zell ALL und AML mit unterschiedlichen FAB-Typen nachgewiesen. Unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits 1997 eine vermehrte Expression von Hsp70 auf der Zelloberfläche von leukämischen Blasten (Multhoff, 1997). Weitere Untersuchungen ergaben eine sehr viel stärkere Hsp70 Membranexpression auf Leukämiezellen nach Stresseinwirkung wie Hitze, Bestrahlung oder Chemotherapie (Gehrmann et al., 2008) und auf Zellen, welche von Patienten mit Rezidiv oder persistierender Erkrankung entnommen wurden (Steiner et al., 2006). Wie auch im Falle solider Tumoren konnte auf leukämischen Blasten von Patienten mit AML und ALL eine vermehrte Membranpositivität für Hsp70 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu soliden Tumoren exprimieren diese Leukämiezellen jedoch zusätzlich den negativen regulatorischen Ligand HLA-E (Gross et al., 2008). Es wurde, wie erwähnt, also bereits in mehreren Studien ein Zusammenhang von malignen hämatologischen Erkrankungen und der Membranpositivität des Hitzeschockprotein70 nachgewiesen. Diese bisherigen Erkenntnisse sind, betreffend die Hsp70-Protein Werte, mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbar.

Die Mittelwerte des Hsp70 Antikörpers im untersuchten Kollektiv hingegen liegen bei 115 ng/ml vor SCT und 84 ng/ml nach SCT. Der Mittelwert im Normalkollektiv beträgt 139 ng/ml. Im Vergleich zum vorliegenden Normalkollektiv (n = 19) liegen diese Mittelwerte deutlich darunter. Da die immunologische B-Zell-Antwort eng mit dem Hsp-70 Antikörper zusammenhängt, war zu erwarten, dass der Hsp-70 Antikörper unter Konditionierungs- beziehungsweise Transplantationsbedingungen erniedrigt ist. Daher sind die im Kollektiv gemessenen Werte auch hier mit den im Normalkollektiv gemessenen Werten vereinbar.

In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte eine erhöhte Produktion von Antikörpern gegen Hsp70 im Serum gefunden werden, welches die akute letale GvHD in Ratten induziert begleitet. Diese erhöhten Antikörper-Level gehen im Modell mit dem Beginn der ersten Erkrankungsanzeichen und -symptome im Rahmen der Entstehung einer GvHD einher (Goral et al., 1995). Goral konnte erneut in Form eines Ratten-Modells erhöhte Level von Hsp70 in Lymphknoten und Milzzellen der Ratten nachweisen. Aufgrund dieser erhöhten Hsp70-Level wird ein Mitwirken von Hsp70 im Rahmen der Pathophysiologie der GvHD vermutet (Goral et al., 1998). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass im Blut von Patienten nach allogener peripherer Blutstammzelltransplantation erhöhte Level von Anti-Hsp70-Antikörpern auftreten. Dies impliziert laut den Autoren dass die Entwicklung einer akuten und/oder chronischen GvHD im Menschen mit erhöhten Anti-Hsp70-Antikörpern einhergeht (Goral et al., 2002). Diese Aussagen lassen sich nicht mit den Ergebnissen im Rahmen meiner Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen vereinbaren. Die statistische Auswertung unsererseits ergab auch im Zusammenhang mit GvHD, betreffend die gemessenen Hsp70-Antikörper-Werte, keine Signifikanzen.

Anhand statistischer Modelle wurde darauffolgend die vorhersagbare Wahrscheinlichkeit eine GvHD zum Zeitpunkt der jeweiligen Probeentnahme berechnet. Für die Hsp70-Antikörper Werte wies dies, wie bereits erwähnt, keine Signifikanzen auf. Ganz im Gegensatz dazu zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit einer GvHD zum Zeitpunkt der Probeentnahme und den gemessenen Hsp70-Protein Werten. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der SCT und das Geschlecht wurden in das statistische Modell wurden miteinbezogen. Die vorhersagbare Wahrscheinlichkeit eine GvHD

zu entwickeln, steigt mit den gemessenen Hsp70 Protein Werten einhergehend. Es handelt sich hierbei um einen signifikanten Zusammenhang (p-Wert: 0,016). Pro 1000 Einheiten des Hsp70-Protein-Wertes steigt die vorhersagbare Wahrscheinlichkeit eine GvHD zu entwickeln um 7%. Mithilfe eines menschlichen Haut-Explantationsmodells konnte Jarvis in Untersuchungen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen erhöhter Hsp70-Expression und GvHD zeigen. In der Studie dieser Arbeitsgruppe konnte die Hsp70 Expression als Voraussage-Wert verwendet werden, sowohl für eine aGvHD als auch für die Inzidenz einer cGvHD (Jarvis et al., 2003). In unseren Untersuchungen zeigte sich, weder für die akute noch für die chronische GvHD, ein signifikanter Einzelzusammenhang.

Tendenziell weisen im gemessenen Kollektiv ältere Patienten auch höhere Levels an Hsp70-Protein und somit ein erhöhtes Risiko eine GvHD zu entwickeln auf. Im vorliegenden statistischen Modell steigt das Risiko eine GvHD zu entwickeln tendenziell (p-Wert: 0,59) pro Lebensjahr um 0,8% an. Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigen weibliche Patienten tendenziell ein 20% höheres Risiko an einer GvHD zu erkranken (p-Wert: 0,63), wohingegen Männer ein geringeres Risiko aufweisen eine GvHD zu entwickeln. Die alters- und geschlechtsbezogenen Aussagen sind nicht signifikant. Betrachtet man jedoch die Patienten im Kollektiv mit chronischer GvHD, ergibt sich ein signifikanter, altersspezifischer (p-Wert: 0,037) und geschlechtsspezifischer (p-Wert: 0,014) Zusammenhang. Das Risiko eine chronische GvHD zu entwickeln ist im untersuchten Kollektiv bei Männern im Vergleich zu Frauen höher. Dies ist aber abzugrenzen vom Gesamtrisiko eine GvHD zu entwickeln. In der Literatur wird das Alter ebenfalls als einer der größten Risikofaktoren, sowohl für die akute, als auch für die chronische GvHD beschrieben (Carlens et al., 1998; Gale et al., 1987).

Zusammenfassend wurden in der Literatur sowohl Zusammenhänge zwischen Hsp70 und Leukämien, als auch zwischen Hsp70 und GvHD untersucht. Ein großer Teil dessen lässt sich gut mit den Hsp70-Proteinwerten und den zugehörigen Ergebnissen und Auswertungen vereinbaren. Wohingegen die gemessenen Hsp70 Antikörper Werte eher gegensätzliche Ergebnisse im Vergleich zur Literatur ergeben. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und der zugehörigen statistischen Auswertung konnte ein signifikan-

ter Zusammenhang zwischen den gemessenen Hsp70-Protein Werten und der Graft-versus-Host-Erkrankung gezeigt werden. In Form eines statistischen Berechnungsmodells wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Wahrscheinlichkeit einer GvHD zum Zeitpunkt der Probeentnahme und den gemessenen Hsp70-Protein Werten aufgezeigt. Dies unterstreicht die Aussage, dass Hsp70 beste Voraussetzungen mit sich bringt, um als potenzieller Biomarker in Frage zu kommen. Im Allgemeinen könnte Hsp70 als Biomarker, sowohl als diagnostisches Tool zur Vorhersage, als auch zur Risiko-Stratifizierung bei bestehender GvHD herangezogen werden.

Limitationen unserer Arbeit sind zum einen das Design der durchgeführten Studie, welche retrospektiv durchgeführt und ausgewertet wurde. Die Studie wurde weder verblindet noch randomisiert durchgeführt. Die Dokumentation der klinischen Parameter und Events erfolgte nach dem Schema der gängigen klinischen Dokumentation, sicherlich wäre es hilfreich gewesen zu dokumentierenden und zu untersuchenden Parameter vorher festzulegen. Die Fallzahl $n = 52$ ist ebenfalls eher klein. In zukünftigen Studien müsste mit einer größeren Fallzahl, optimiertem Studiendesign, beispielsweise mit einer verblindeten, prospektiven und randomisierten Studie, versucht werden, die vorliegenden Daten detaillierter auszuwerten. Dadurch könnten Einzelzusammenhänge wie zum Beispiel Organspezifität besser untersucht werden. Um eine Bias beispielsweise mit allgemeinen Entzündungsreaktionen auszuschließen, müssten Entzündungsparameter im Labor und beispielsweise Fieber mit eingeschlossen werden und auch die genaue immunsuppressive Therapie berücksichtigt werden. Aufgrund nicht vollständiger Dokumentation konnten im Rahmen dieser Arbeit keinerlei hinreichende Zusammenhänge gefunden werden. Auch die Frage nach einer Rolle von Hsp70 in Bezug auf die Pathophysiologie bleibt weiterhin ungeklärt. Es wäre interessant solche Zusammenhänge in Zukunft näher zu betrachten.

Im Folgenden soll kurz auf die in der aktuellen Literatur diskutierten Biomarker für die Graft-versus-Host-Erkrankung eingegangen werden, um Hsp70 als potenziellen Marker einordnen zu können.

Obwohl in kleineren Studien viele Proteine im Blut als potentielle Biomarker beschrieben wurden, existiert kein validierter diagnostischer Bluttest für GvHD.

Die Arbeitsgruppe Chen et al. beschreibt in einem Review Artikel drei generelle Kategorien von Biomarkern. Zum einen existieren Marker generalisierter Entzündungsreaktionen, wie Cytokine, beispielsweise IL-2, sIL-2R (soluble IL-2 receptor, löslicher IL-2-Rezeptor) (Miyamoto et al., 1996) und TNF alpha (Holler et al., 1990). Diese wurden bereits in mehreren kleineren Studien als potentielle systemische Biomarker erwähnt. Auch anderen Interleukinen wie z.B. IL-18 wird eine potentielle Rolle als Biomarker zugeschrieben. Zum anderen werden in der Literatur Oberflächenmoleküle von Lymphozyten (z.B. CD30, $\alpha 4\beta 7$ integrin) (Wysocki et al., 2005) als mögliche Biomarker genannt. Des Weiteren kommen auch auf Grund von Endorganschäden ausgeschüttete Produkte wie beispielsweise elafin im Falle einer Haut GvHD (Paczesny et al., 2010) oder reg3 α (Ferrara et al., 2011) als potentieller Marker einer intestinalen GvHD in Frage (Chen et al., 2012; Chen et al., 2013). Ein Teil der oben genannten Biomarker scheinen in den komplexen Prozess der Pathophysiologie der GvHD involviert zu sein, ein anderer Teil nicht. In den meisten Fällen ist ein einziger Biomarker alleine auf Grund der fehlenden Sensitivität und Spezifität nicht ausreichend. Durch die Anwendung mehrerer Biomarker könnte die Spezifität und die Vorhersagbarkeit erhöht werden. Eine Kombination aus Gewebe spezifischen und systemischen Biomarkern wäre sicherlich informativer als individuelle Biomarker. Je nach Sensitivität und Spezifität könnte beispielsweise ein Panel (ausgewählte Gruppe) von zwei Biomarkern ausreichend sein um diagnostisch angewendet zu werden sein oder eine GvHD vorherzusagen (Paczesny et al., 2013).

Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits Panel von Biomarkern erarbeitet. Unter anderem wurde von der Arbeitsgruppe um Paczesny ein Panel von identifizierten Biomarkern mit IL-2 α , TNFR-1 (tumor necrosis factor receptor), HGF (hepatocyte growth factor) und elafin vorgeschlagen (Paczesny et al., 2009). Die Anwendung moderner Techniken, z.B. „Omics“ (gemeint Endung -omik) in diesem Falle beispielsweise die Proteomik hat dazu geführt, potentielle Biomarker für GvHD in großer Anzahl screenen zu können (Paczesny et al., 2013). In kürzlich veröffentlichter Literatur unterscheidet Paczesny zwischen Biomarkern, die auf der Pathophysiologie von GvHD basieren und welchen die durch Proteomik entdeckt wurden und darauf basieren (Paczesny, 2013). In neueren Studien zeigte sich zusätzlich zu den schon erwähnten Biomarkern ST2 (supressi-

on of tumorigenicity 2) als vielversprechender Biomarker für das Risiko bei therapieresistenter GvHD und Tod (Vander Lugt et al., 2013).

Hsp70 als potentieller Biomarker für GvHD lässt sich am ehesten im Bereich der Marker generalisierter Entzündungsreaktionen beziehungsweise im Zusammenhang mit der Pathophysiologie von GvHD einordnen. Eine wichtige Eigenschaft um Hsp70 als potentiellen Biomarker in Betracht zu ziehen, ist die Korrelation mit dem Risiko eine GvHD zu entwickeln. Ob es sich um einen systemischen oder organspezifischen Marker handelt, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden und muss sicherlich in darauffolgenden Studien geklärt werden.

Allgemeine Eigenschaften eines idealen Biomarkers sind in erster Linie basierend auf der Brauchbarkeit im klinischen Alltag. Ein idealer Biomarker sollte nicht-invasiv und einfach zu testen sein. Die Messungen müssen reproduzierbar und präzise sein und dies möglichst mit kosteneffektiven, standardisierten Methoden. Ferner sollte ein idealer Biomarker eine hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität aufweisen, um Patienten mit GvHD und ohne GvHD voneinander unterscheiden zu können. Beispielsweise um differentialdiagnostisch zwischen einer allergischen Hautreaktion und einer GvHD der Haut unterscheiden zu können. Wenn ein Biomarker mit dem Ansprechen auf die Behandlung korreliert, könnte dieser zum Beispiel angewendet werden, um die Intensität der Behandlung bei Hochrisikopatienten anzupassen oder die immunsuppressive Therapie bei Patienten mit geringem Risiko frühzeitig auszuschleichen. Vorausichtlich wird ein Biomarker der das Risiko stratifizieren kann, bevor klinische Zeichen der GvHD sichtbar werden sehr nützlich für die präventive Anwendung sein. Potenzielle Biomarker, denen eine Rolle in der Pathophysiologie der GvHD zugeschrieben wird, könnten auch als Zielstrukturen beispielsweise im Rahmen einer „targeted-therapy“ Frage kommen. Proteine die im Plasma oder Serum nachweisbar sind und häufig im klinischen Alltag gebraucht werden um Krebserkrankungen zu screenen und zu monitoren sind z.B. PSA (Prostata-spezifisches Antigen) für das Prostatakarzinom oder CA-125 (Cancer-Antigen) für das Mammakarzinom. Die Wunschvorstellung wäre in Zukunft, auch solch einen Biomarker für die GvHD zu finden (Chen et al., 2012; Paczesny et al., 2009; Paczesny et al., 2013).

Zusammenfassend ist in folgender Grafik nochmals dargestellt welche Eigenschaften Hsp70 mit sich bringt und welche Eigenschaften ein idealer Biomarker laut Chen et al. (Chen et al., 2012).

Ideale Eigenschaften eines wenig- oder nichtinvasiven Biomarkers für GvHD im Blut	Eigenschaften von Hsp70-Protein als Serummarker 
einfache Testung	✓
weit verbreitete Technik	✓
gute Reproduzierbarkeit	✓
geringe Kosten	✓
adäquate Sensitivität	✓
hohe Spezifität	✓
guter Vorhersagewert	✓
Korrelation mit dem Ansprechen auf Therapie	?
Zusammenhang mit Pathophysiologie	?

Tabelle 18: Eigenschaften von Hsp70 als potenzieller Biomarker

Um Hsp70 als Biomarker im klinischen Alltag einsetzen zu können sind sicherlich einige weitere und vor allem größere Studien nötig, welche beispielsweise die Wirkung von Medikamenten auf Hsp70-Levels oder den Zusammenhang mit dem Befall einzelner Organe durch GvHD (z.B. Haut GvHD oder Darm-GvHD) näher beleuchten. Auch das Einhergehen von Hsp70 Levels im Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung und dem Outcome muss in weiterführenden Untersuchungen detailliert geklärt werden. Hsp70 könnte, wenn ein Zusammenhang mit der Pathophysiologie von GvHD besteht, ebenfalls als Zielstruktur im Falle einer Immuntherapie oder als „targeted therapy“ in Frage kommen. Auch die konkrete Frage nach Sensitivität und Spezifität muss sicherlich in Zukunft auch im Vergleich mit anderen potenziellen Biomarkern geklärt werden, ebenso wie die Kosteneffektivität.

4.2 Zusammenfassung und Ausblick

Eines der größten Hindernisse in der Forschung und Therapie der GvHD ist nach wie vor die sehr kliniklastige und invasive Diagnostik (z.B. Gewebebiopsien). Gegenwärtig gibt es keine validierten Labortests für das Risiko eine GvHD zu entwickeln, die das Ansprechen auf eine Therapie oder das Überleben der Patienten vorhersagen können und Anwendung in der klinischen Alltagsroutine finden. Sicherlich liegt dies unter anderem an der Komplexität der Pathophysiologie der GvHD. Die Hauptgründe einen spezifischen Biomarker für GvHD zu finden, sind also demnach vor allem die Verfeinerung der Diagnostik und die Optimierung der Therapie um das Outcome der Patienten, die sich einer Stammzelltransplantation unterziehen zu verbessern. Um dies erreichen zu können, ist ein Biomarker nötig, der sowohl Hochrisikopatienten von Patienten mit geringem Risiko unterscheiden kann, als auch Patienten die gut auf eine Therapie ansprechen (responder) von Patienten unterscheidet die nicht gut auf die Standardtherapie ansprechen. Therapieschemata könnten dann individuell für jeden Patienten angepasst werden und beispielsweise könnten Dosisanpassungen von immunsuppressiven Therapien schon präventiv erfolgen. Ein spezifischer Biomarker in peripher entnommenem Blut wäre definitiv hinsichtlich der Optimierung der Therapie eine wertvolle Unterstützung in der Diagnostik und als klinisches Tool, um invasive diagnostische Maßnahmen zu vermeiden und zusätzlich die Therapie nach SCT zu individualisieren. Auch Verzögerung durch Entnahme und pathologischer Evaluation von Biopsien könnte vermieden werden. Zusätzlich könnten unklare Fälle besser geklärt und gemanagt werden.

Zukünftig könnte Hsp70 als nichtinvasiver Blut-Biomarker beispielsweise eingesetzt werden um die präventive Therapie hinsichtlich der GvHD individuell und risikoadaptiert anzupassen. In Abbildung 37 ist ein solcher Therapieansatz beispielhaft dargestellt.

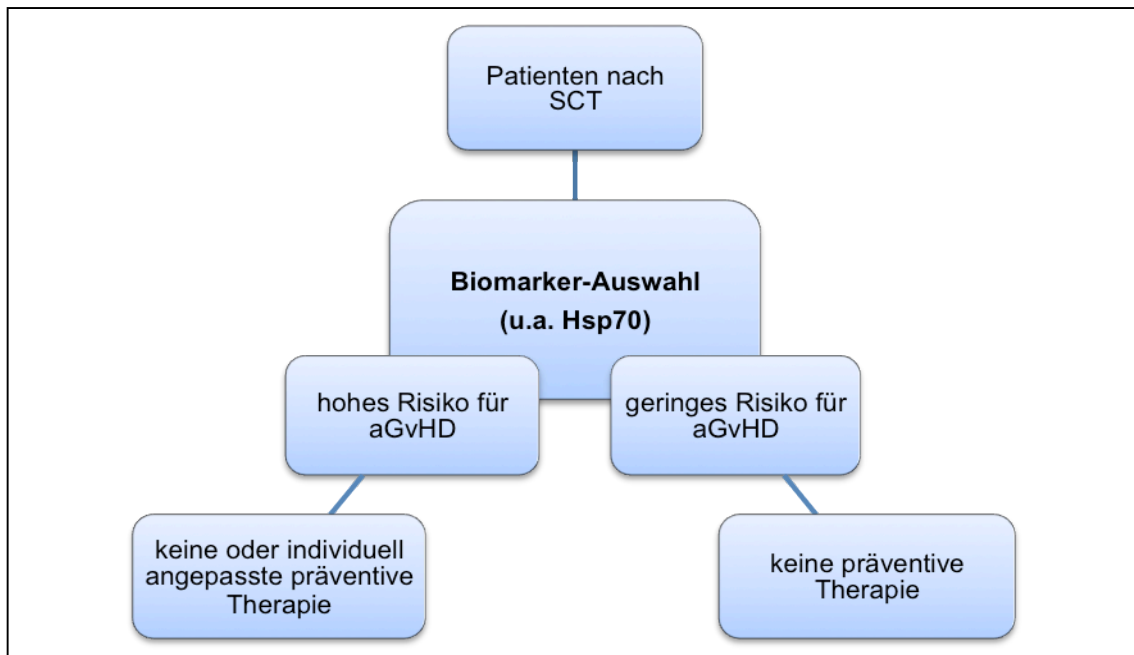


Abbildung 37: Beispiel eines risiko-stratifizierten Therapieansatzes im Rahmen einer Präventivtherapie der GvHD

Wenn Patienten beispielsweise bereits eine akute GvHD entwickelt haben, könnte Hsp70 dennoch behilflich sein das Management der Erkrankung im Sinne einer risikoadaptierten Therapie zu optimieren. Dies ist in der folgenden Abbildung beispielhaft dargestellt.

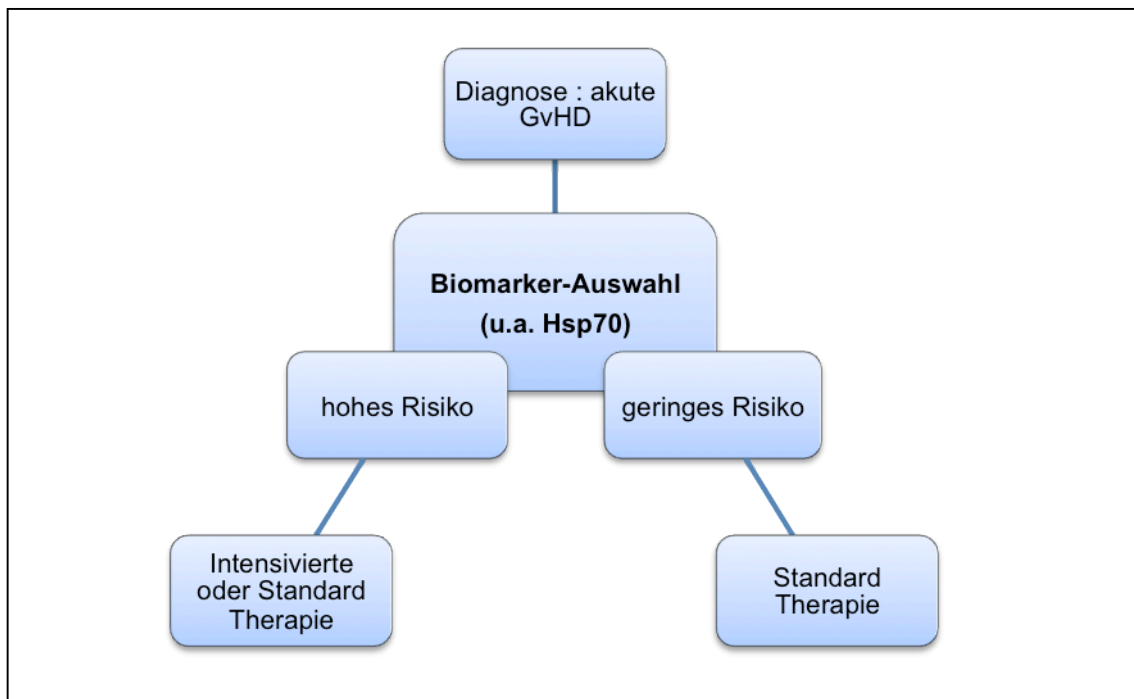


Abbildung 38: Beispiel einer zukünftig risiko-adaptierten Therapie der akuten GvHD

Angesichts der steigenden Zahlen allogener SCT mit weltweit über 12.000 durchgeführten Transplantationen pro Jahr und einer Zunahme von schätzungsweise 10-20% jährlich, kommt der akuten und chronischen GvHD auch in Zukunft eine zentrale Rolle zu (Hausermann et al., 2008). Zukünftig wird, begründet durch die zunehmende Bedeutung der chronischen GvHD, auch die Forschung insbesondere im Bereich Biomarker und Pathophysiologie, sowie die Vereinbarung von Response-Kriterien und die Optimierung der Therapie eine bedeutende Rolle spielen (Hausermann et al., 2008; Shlomchik et al., 2007).

5 Anhang

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatopoetische Zellreihen (Renz-Polster, 2008).....	9
Abbildung 2: Zusammenhänge Leukämien, maligne Lymphomen und myeloproliferatives Syndrom (nachempfunden, Herold 2009, S.82).....	11
Abbildung 3: Altersverteilung und Häufigkeit der Leukämien (Renz-Polster, 2008)...	12
Abbildung 4: Möglicher Ablauf einer SCT (eigene Abbildung)	15
Abbildung 5: Pathophysiologie aGvHD (Hill et al., 2000) (Travnik et al., 2011a)	23
Abbildung 6: Butterfly-Kanüle (http://www.united-medical.de/wp-content/uploads/2012/03/602527_1_zoom1_z1-150x150.jpg / Stand 09.09.2013, Serumröhrchen (http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/typo3temp/pics/14quer_1819d7ab86.jpg / Stand 09.09.2013)	37
Abbildung 7: Blutserum (http://212.227.241.121/imupro-at/media/images/content/blut-01.jpg / Stand 09.09.2013)	37
Abbildung 8: Box mit Sealer; Inkubator mit Box (eigene Abbildung)	39
Abbildung 9: Tubes für Probenverdünnung; Pipettierschritt Proben (eigene Abb.)....	40
Abbildung 10: ELISAreader und dazugehöriger Computer (eigene Abbildung)	41
Abbildung 11: Arbeitsschritte Hsp70-Antikörper-ELISA (eigene Zusammenstellung)..	42
Abbildung 12: Übersicht Hsp70-Ak-ELISA (modifiziert nach http://exploreable.files.wordpress.com/2011/05/ch4f35.jpg / Stand 09.09.2013).....	43
Abbildung 13: Übersicht Hsp70-Protein-ELISA; (erhalten von R&D Systems)	44
Abbildung 14: Pipettierschritt Stoppvorgang (eigene Abbildung)	45
Abbildung 15: Arbeitsschritte Hsp70-Protein-ELISA (eigene Zusammenstellung)	46
Abbildung 16: Arbeitsschritte Hsp70-Protein ELISA (erhalten von R&D Systems)	47
Abbildung 17: Entnahmezeitpunkte der Serumproben im Überblick (eigene Abb.)	51
Abbildung 18: Übersicht der Probeentnahmezeitpunkte pro Patient (eigene Abb.)	51
Abbildung 19: Alter bei SCT; Geschlecht (eigene Abbildung)	55
Abbildung 20: Gesamtverläufe Hsp70-Protein Übersicht (eigene Abbildung).....	56
Abbildung 21: Gesamtverläufe Hsp70-Protein Übersicht (eigene Abbildung).....	57
Abbildung 22: Hsp70-Protein Normalkollektiv (vor/nach SCT) (eigene Abbildung).....	59
Abbildung 23: Hsp70-Protein Gesamtverteilung nach Geschlecht (eigene Abb.)	60
Abbildung 24: Hsp70-Protein (vor/nach SCT) nach Geschlecht (eigene Abbildung) ...	61
Abbildung 25: Hsp70-Antikörper Normalkollektiv (vor/nach SCT) (eigene Abbildung). 62	
Abbildung 26: Hsp70-Antikörper Gesamtverteilung nach Geschlecht (eigene Abb.) ...	63
Abbildung 27: Hsp70-Antikörper (vor/nach SCT) nach Geschlecht (eigene Abb.).....	64
Abbildung 28 u. 29: Hsp70-Protein aller 52 Patienten seit SCT (eigene Abbildung)....	65

Abbildung 30: Hsp70-Antikörper Mittelwerte aller 52 Patienten seit SCT (eigene Abb.)	66
Abbildung 31: Verteilung nach Art der GvHD Erkrankungen im Kollektiv (eigene Abbildung)	67
Abbildung 32: Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit einer GvHD und Hsp70-Protein Werten (eigene Abbildung).....	68
Abbildung 33: Hsp70-Protein Werten nach Alter und Geschlecht (eigene Abbildung).	68
Abbildung 34: Wahrscheinlichkeit für eine cGvHD nach Alter und Geschlecht (eigene Abbildung)	71
Abbildung 35: Kumulatives Gesamtüberleben (eigene Abbildung)	72
Abbildung 36: Kumulatives Überleben nach Geschlecht (eigene Abbildung)	73
Abbildung 37: Beispiel risiko-stratifizierten Therapieansatz der GvHD (eigene Zusammenstellung).....	84
Abbildung 38: Beispiel einer risiko-adaptierten Therapie der akuten GvHD (eigene Zusammenstellung).....	84

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Indikationen SCT bei malignen Erkrankungen (Travnik et al., 2011a) ...	17
Tabelle 2:	Komplikationen der SCT (Travnik et al., 2011a).....	18
Tabelle 3:	Chemikalien und Reagenzien (eigene Zusammenstellung)	33
Tabelle 4:	Verwendetes Kit (eigene Zusammenstellung)	33
Tabelle 5:	Kitlösungen und Herstellung (eigene Zusammenstellung)	34
Tabelle 6:	Puffer (eigene Zusammenstellung).....	34
Tabelle 7:	Antikörper und Protein (eigene Zusammenstellung)	34
Tabelle 8:	Plastikmaterial (eigene Zusammenstellung).....	35
Tabelle 9:	Geräte und Hersteller (eigene Zusammenstellung).....	35
Tabelle 10:	Blutserum (eigene Zusammenstellung)	35
Tabelle 11:	Zeitpunkte Probeentnahme pro Patient (eigene Zusammenstellung)	50
Tabelle 12:	Zugrundeliegende Diagnose (eigene Zusammenstellung)	52
Tabelle 13:	Primäre Erkrankung und sekundärer Erkrankung (eigene Zusammenstellung)	53
Tabelle 14:	Geschlecht und Alter (Median, in Jahren) bei SCT (eigene Zusammenstellung)	54
Tabelle 15:	Hsp70 Protein und Hsp70 Antikörper für alle Patienten (vor/nach SCT) (eigene Zusammenstellung)	58
Tabelle 16:	Hsp70-Protein und Hsp70 Antikörper nach Geschlecht (vor/nach SCT) (eigene Zusammenstellung)	62
Tabelle 17:	Berechnungsgrundlagen, Modellberechnung (eigene Zusammenstellung)	70
Tabelle 18:	Eigenschaften von Hsp70 als potenzieller Biomarker (modifiziert nach Chen et al., 2012).....	82

5.3 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Multhoff, Leiterin der Radioonkologie und Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar für die hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit.

Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Holler des Universitätsklinikums Regensburg und seinem Team die bei der klinischen Auswertung mit Rat und Tat zur Seite standen und durch die, die Serumprobeentnahme durchgeführt wurde.

Ebenfalls ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Schuster vom IMSE der TU München für die Geduld und Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Danke auch an das ganze Labor Team der Arbeitsgruppe um Dr. Gehrman für die Tipps und die Unterstützung.

Von Herzen möchte ich meiner guten Freundin Kathrin Hube für die unvergesslichen gemeinsamen Zeiten, ihr Vertrauen, ihre Geduld und die langjährige Freundschaft danken, ohne Sie wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Danke auch an meine Freunde, meine Familie und ganz besonders an meine lieben Eltern, die mir dies alles überhaupt erst ermöglicht haben und mich die ganzen letzten Jahre immer unterstützt und motiviert haben.

Allergrößter Dank gilt meinem Mann Manuel, der mich immer wieder neu ermutigt und unterstützt hat. Danke dass du immer für mich da bist.

5.4 Literaturverzeichnis

Andreesen, R. H., E. (2005, 18.7.2005).

Allogene Knochenmarktransplantation Was sollten Sie wissen?

Information für Patienten und Angehörige; Retrieved 19.09.2012, 2012, from http://www.uniklinikum-regensburg.de/kliniken-institute/haematologie-onkologie/Informationen_f__r_Patienten/KMT_Ratgeber/index.php

Armitage, J. O.

Bone marrow transplantation.

N Engl J Med, 330(12), (1994), 827-838.

Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H. G., de la Salle, H., Schild, H.

Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells.

J Immunol, 162(7), (1999), 3757-3760.

Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., Calderwood, S. K.

HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine.

Nat Med, 6(4), (2000), 435-442.

Bajramovic, J. J., Bsibsi, M., Geutskens, S. B., Hassankhan, R., Verhulst, K. C., Stege, G. J., de Groot, C. J., van Noort, J. M.

Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines.

J Neuroimmunol, 106(1-2), (2000), 14-22.

Basu, S., Srivastava, P. K.

Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses.

Cell Stress Chaperones, 5(5), (2000), 443-451.

Botzler, C., Ellwart, J., Gunther, W., Eissner, G., Multhoff, G.

Synergistic effects of heat and ET-18-OCH₃ on membrane expression of hsp70 and lysis of leukemic K562 cells.

Exp Hematol, 27(3), (1999), 470-478.

Botzler, C., Issels, R., Multhoff, G.

Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells.

Cancer Immunol Immunother, 43(4), (1996), 226-230.

Botzler, C., Li, G., Issels, R. D., Multhoff, G.

Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response.

Cell Stress Chaperones, 3(1), (1998), 6-11.

Brazzelli, V., Grasso, V., Muzio, F., Moggio, E., Zecca, M., Locatelli, F., Borroni, G.

Narrowband ultraviolet B phototherapy in the treatment of cutaneous graft-versus-host disease in oncohaematological paediatric patients.

Br J Dermatol, 162(2), (2010), 404-409.

Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B., Ciocca, D. R.

Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis.

Trends Biochem Sci, 31(3), (2006), 164-172.

Carcagni, M. R., De Aloe, G., D'Ascenzo, G., Rubegni, P., Fimiani, M.

Extracorporeal photopheresis in graft-versus-host disease.

J Dtsch Dermatol Ges, 6(6), (2008), 451-457.

Carlens, S., Ringden, O., Remberger, M., Lonnqvist, B., Hagglund, H., Klaesson, S., Mattsson, J., Svahn, B.M., Winiarski, J., Ljungman, P., Aschan, J.

Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis.

Bone Marrow Transplant, 22(8), (1998), 755-761.

Cavet, J., Middleton, P. G., Segall, M., Noreen, H., Davies, S. M., Dickinson, A.M.

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), (1999), 3941-3946.

Chen, Y. B., Cutler, C. S.

Biomarkers for acute GVHD: can we predict the unpredictable?

Bone Marrow Transplant, (2012).

Chen, Y. B., McDonough, S., Chen, H., Kennedy, J., Illiano, C., Attar, E. C., Ballen, K. K., Dey, B. R., McAfee, S. L., Jagasia, M., Soiffer, R., Spitzer, T. R., Ritz, J.

Expression of alpha4beta7 integrin on memory CD8(+) T cells at the presentation of acute intestinal GVHD.

Bone Marrow Transplant, 48(4), (2013), 598-603.

Ciocca, D. R., Calderwood, S. K.

Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications.

Cell Stress Chaperones, 10(2), (2005), 86-103.

Cowen, E. W. H., R.H. .

Cutaneous manifestations of chronic Graft versus host disease.

Cambridge University Press, New York, (2009), S 169–181.

Csermely, P.

A nonconventional role of molecular chaperones: involvement in the cytoarchitecture.

News Physiol Sci, 16(2001), 123-126.

De Lima, M., Champlin, R.

Unrelated donor hematopoietic transplantation.

Rev Clin Exp Hematol, 5(2), (2001), 100-134.

De Maio, A.

Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams.

Shock, 11(1), (1999), 1-12.

Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Joly, A. L., De Thonel, A., Chiosis, G., Garrido, C.

Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins.

Curr Med Chem, 14(27), (2007), 2839-2847.

Duquesnoy, R. L., K; Moliterno, RA; Attfield,D;.

Do heat shock proteins play a role in transplant immunity?

Transplantation Reviews - July 1996 10(3), (1996), 175-186.

Elad, S., Or, R., Resnick, I., Shapira, M. Y.

Topical tacrolimus--a novel treatment alternative for cutaneous chronic graft-versus-host disease.

Transpl Int, 16(9), (2003), 665-670.

Feige, U., Polla, B. S.

Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications.

Experientia, 50(11-12), (1994), 979-986.

Ferrara, J. L., Cooke, K. R., Teshima, T.

The pathophysiology of acute graft-versus-host disease.

Int J Hematol, 78(3), (2003), 181-187.

Ferrara, J. L., Harris, A. C., Greenson, J. K., Braun, T. M., Holler, E., Teshima, T., Levine, J. E., Choi, S. W., Huber, E., Landfried, K., Akashi, K., Vander Lugt, M., Reddy, P., Chin, A., Zhang, Q., Hanash, S., Paczesny, S.

Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease.

Blood, 118(25), (2011), 6702-6708.

Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., Holler, E.

Graft-versus-host disease.

Lancet, 373(9674), (2009), 1550-1561.

Ferrara, J. L. D., H.J.; Burakoff S.J. (1997).

Graft-vs.-host disease

Dekker, New York (Vol.2).

Filipovich, A. H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J. R., Lee, S. J., Martin, P., Chien, J., Przepiora, D., Couriel, D., Cowen, E. W., Dinndorf, P., Farrell, A., Hartzman, R., Henslee-Downey, J., Jacobsohn, D., McDonald, G., Mittleman, B., Rizzo, J. D., Robinson, M., Schubert, M., Schultz, K., Shulman, H., Turner, M., Vogelsang, G., Flowers, M. E.

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), (2005), 945-956.

Gabai, V. L., Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Volloch, V. Z., Sherman, M. Y.

Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging.

FEBS Lett, 438(1-2), (1998), 1-4.

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., et al.

Risk factors for acute graft-versus-host disease.

Br J Haematol, 67(4), (1987), 397-406.

Gehrmann, M., Radons, J., Molls, M., Multhoff, G.

The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells.

Cell Stress Chaperones, 13(1), (2008), 1-10.

Gehrmann, M., Schmetzer, H., Eissner, G., Haferlach, T., Hiddemann, W., Multhoff, G.

Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) in acute myeloid leukemia: a tumor specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells.

Haematologica, 88(4), (2003), 474-476.

Gilliam, A. C.

Update on graft versus host disease.

J Invest Dermatol, 123(2), (2004), 251-257.

Goral, J., Mathews, H. L., Clancy, J., Jr.

Antibodies specific for the 70-kDa heat-shock protein parallel the development of acute graft-versus-host disease in (DA x LEW)F1 rats.

Clin Immunol Immunopathol, 75(2), (1995), 147-153.

Goral, J., Mathews, H. L., Clancy, J., Jr.

Expression of 70-kDa heat-shock protein during acute graft-versus-host disease.

Clin Immunol Immunopathol, 86(3), (1998), 252-258.

Goral, J., Shenoy, S., Mohanakumar, T., Clancy, J., Jr.

Antibodies to 70 kD and 90 kD heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients.

Clin Exp Immunol, 127(3), (2002), 553-559.

Grauer, O., Wolff, D., Bertz, H., Greinix, H., Kuhl, J. S., Lawitschka, A., Lee, S. J., Pavletic, S. Z., Holler, E., Kleiter, I.

Neurological manifestations of chronic graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: report from the Consensus Conference on Clinical Practice in chronic graft-versus-host disease.

Brain, 133(10), (2010), 2852-2865.

Greinix, H. T., Loddenkemper, C., Pavletic, S. Z., Holler, E., Socie, G., Lawitschka, A., Halter, J., Wolff, D.

Diagnosis and staging of chronic graft-versus-host disease in the clinical practice.

Biol Blood Marrow Transplant, 17(2), (2011), 167-175.

Gross, C., Holler, E., Stangl, S., Dickinson, A., Pockley, A. G., Asea, A. A., Mallappa, N., Multhoff, G.

An Hsp70 peptide initiates NK cell killing of leukemic blasts after stem cell transplantation.

Leuk Res, 32(4), (2008), 527-534.

Gupta, R. S., Ramachandra, N. B., Bowes, T., Singh, B.

Unusual cellular disposition of the mitochondrial molecular chaperones Hsp60, Hsp70 and Hsp10.

Novartis Found Symp, 291(2008), 59-68; discussion 69-73, 137-140.

Haas, I. G.

BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum.

Experientia, 50(11-12), (1994), 1012-1020.

Hantschel, M., Pfister, K., Jordan, A., Scholz, R., Andreesen, R., Schmitz, G., Schmetzer, H., Hiddemann, W., Multhoff, G.

Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients.

Cell Stress Chaperones, 5(5), (2000), 438-442.

Hartl, F. U., Hayer-Hartl, M.

Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.

Science, 295(5561), (2002), 1852-1858.

Hausermann, P., Walter, R. B., Halter, J., Biedermann, B. C., Tichelli, A., Itin, P., Gratwohl, A.

Cutaneous graft-versus-host disease: a guide for the dermatologist.

Dermatology, 216(4), (2008), 287-304.

Helmbrecht, K., Zeise, E., Rensing, L.

Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review.

Cell Prolif, 33(6), (2000), 341-365.

Herold, G. (2009).

Hämatologie.

In: *"Lehrbuch Innere Medizin"* Herold, G. und Mitarbeiter.

(Hrsg.) Dr. med. Gerd Herold, Arzt für Innere Medizin/Arbeitsmedizin, Bernhard-Falk-Str. 27, 50737 Köln.

Auflage 2009. (18-132).

Hill, G. R., Ferrara, J. L.

The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation.

Blood, 95(9), (2000), 2754-2759.

Hofmeister, C. C., Quinn, A., Cooke, K. R., Stiff, P., Nickoloff, B., Ferrara, J. L.

Graft-versus-host disease of the skin: life and death on the epidermal edge.

Biol Blood Marrow Transplant, 10(6), (2004), 366-372.

Hohfeld, J., Cyr, D. M., Patterson, C.

From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation.

EMBO Rep, 2(10), (2001), 885-890.

Hohfeld, J., Jentsch, S.

GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1.

EMBO J, 16(20), (1997), 6209-6216.

Holler, E., Ertl, B., Hintermeier-Knabe, R., Roncarolo, M. G., Eissner, G., Mayer, F., Fraunberger, P., Behrends, U., Pfannes, W., Kolb, H. J., Wilmanns, W.

Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning--an alternative target for modulation of acute GvHD and complications following allogeneic bone marrow transplantation?

Leuk Lymphoma, 25(3-4), (1997), 217-224.

Holler, E., Kolb, H. J., Eissner, G., Wilmanns, W.

Cytokines in GvH and GvL.

Bone Marrow Transplant, 22 Suppl 4(1998), S3-6.

Holler, E., Kolb, H. J., Hintermeier-Knabe, R., Mittermuller, J., Thierfelder, S., Kaul, M., Wilmanns, W.

Role of tumor necrosis factor alpha in acute graft-versus-host disease and complications following allogeneic bone marrow transplantation.

Transplant Proc, 25(1 Pt 2), (1993), 1234-1236.

Holler, E., Kolb, H. J., Moller, A., Kempeni, J., Liesenfeld, S., Pechumer, H., Lehmacher, W., Ruckdeschel, G., Gleixner, B., Riedner, C., et al.

Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation.

Blood, 75(4), (1990), 1011-1016.

Holler, E., Rogler, G., Brenmoehl, J., Hahn, J., Greinix, H., Dickinson, A. M., Socie, G., Wolff, D., Finke, J., Fischer, G., Jackson, G., Rocha, V., Hilgendorf, I., Eissner, G., Marienhagen, J., Andreesen, R.

The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation.

Int J Immunogenet, 35(4-5), (2008), 381-384.

Holler, E., Rogler, G., Brenmoehl, J., Hahn, J., Herfarth, H., Greinix, H., Dickinson, A. M., Socie, G., Wolff, D., Fischer, G., Jackson, G., Rocha, V., Steiner, B., Eissner, G., Marienhagen, J., Schoelmerich, J., Andreesen, R.

Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination.

Blood, 107(10), (2006), 4189-4193.

Jaattela, M.

Escaping cell death: survival proteins in cancer.

Exp Cell Res, 248(1), (1999), 30-43.

Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., Egeblad, M.

Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases.

EMBO J, 17(21), (1998), 6124-6134.

Jacobsohn, D. A., Vogelsang, G. B.

Novel pharmacotherapeutic approaches to prevention and treatment of GVHD.

Drugs, 62(6), (2002), 879-889.

Jarvis, M., Marzolini, M., Wang, X. N., Jackson, G., Sviland, L., Dickinson, A. M.

Heat shock protein 70: correlation of expression with degree of graft-versus-host response and clinical graft-versus-host disease.

Transplantation, 76(5), (2003), 849-853.

Jolly, C., Konecny, L., Grady, D. L., Kutsikova, Y. A., Cotto, J. J., Morimoto, R. I., Vourc'h, C.

In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress.

J Cell Biol, 156(5), (2002), 775-781.

Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B., Hightower, L. E.

Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins.

Cell Stress Chaperones, 14(1), (2009), 105-111.

Karrer, S.

Cutaneous graft-versus-host disease.

Hautarzt, 54(5), (2003), 465-480; quiz 481-462.

Lindquist, S.

The heat-shock response.

Annu Rev Biochem, 55(1986), 1151-1191.

Lindquist, S., Craig, E. A.

The heat-shock proteins.

Annu Rev Genet, 22(1988), 631-677.

Link, H., Kolb, H. J., Ebell, W., Hossfeld, D. K., Zander, A., Niethammer, D., Wandt, H., Grosse-Wilde, H., Schaefer, U. W.

Transplantation of hematopoietic stem cells. I: Definitions, principle indications, complications.

Med Klin (Munich), 92(8), (1997), 480-491, 505.

Mambula, S. S., Calderwood, S. K.

Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes.

J Immunol, 177(11), (2006), 7849-7857.

Mathew, A., Mathur, S. K., Jolly, C., Fox, S. G., Kim, S., Morimoto, R. I.

Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2.

Mol Cell Biol, 21(21), (2001), 7163-7171.

Mathew, A., Mathur, S. K., Morimoto, R. I.

Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway.

Mol Cell Biol, 18(9), (1998), 5091-5098.

Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M., Cyr, D. M.

The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation.

Nat Cell Biol, 3(1), (2001), 100-105.

Mielcarek, M., Martin, P. J., Leisenring, W., Flowers, M. E., Maloney, D. G., Sandmaier, B. M., Maris, M. B., Storb, R.

Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation.

Blood, 102(2), (2003), 756-762.

Miyamoto, T., Akashi, K., Hayashi, S., Gondo, H., Murakawa, M., Tanimoto, K., Harada, M., Niho, Y.

Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease.

Bone Marrow Transplant, 17(2), (1996), 185-190.

Multhoff, G.

Heat shock protein 72 (HSP72), a hyperthermia-inducible immunogenic determinant on leukemic K562 and Ewing's sarcoma cells.

Int J Hyperthermia, 13(1), (1997), 39-48.

Multhoff, G.

Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance.

Methods, 43(3), (2007), 229-237.

Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J., Issels, R.

Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells.

J Immunol, 158(9), (1997), 4341-4350.

Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W., Issels, R. D.

A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells.

Int J Cancer, 61(2), (1995), 272-279.

Multhoff, G., Hightower, L. E.

Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies.

Cell Stress Chaperones, 16(3), (2011), 251-255.

Multhoff, G., Pfister, K., Botzler, C., Jordan, A., Scholz, R., Schmetzer, H., Burgstahler, R., Hiddemann, W.

Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors.

Int J Cancer, 88(5), (2000), 791-797.

Multhoff, G., Pfister, K., Gehrmann, M., Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M., Hiddemann, W.

A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity.

Cell Stress Chaperones, 6(4), (2001), 337-344.

Nishikawa, S., Brodsky, J. L., Nakatsukasa, K.

Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD).

J Biochem, 137(5), (2005), 551-555.

Paczesny, S.

Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers.

Blood, 121(4), (2013), 585-594.

Paczesny, S., Braun, T. M., Levine, J. E., Hogan, J., Crawford, J., Coffing, B., Olsen, S., Choi, S. W., Wang, H., Faca, V., Pitteri, S., Zhang, Q., Chin, A., Kitko, C., Mineishi, S., Yanik, G., Peres, E., Hanauer, D., Wang, Y., Reddy, P., Hanash, S., Ferrara, J. L.

Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin.

Sci Transl Med, 2(13), (2010), 13ra12.

Paczesny, S., Krijanovski, O. I., Braun, T. M., Choi, S. W., Clouthier, S. G., Kuick, R., Misek, D. E., Cooke, K. R., Kitko, C. L., Weyand, A., Bickley, D., Jones, D., Whitfield, J., Reddy, P., Levine, J. E., Hanash, S. M., Ferrara, J. L.

A biomarker panel for acute graft-versus-host disease.

Blood, 113(2), (2009), 273-278.

Paczesny, S., Raiker, N., Brooks, S., Mumaw, C.

Graft-versus-host disease biomarkers: omics and personalized medicine.

Int J Hematol, (2013).

Pockley, A. G., Multhoff, G.

Cell stress proteins in extracellular fluids: friend or foe?

Novartis Found Symp, 291(2008), 86-95; discussion 96-100, 137-140.

Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J. M., Garrido, C., Kroemer, G.

Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor.

Nat Cell Biol, 3(9), (2001), 839-843.

Renz-Polster, H., Krautzig, S.

Blut und Blutbildende Organe. Immunsystem.

In: Basislehrbuch Innere Medizin, Renz-Polster, H., Krautzig, S., (Hrsg.)

Elsevier, Urban und Fischer, München, Jena; 2008; 4.Auflage; (266-418)

Ritossa, P.

Problems of prophylactic vaccinations of infants.

Riv Ist Sieroter Ital, 37(1962), 79-108.

Robert-Koch-Institut (2012).

Krebs in Deutschland 2007/2008.

Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).

Schild, H., Arnold-Schild, D., Lammert, E., Rammensee, H. G.

Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes.

Curr Opin Immunol, 11(1), (1999), 109-113.

Schmitt, E., Gehrman, M., Brunet, M., Multhoff, G., Garrido, C.

Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy.

J Leukoc Biol, 81(1), (2007), 15-27.

Sedlackova, L., Spacek, M., Holler, E., Imryskova, Z., Hromadnikova, I.

Heat-shock protein expression in leukemia.

Tumour Biol, 32(1), (2011), 33-44.

Sherman, M. M., G.

Heat shock proteins in cancer.

Ann N Y Acad Sci, 1113(2007), 192-201.

Shlomchik, W. D., Lee, S. J., Couriel, D., Pavletic, S. Z.

Transplantation's greatest challenges: advances in chronic graft-versus-host disease.

Biol Blood Marrow Transplant, 13(1 Suppl 1), (2007), 2-10.

Shu, C. W. H., C. M.

HSP70s: From Tumor Transformation to Cancer Therapy.

Clin Med Oncol, 2(2008), 335-345.

Singh-Jasuja, H., Toes, R. E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S. P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H. G., Arnold-Schild, D., Schild, H.

Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis.

J Exp Med, 191(11), (2000), 1965-1974.

Socie, G., Ritz, J., Martin, P. J.

Current challenges in chronic graft-versus-host disease.

Biol Blood Marrow Transplant, 16(1 Suppl), (2010), S146-151.

Srivastava, P. K.

Heat shock proteins in immune response to cancer: the Fourth Paradigm.

Experientia, 50(11-12), (1994), 1054-1060.

Stangl, S., Gross, C., Pockley, A. G., Asea, A. A., Multhoff, G.

Influence of Hsp70 and HLA-E on the killing of leukemic blasts by cytokine/Hsp70 peptide-activated human natural killer (NK) cells.

Cell Stress Chaperones, 13(2), (2008), 221-230.

Steiner, K., Graf, M., Hecht, K., Reif, S., Rossbacher, L., Pfister, K., Kolb, H. J., Schmetzer, H. M., Multhoff, G.

High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis.

Leukemia, 20(11), (2006), 2076-2079.

Stuart, R. A., Cyr, D. M., Neupert, W.

Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation.

Experientia, 50(11-12), (1994), 1002-1011.

Terlecky, S. R.

Hsp70s and lysosomal proteolysis.

Experientia, 50(11-12), (1994), 1021-1025.

Todryk, S. M., Gough, M. J., Pockley, A. G.

Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential.

Immunology, 110(1), (2003), 1-9.

Travnik, R., Beckers, M., Wolff, D., Holler, E., Landthaler, M., Karrer, S.

Graft-versus-Host Disease (GvHD) - an update : Part 1: Pathophysiology, clinical features and classification of GvHD.

Hautarzt, 62(2), (2011a), 139-154; quiz 155.

Travnik, R., Beckers, M., Wolff, D., Holler, E., Landthaler, M., Karrer, S.

Graft-versus-host disease (GvHD) - an update. Part 2: prognosis and therapy of GvHD.

Hautarzt, 62(3), (2011b), 229-237; quiz 238-229.

Udono, H., Srivastava, P. K.

Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70.

J Immunol, 152(11), (1994), 5398-5403.

Vander Lugt, M. T., Braun, T. M., Hanash, S., Ritz, J., Ho, V. T., Antin, J. H., Zhang, Q., Wong, C. H., Wang, H., Chin, A., Gomez, A., Harris, A. C., Levine, J. E., Choi, S. W., Couriel, D., Reddy, P., Ferrara, J. L., Paczesny, S.

ST2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death.

N Engl J Med, 369(6), (2013), 529-539.

Vargas-Diez, E., Garcia-Diez, A., Marin, A., Fernandez-Herrera, J.

Life-threatening graft-vs-host disease.

Clin Dermatol, 23(3), (2005), 285-300.

Vega, V. L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrman, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., De Maio, A.

Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages.

J Immunol, 180(6), (2008), 4299-4307.

Vogelsang, G. B.

How I treat chronic graft-versus-host disease.

Blood, 97(5), (2001), 1196-1201.

Wei, Y. Q., Zhao, X., Kariya, Y., Teshigawara, K., Uchida, A.

Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells.

Cancer Immunol Immunother, 40(2), (1995), 73-78.

Wolff, D., Bertz, H., Greinix, H., Lawitschka, A., Halter, J., Holler, E.

The treatment of chronic graft-versus-host disease: consensus recommendations of experts from Germany, Austria, and Switzerland.

Dtsch Arztebl Int, 108(43), (2011a), 732-740.

Wolff, D., Gerbitz, A., Ayuk, F., Kiani, A., Hildebrandt, G. C., Vogelsang, G. B., Elad, S., Lawitschka, A., Socie, G., Pavletic, S. Z., Holler, E., Greinix, H.

Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD.

Biol Blood Marrow Transplant, 16(12), (2010), 1611-1628.

Wolff, D., Schleuning, M., von Harsdorf, S., Bacher, U., Gerbitz, A., Stadler, M., Ayuk, F., Kiani, A., Schwerdtfeger, R., Vogelsang, G. B., Kobbe, G., Gramatzki, M., Lawitschka, A., Mohty, M., Pavletic, S. Z., Greinix, H., Holler, E.

Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease.

Biol Blood Marrow Transplant, 17(1), (2011b), 1-17.

Wolff, D., Steiner, B., Hildebrandt, G., Edinger, M., Holler, E.

Pharmaceutical and cellular strategies in prophylaxis and treatment of graft-versus-host disease.

Curr Pharm Des, 15(17), (2009), 1974-1997.

Wysocki, C. A., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B. R., Serody, J. S.

Leukocyte migration and graft-versus-host disease.

Blood, 105(11), (2005), 4191-4199.

Xie, Y., Cahill, C. M., Asea, A., Auron, P. E., Calderwood, S. K.

Heat shock proteins and regulation of cytokine expression.

Infect Dis Obstet Gynecol, 7(1-2), (1999), 26-30.

Zylicz, M., King, F. W., Wawrzynow, A.

Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein.

EMBO J, 20(17), (2001), 4634-4638.