

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

**Einfluss von KIR-, FcGR- und SUFU-Genotypen auf das
Outcome von Patienten nach Hämatopoetischer
Stammzelltransplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Diepold, Marie Christin geb. Katz

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Flatz

Tag der Disputation: 07.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation	- 1 -
1.2 Graft-versus-Host Disease	- 2 -
1.3 Immuntherapien	- 3 -
1.4 Neuroblastom	- 5 -
1.5 Natürliche Killerzellen	- 6 -
1.6 KIR - Killer cell immunoglobulin-like receptors	- 7 -
1.6.1 KIR Ligand-Modell	- 8 -
1.6.2 B-Content Score	- 9 -
1.7 CH 14.18-Anti-GD2-Therapie	- 10 -
1.8 Fc-Gamma-Rezeptor (FcGR) Polymorphismus	- 11 -
1.9 SUFU - Suppressor of fused	- 12 -
1.10 Ziele der Arbeit	- 14 -
2. Material und Methoden	- 15 -
2.1 Material	- 15 -
2.1.1 Geräte	- 15 -
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	- 15 -
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Kits	- 16 -
2.1.3.1 KIR	- 16 -
2.1.3.2 FcGR2A	- 16 -
2.1.3.3 FcGR3A	- 17 -
2.1.3.4 SUFU	- 17 -
2.1.3.5 Gelelektrophorese	- 17 -
2.1.4 Primer	- 18 -
2.1.4.1 KIR	- 18 -
2.1.4.2 FcGR2A	- 18 -
2.1.4.3 FcGR3A	- 19 -
2.1.4.4 SUFU	- 19 -
2.1.5 DNA-Proben und klinische Daten	- 19 -
2.2 Methoden	- 20 -
2.2.1 DNA-Isolation	- 20 -
2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	- 21 -
2.2.3 Quantitative Real-Time PCR – KIR, FcGR3A und SUFU	- 21 -
2.2.3.1 PCR KIR	- 23 -
2.2.3.2 PCR FcGR3A	- 24 -
2.2.3.3 PCR SUFU	- 26 -
2.2.4 Konventionelle PCR mit Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) - FcGR2A	- 27 -
2.2.5 Gelelektrophorese	- 28 -
2.3 Software und Statistik	- 29 -
3. Ergebnisse	- 30 -
3.1 KIR	- 30 -

3.1.1	KIR Haplotyp Bestimmung mittels Schmelzkurvenanalyse	30 -
3.1.2	Überlebenszeitanalyse aller KIR-typisierten pädiatrischen Patienten.....	31 -
3.1.2.1	Patientencharakteristika	31 -
3.1.2.2	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach KIR Haplotyp ..	34 -
3.1.2.3	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach Remissionsstatus vor HSZT	35 -
3.1.2.4	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit vom B-Content Score	37 -
3.1.2.5	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit vom KIR Ligand-Modell	38 -
3.1.2.6	Verteilung der Inzidenzen der GvHD in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp	39 -
3.1.3	Überlebenszeitanalyse der pädiatrischen Neuroblastom Patienten	40 -
3.1.3.1	Patientencharakteristika	40 -
3.1.3.2	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach KIR Haplotyp ..	42 -
3.1.3.3	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach Remissionstatus vor HSZT	43 -
3.1.3.4	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach B-Content Score.....	45 -
3.1.3.5	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit vom KIR Ligand-Modell	45 -
3.1.3.6	Verteilung der Inzidenzen der GvHD in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp	46 -
3.2	FcGR und CH 14.18-Antikörper-Therapie	48 -
3.2.1	FcGR-Genotyp Bestimmung mittels PCR.....	48 -
3.2.2	Patientencharakteristika	50 -
3.2.3	Überlebenszeitanalyse der mit CH 14.18-Antikörper therapierten Patienten.....	53 -
3.2.3.1	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach FcGR- Genotyp	53 -
3.2.3.2	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach Remissionsstatus vor Antikörpertherapie	55 -
3.2.3.3	Hoch- und niederaffine FcGR-Gruppen und ihr Einfluss auf Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben	57 -
3.2.3.4	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit der Anzahl an erhaltenen CH 14.18-Antikörperzyklen	60 -
3.2.3.5	Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit einer n-myc-Amplifikation	61 -
3.3	SUFU.....	62 -
3.3.1	SUFU-Genotyp Bestimmung mittels PCR.....	62 -
3.3.2	Patientencharakteristika	62 -
3.3.3	Verteilung der Inzidenzen der GvHD in Abhängigkeit vom SUFU- Genotyp	65 -
3.3.4	Analyse weiterer potentieller Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer GvHD	69 -
3.3.4.1	Einfluss der Vorbehandlung des Stammzelltransplantats (Graft Manipulation) auf die Entwicklung einer aGvHD.....	69 -
3.3.4.2	Einfluss von Konditionierungstherapie und Ganzkörperbestrahlung auf die Entwicklung einer aGvHD	71 -
3.3.4.3	Einfluss der GvHD-Prophylaxe auf die Entwicklung einer aGvHD	73 -
3.3.5	Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp	76 -
4.	Diskussion.....	77 -

4.1	KIR	- 77 -
4.1.1	Relevanz des KIR Haplotyps bei pädiatrischen Patienten mit soliden Tumoren, insbesondere Neuroblastomen.....	- 77 -
4.1.2	Klinische Relevanz des Remissionsstatus vor HSZT.....	- 78 -
4.1.3	Einfluss des B-Content Score auf Ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben.....	- 78 -
4.1.4	Relevanz des KIR Ligand-Modells auf die Spenderauswahl.....	- 79 -
4.1.5	Einfluss des KIR Haplotyps auf die Inzidenz einer GvHD	- 81 -
4.1.6	Schlussfolgerung für die klinische Praxis.....	- 82 -
4.2	FcGR und CH 14.18-Antikörper-Therapie	- 82 -
4.2.1	Einfluss des FcGR-Genotyps (rs1801274 und rs396991) auf den Erfolg einer CH 14.18-Antikörpertherapie	- 83 -
4.2.2	Klinische Relevanz des Remissionsstatus vor Beginn einer Antikörpertherapie mit CH 14.18	- 85 -
4.2.3	Einfluss der Anzahl an erhaltenen Antikörperzyklen auf die Prognose der Neuroblastompatienten	- 85 -
4.2.4	Relevanz einer n-myc-Amplifikation für das Outcome der Neuroblastompatienten	- 86 -
4.2.5	Schlussfolgerung für die klinische Praxis.....	- 87 -
4.3	SUFU.....	- 87 -
4.3.1	Einfluss des SUFU SNPs rs17114808 auf die Entwicklung einer GvHD nach HSZT	- 87 -
4.3.2	Klinische Relevanz des SUFU-Genotyps bei AML- und ALL-Patienten ...	- 89 -
4.3.3	Einfluss von Konditionierungstherapie und Ganzkörperbestrahlung auf die Entwicklung einer aGvHD	- 90 -
4.3.4	Einfluss des SUFU-Genotyps auf die Überlebenszeit nach HSZT	- 91 -
4.3.5	Schlussfolgerung für die klinische Praxis.....	- 91 -
5.	Zusammenfassung.....	- 92 -
6.	Literaturverzeichnis	- 94 -
7.	Erklärung zum Eigenanteil.....	- 103 -
8.	Veröffentlichungen	- 104 -
9.	Anhang.....	- 105 -
	Danksagung	- 0 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Berechnung des B-content Scores anhand der Anzahl an B-Motiven. Modifiziert nach Cooley et al. (2010)	9 -
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte	15 -
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	15 -
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die DNA-Isolation.....	16 -
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die KIR-Typisierung	16 -
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die FcGR2A-Typisierung..	16 -
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die FcGR3A-Typisierung..	17 -
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die SUFU-Typisierung.....	17 -
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Geräte für die Gelelektrophorese	17 -
Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer für die KIR-Typisierung	18 -
Tabelle 11: Reaktionsansatz für die KIR-PCR	23 -
Tabelle 12: PCR-Protokoll für die KIR-PCR	23 -
Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermixes für die KIR-PCR.....	23 -
Tabelle 14: Reaktionsansatz für die FcGR3A-PCR.....	24 -
Tabelle 15: PCR-Protokoll für die FcGR3A-PCR.....	25 -
Tabelle 16: Zusammensetzung des Mastermixes für die FcGR3A-PCR	25 -
Tabelle 17: Reaktionsansatz für die SUFU-PCR.....	26 -
Tabelle 18: PCR-Protokoll für die SUFU-PCR.....	26 -
Tabelle 19: Reaktionsansatz für die FcGR2A-PCR.....	27 -
Tabelle 20: PCR-Protokoll für die FcGR2A-PCR.....	27 -
Tabelle 21: Reaktionsansatz für den enzymatischen Verdau des FcGR2A-PCR-Produkts.....	28 -
Tabelle 22: Patientencharakteristika der KIR-typisierten Patienten	32 -
Tabelle 23: Patientencharakteristika der KIR-typisierten Neuroblastompatienten....	40 -
Tabelle 24: Patientencharakteristika unterteilt nach FcGR2A-Genotyp	50 -
Tabelle 25: Patientencharakteristika unterteilt nach FcGR3A-Genotyp	52 -
Tabelle 26: Patientencharakteristika unterteilt nach SUFU Genotyp. Modifiziert nach Katz et al. (2018)	63 -
Tabelle 27: Schweregrad der akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD) in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp.....	66 -
Tabelle 28: Untergruppen SUFU – Erwachsene. Nach Katz et al. (2018)	67 -
Tabelle 29: Untergruppen SUFU – Kinder. Nach Katz et al. (2018).....	68 -
Tabelle 30: Vergleich der Patientencharakteristika zwischen den Patientengruppen mit und ohne Auftreten einer akuten Graft-versus-Host Disease.....	69 -
Tabelle 31: Inzidenz Graft-versus-Host Disease (GvHD) in Abhängigkeit von den zur GvHD-Prophylaxe erhaltenen Medikamente.....	73 -
Tabelle 32: Nomenklatur der KIR-Rezeptoren. Modifiziert nach Marsh et al. (2003)	105 -
Tabelle 33: Überblick über die bisher bekannten KIR Liganden. Modifiziert nach Michaelis (2015) und van Duin et al. (2014)	106 -
Tabelle 34: Übersicht der zentromerischen (Cen) und telomerischen (Tel) Genmotive. Modifiziert nach Cooley et al. (2010)	106 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nomenklatur der KIR am Beispiel von KIR3DL1 nach Marsh et al. (2003)	- 7 -
Abbildung 2: Schematisierte Darstellung der Interaktion des Anti-GD2-Antikörpers CH 14.18 mit dem Oberflächenantigen GD2 auf Neuroblastomzellen (NB) und den FcGR auf Immunzellen	- 10 -
Abbildung 3: A: Funktionsprinzip SybrGreen während der PCR-Amplifikation. B: Funktionsprinzip TaqMan-Sonden während der PCR-Amplifikation.	- 22 -
Abbildung 4: Beispielhafte Schmelzkurven eines gesunden Spenders mit KIR Haplotyp B	- 31 -
Abbildung 5: A Ereignisfreies Überleben von Patienten mit KIR Haplotyp A bzw. B-Spendern; B Gesamtüberleben von Patienten mit KIR Haplotyp A- bzw. B-Spendern in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	- 34 -
Abbildung 6: Rezidivrate der KIR A und B- Patienten in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	- 35 -
Abbildung 7: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Patienten getrennt nach Remissionsstatus vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) in Jahren nach HSZT	- 36 -
Abbildung 8: Ereignisfreies Überleben (A+B) und Gesamtüberleben (C+D) getrennt nach KIR Haplotyp A und B in Abhängigkeit vom Remissionsstatus vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT), jeweils in Jahren nach HSZT	- 37 -
Abbildung 9: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Patienten in Abhängigkeit vom B-Content Score in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	- 38 -
Abbildung 10: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) abhängig von den HLA-Mismatches in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	- 39 -
Abbildung 11: Inzidenz von akuter (A+B) und chronischer (C+D) Graft-versus-Host Disease (aGvHD bzw. cGvHD) in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp.....	- 40 -
Abbildung 12: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten getrennt nach KIR Haplotyp in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	- 42 -
Abbildung 13: Rezidivrate der KIR A und B-Patienten in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	- 43 -
Abbildung 14: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten getrennt nach Remissionsstatus vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) in Jahren nach HSZT.....	- 44 -
Abbildung 15: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten getrennt nach KIR Haplotyp und Remissionsstatus vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) in Jahren nach HSZT.....	- 44 -
Abbildung 16: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten in Abhängigkeit vom B-Content Score in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	- 45 -
Abbildung 17: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten in Abhängigkeit von den HLA-Mismatches in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	- 46 -

Abbildung 18: Inzidenz von akuter (A+B) und chronischer (C+D) Graft-versus-Host Disease (aGvHD bzw. cGvHD) der Neuroblastompatienten (NB) in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp.....	47 -
Abbildung 19: Gelelektrophorese zur Bestimmung des FcGR2A-Genotyps	48 -
Abbildung 20: Schmelzkurven einer FcGR3A Real-Time PCR für die Genotypen FF (A), VV (B) und VF (C).....	49 -
Abbildung 21: Ereignisfreies Überleben (A+C) und Gesamtüberleben (B+D) nach FcGR-Genotyp in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18.....	54 -
Abbildung 22: Rezidivrate abhängig vom FcGR2A (A) bzw. FcGR3A-Genotyp (B) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18	55 -
Abbildung 23: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18 (Ak) unterteilt nach Remissionsstatus vor Antikörpertherapie.....	56 -
Abbildung 24: Ereignisfreies Überleben (A+C) und Gesamtüberleben (B+D) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie unterteilt nach Genotyp und Remissionsstatus vor Antikörpertherapie mit CH 14.18.....	57 -
Abbildung 25: Einteilung der FcGR Genotypen in hoch- und niederaffine Gruppen -	57 -
Abbildung 26: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der hoch- und niederaffinen Gruppe in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18	58 -
Abbildung 27: Rezidivrate der hoch- und niederaffinen Gruppe in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18	58 -
Abbildung 28: Ereignisfreies Überleben (A, C) und Gesamtüberleben (B, D) der hoch- und niederaffinen Gruppe in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie unterteilt nach Remissionsstatus vor Antikörpertherapie mit CH 14.18	59 -
Abbildung 29: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie unterteilt nach Anzahl der erhaltenen CH 14.18 - Antikörperzyklen.....	60 -
Abbildung 30: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18 nach Vorhandensein einer n-myc-Amplifikation	61 -
Abbildung 31: Beispiel eines PCR-Laufes zur Bestimmung des SUFU-Genotyps....	62 -
Abbildung 32: Inzidenz (A, C) und Schweregrad (B, D) der akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD) in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp.....	66 -
Abbildung 33: Ausprägung einer akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD) in Abhängigkeit von einer vorausgegangenen Ganzkörperbestrahlung bei adulten Patienten mit Genotyp CC (A) bzw. CT/TT (B) und Ausprägung einer aGvHD in Abhängigkeit von Konditionierungstherapie mit dosisreduzierter (RIC) bzw. myeloablativer Konditionierung (MAC) bei adulten Patienten mit Genotyp CC (C) bzw. CT/TT (D)	73 -
Abbildung 34: Inzidenz und Schweregrad der aGvHD der adulten (A) und pädiatrischen (B) Patienten, abhängig von den zur GvHD-Prophylaxe erhaltenen Medikamenten	74 -
Abbildung 35: Inzidenz und Schweregrad der aGvHD in Abhängigkeit von den zu GvHD-Prophylaxe erhaltenen Medikamenten. Separat für AML und ALL Patienten.....	75 -

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity / Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis / Antikörperabhängige Phagozytose
aGvHD	acute graft-versus-host disease /akute Transplantat-gegen-Empfänger Reaktion
CAR	Chimeric Antigen Receptor / chimärer Antigenrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CDC	complement-dependend cytotoxicity / Komplementabhängige Zytotoxizität
cGvHD	chronic graft-versus-host disease / chronische Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion
CR	complete remission / komplette Remission
ds-DNA	doppelsträngige DNA
EFÜ	Ereignisfreies Überleben
FcGR	Fc-Gamma-Rezeptor
GÜ	Gesamtüberleben
GvT	graft-versus-tumor effekt / Transplantat-gegen-Tumor-Effekt
Hh-Signalweg	Hedgehog-Signalweg
hHSZT	haploidente hämatopoetische Stammzelltransplantation
HLA	human leukocyte antigen / humanes Leukozyten-Antigen
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
Ig	Immunglobulin
LFU	Letztes Follow up
mABs	monoklonale Antikörper
MAC	myeloablative conditioning / myeloablative Konditionierung
MM	HLA-Mismatches
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NRM	non-relapse mortality / Nicht-rezidivbedingte Sterblichkeit
PBSC	peripheral blood stem cells / periphere Blutstammzellen
PR	partial remission / Teilremission
RIC	reduced intensity conditioning / dosisreduzierte Konditionierung
SD	stable disease / stabile Erkrankung
SNP	single nucleotide polymorphism
TBI	total body irradiation / Ganzkörperbestrahlung
TLI	total lymphoid irradiation / totale lymphatische Bestrahlung
URD Transplantation	un-related donor Transplantation
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid

1. Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist heute eine wichtige therapeutische Option bei der Behandlung vieler maligner und nicht-maligner Erkrankungen, z.B. Hämoglobinopathien, schweren Autoimmunerkrankungen oder Immundefekten. Transplantiert werden dabei, innerhalb eines komplexen Behandlungsregimes nach Therapie der Grunderkrankung und einer Konditionierungstherapie (u. a. Chemotherapie, Radiotherapie, Operation, Immuntherapie), hämatopoetische Stammzellen welche aus dem Knochenmark oder mittels Stammzellapherese aus dem Blut des Spenders¹ gewonnen werden, seltener auch aus Nabelschnurblut. Es wird zwischen autologer (Spender und Empfänger sind identisch) und allogener (Spender und Empfänger sind nicht identisch) Stammzelltransplantation unterschieden. Bei der allogenen HSZT können Spender und Empfänger entweder HLA-identisch sein, z.B. wenn die Spende durch einen passenden Fremdspender oder ein HLA-identisches Geschwisterkind erfolgt, oder es wird eine haploidente Stammzelltransplantation (hHSZT) durchgeführt.

Bei einer HLA-identischen Stammzellspende stimmen 10/10 HLA-Merkmalen überein, in Ausnahmefällen werden auch 1-2 HLA-Mismatches toleriert (8-9/10 match unverwandter Spender), wenn sonst kein geeigneter Spender zur Verfügung steht. Bei der haploidenten Stammzelltransplantation wird ein 5-8/10 match Familienspender ausgewählt. Da die Wahrscheinlichkeit für ein zum Patienten HLA-identisches Geschwisterkind nur bei 25% liegt, können so im Rahmen einer hHSZT z.B. auch die Eltern als Spender fungieren, obwohl sie nicht HLA-identisch sind, was v. a. bei erkrankten Kinder die Wahrscheinlichkeit auf einen passenden Spender erhöht.

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich/weiblich/divers verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten, sofern nicht ausdrücklich abweichend erwähnt, für alle Geschlechter gleichermaßen.

Da bei einer solchen hHSZT allerdings HLA-Inkompatibilität vorliegt, muss insbesondere hier die Anzahl an T- und B-Lymphozyten im Transplantat minimiert werden um das Risiko für eine Graft-versus-Host Disease (GvHD) sowie eine Abstoßungsreaktion zu verringern. Dies erfolgt mittels immunmagnetischer Verfahren entweder über CD3/CD19 Depletion (Negativselektion) oder über CD34 bzw. CD133 Selektion (Positivselektion). Bei der Positivselektion werden hämatopoetische Stammzellen durch Markierung der Glykoproteine CD34 bzw. CD133 auf der Oberfläche der Stammzellen im Transplantat angereichert und so indirekt die Anzahl anderer Zellarten, insbesondere T- und B-Lymphozyten, aber auch aller anderer Leukozyten (Natürliche Killerzellen, Monozyten, antigenpräsentierende Zellen) minimiert. Dies ermöglicht eine Transplantation auch im haploidenten oder HLA-Mismatch-Setting ohne besonders hohes Risiko für eine schwere GvHD oder Transplantatabstoßung. Eine direkte Entfernung der T- und B-Lymphozyten erfolgt durch die CD3/CD19 Depletion, hier erfolgt die Markierung über die Oberflächen Proteine CD3 und CD19. NK-Zellen und andere hämatopoetische Zellen bleiben bei diesem Verfahren erhalten und ermöglichen so ein erleichtertes Engraftment, einen stärkeren Antitumoreffekt (Graft-versus-Tumor, GvT) und eine schnellere Immunrekonstruktion. Dies ermöglicht u. a. auch Transplantationen nach dosisreduzierter Konditionierungstherapie (RIC) beispielsweise bei stark vorbehandelten oder komorbiden Patienten bei denen eine myeloablative Konditionierungstherapie (MAC) nicht möglich wäre. Darüberhinaus findet noch die α/β -T-Zell-Rezeptor (TCR 2) Depletion Anwendung, welche im Vergleich zur CD3/CD19 Depletion lediglich die für die Entstehung der GvHD relevanten T-Helferzellen und cytotoxischen T-Zellen aus dem Transplantat entfernt, während NK-Zellen und γ/δ^+ -Zellen enthalten bleiben und so Engraftment, GvT-Effekt und Immunabwehr unterstützen können. (DGTI, 2016)

1.2 Graft-versus-Host Disease

Die Graft-versus-Host Disease (GvHD) ist neben Infektionen die häufigste Komplikation nach einer Stammzelltransplantation (Ferrara et al., 2009). Das

„neue Immunsystem“ (Immunzellen die aus transplantierten Stammzellen des Spenders hervorgegangen sind) greift die Gewebe des Empfängers an, da diese aufgrund differenter Gewebsmerkmale als „fremd“ erkannt werden (Welniak et al., 2007). Am häufigsten manifestiert sich die akute GvHD (aGvHD) an Haut, Darm und Leber, aber auch die Lunge kann betroffen sein (Vogelsang et al., 2003). Es wird unterschieden zwischen der akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD), welche zwischen Tag 0 und 99 nach HSZT auftritt und eine systemische entzündliche Erkrankung ist und der chronischen Graft-versus-Host Disease (cGvHD), welche per Definition ab Tag 100 nach HSZT auftritt und deren Symptome den autoaggressiven Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis ähneln. (Lee et al., 2003) Zudem gibt es eine late-onset-acute GvHD (Symptome einer aGvHD aber Beginn erst nach Tag 100) sowie Overlap-Syndrome (Jagasia et al., 2015, Welniak et al., 2007). Die aGvHD wird je nach Ausprägung der Symptome an Haut, Darm und Leber in vier Schweregrade (leicht, moderat, schwer, lebensgefährlich) eingeteilt. Das Risiko für die Entwicklung einer GvHD steigt mit der Anzahl der HLA-Mismatches (Ferrara et al., 2009). Um dieses Risiko zu minimieren, wird die Stammzellspende (Graft) vor der Transplantation vorbehandelt (siehe Kapitel 1.1) und der Empfänger vor der HSZT und die ersten Monate danach immunsupprimiert.

Am häufigsten ist die aGvHD der Haut (81 % der Patienten mit aGvHD), ein makulopapulöses Exanthem, welches oft schon zeitgleich mit dem Engraftment der Donorzellen auftritt (Ferrara et al., 2009, Vogelsang et al., 2003). Mit ca. 50 % folgen die gastrointestinale aGvHD, einhergehend mit v. a. Diarrhoen aber auch Übelkeit und abdominellen Schmerzen, sowie die hepatische aGvHD mit Schädigung des Leberparenchyms und Anstieg der Bilirubinwerte (Martin et al., 1990).

1.3 Immuntherapien

Neben der Radiotherapie und der Chemotherapie nimmt die Immuntherapie bei der Behandlung zahlreicher maligner Erkrankungen eine immer bedeutendere Rolle ein. Dabei werden die körpereigenen Mechanismen zur Abwehr aberranter Zellen gestärkt und gezielt auf die malignen Zellen gerichtet. So wird versucht,

die von den Tumorzellen entwickelten „Ausweichstrategien“ zu umgehen und sie wieder für die Immunzellen erkennbar und angreifbar zu machen.

Die älteste Form der Immuntherapie ist die allogene Stammzelltransplantation, bei der durch eine Radio- und/oder Chemotherapie zunächst das körpereigene Immunsystem und Knochenmark zerstört wird und anschließend hämatopoetische Stammzellen eines Spenders transplantiert werden. Das „neue“ Immunsystem aus Zellen des Spenders soll dann die verbliebenen Tumorzellen als fremd erkennen und bekämpfen, dies wird als Graft-vs-Leukämie oder Graft-vs-Tumor-Effekt bezeichnet.

Beispiele für neuere Immuntherapeutika sind Checkpoint-Inhibitoren, CAR-T-Zellen (Chimeric Antigen Receptor-T-cells) und therapeutische Antikörper. Checkpoint-Inhibitoren sind monoklonale Antikörper, die in inhibitorische Signalwege eingreifen um die „Bremsen“ des körpereigenen Immunsystems zu lösen, damit eine verstärkte Immunreaktion zu ermöglichen und so der Immunevasion der Tumoren zu begegnen (Peggs et al., 2006, Zhang et al., 2021). CAR-T-Zellen sind aktivierte körpereigene T-Zellen, die im Labor so modifiziert werden, dass sie bestimmte Tumorantigene erkennen und bekämpfen (Ureña-Bailén et al., 2019).

Darüber hinaus werden auch dem Patienten verabreichte, biotechnologisch hergestellte Antikörper eingesetzt, v. a. als sogenannte Target-Therapie, um Stoffwechselfvorgänge in den Tumorzellen zu blockieren, seltener auch als bispezifische Antikörper, die sich an die Tumorzellen anheften und sie so für Immunzellen erkennbar machen. Zunächst wurden hierfür Antikörper mit murinem Ursprung genutzt, welche jedoch starke adverse Immunreaktionen im menschlichen Körper auslösten und dabei lediglich eine geringe Wirksamkeit gegenüber malignen Zellen aufwiesen. Daher wurden in der Folge chimäre und vollständig humane Antikörper entwickelt, welche sich seither durch Initiierung von ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity), ADCP (antibodydependent cellular phagocytosis) und CDC (complementdependent cytotoxicity) als wirkungsvolle Immuntherapeutika erweisen (Dahal et al., 2015).

Zytokine und immunmodulatorische Medikamente, wie zum Beispiel Thalidomid, dienen der Immunmodulation und werden nur indirekt der Immuntherapie zugeordnet.

Nebenwirkungen der Immuntherapien sind v. a. autoimmuner Genese, da sich die Therapeutika nicht ausschließlich gegen die aberranten Zellen, sondern auch gegen gesunde körpereigene Zellen richten. Nach einer HSZT können sich die transplantierten Immunzellen gegen den Empfängerorganismus richten und so eine schwere GvHD verursachen, die zur Schädigung verschiedenster Organe führen kann und teilweise nur schwer therapierbar ist. Auch Entzündungen, beispielweise der Hypophyse, des Darms, der Haut und der Augen können so ausgeprägt sein, dass eine Immuntherapie beendet werden muss (Hodi et al., 2010).

1.4 Neuroblastom

Neuroblastome sind Neoplasien des sympathischen Nervensystems und mit 8-10 % der kindlichen Tumore die häufigsten extrakraniellen soliden Tumore im Kindesalter (Colon and Chung, 2011, Park et al., 2010). Die Tumore stammen von Zellen der Neuralleiste ab und können somit im Bereich des sympathischen Grenzstranges und des Nebennierenmarks auftreten, die häufigste Lokalisation (65-70 %) liegt im Bereich des Abdomens (Kushner, 2004). Die klinische Symptomatik ist variabel: Neben unspezifischen Symptomen wie Fieber und Gewichtsverlust können abhängig von der Lokalisation, der Größe und Invasivität des Tumors oder der Metastasen beispielsweise Bauchschmerzen, Obstipation, Dysphagie, Stridor, Horner-Syndrom, Knochenschmerzen oder Paralysen auftreten. Aufgrund der neuroendokrinen Eigenschaften der Zellen kann es zu einer erhöhten Katecholaminproduktion kommen, welche zu Hypertonie und Tachykardie führt. Durch paraneoplastische Sekretion von VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid) können zudem Durchfälle und Elektrolytverschiebungen verursacht werden (Colon and Chung, 2011, Ishola and Chung, 2007).

Die Prognose der Erkrankung ist abhängig von Tumorstadium, Alter des Kindes (bei Säuglingen ist auch im metastasierten Stadium eine spontane Regression des Tumors möglich) und biologischen Faktoren des Tumors, z.B.

Histopathologie oder n-myc-Expression. N-myc ist ein Transkriptionsfaktor, das Protein des Onkogens MYCN, wird er überexprimiert, kann dies zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Neuroblastompatienten mit einer n-myc-Amplifikation haben eine schlechtere Prognose als Patienten ohne eine solche Amplifikation und werden daher als Hochrisikopatienten eingestuft. (Brodeur, 2003, Smith and Foster, 2018)

1.5 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie bilden eine Untergruppe der Leukozyten (ca. 10-15 %) und dienen der Erkennung und Abwehr virusinfizierter und aberranter Zellen. Sie können selbst keine Antikörper exprimieren, besitzen jedoch Rezeptoren für Fc-Segmente, so dass sie sich an mit Antikörpern beladenen Zellen anheften können. Darüber hinaus besitzen NK-Zellen noch viele weitere Rezeptoren wie Ly49, KIRs, CD94/NKG2-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle (Lanier, 1998, Raulet et al., 2001). Sie haben die Fähigkeit Zellen zu erkennen, welche weniger oder keine HLA-1 Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren und können so auch Tumorzellen mit fehlender MHC-1 Expression abtöten (missing-self-Hypothese) (Cruz-Munoz et al., 2019, Ljunggren and Karre, 1990). Wird eine aberrante Zelle von NK-Zellen erkannt, wird sie durch die Sekretion von Perforinen und Granzymen aus den Granula der NK-Zellen, welche dann zur Schädigung der Zellwand der Zielzelle und anschließender Apoptose führen, abgetötet (Lanier, 2005).

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation, da sie verbliebene Tumorzellen erkennen und abtöten können (Graft-vs-Tumor-Effekt) (Velardi et al., 2002). Die Aktivierung der NK-Zellen erfolgt Antigen-unabhängig und wird durch eine Vielzahl verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. (Lanier, 2005, Moretta et al., 2001, Raulet et al., 2001) Die genauen Mechanismen der NK-Zell Aktivierung und Apoptoseinduktion unterliegen weiterhin der aktuellen Forschung, da insbesondere der Einfluss von Co-Rezeptoren noch nicht abschließend geklärt ist.

1.6 KIR - Killerzell immunoglobuline-like receptors

Die Familie der „killerzell immunoglobuline-like receptors“ (KIR) bildet einen Teil der Regulatormoleküle, welche vor allem auf NK-Zellen exprimiert werden. Darüber hinaus sind sie auch auf manchen Subpopulationen von T-Lymphozyten zu finden. (Uhrberg et al., 2001)

KIRs spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort des angeborenen Immunsystems, da sie mit den HLA-Molekülen der Klasse 1 interagieren und so je nach Art des KIR-Rezeptors zur Aktivierung der NK-Zellen (bei Kontakt zu veränderten Zellen, z.B. Tumorzellen) oder Inhibition derselben (bei Kontakt zu gesunden körpereigenen Zellen) führen. So vermitteln sie die NK-spezifische Zytolyse, bzw. verhindern eben jene bei Interaktion der NK-Zelle mit körpereigenen Zellen, welche unveränderte HLA-Moleküle exprimieren. (Harel-Bellan et al., 1986, Mehta and Rezvani, 2016)

Aktuell sind 15 KIR-Gene und zusätzlich 2 Pseudogene, welche nicht exprimiert werden, bekannt. Alle Gene sind auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert und können in 2 Subgruppen – mit 2 bzw. 3 extrazellulären Ig-ähnlichen-Domänen – eingeteilt werden (Lanier, 1998). Die polymorphe Genfamilie befindet sich im Leukozyten-Rezeptorkomplex und wird unabhängig von den HLA-Genen vererbt (Bashirova et al., 2006, Uhrberg et al., 1997). Da es sich bei den KIRs um Moleküle des Immunsystems handelt, besitzen sie ein Cluster of differentiation (CD), nach ihren biochemischen und funktionellen Eigenschaften werden sie als CD158-positiv bezeichnet. (Marsh et al., 2003) Darüber hinaus gibt es für die genauere Charakterisierung der KIR-Gene eine eigene Nomenklatur entsprechend der Struktur des von ihnen kodierten Rezeptors (vgl. auch Kapitel 9, Tabelle 32).

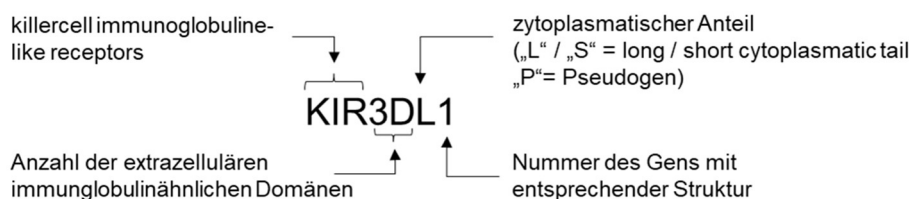


Abbildung 1: Nomenklatur der KIR am Beispiel von KIR3DL1 nach Marsh et al. (2003)

Welche Signale ein KIR-Protein auslöst ist abhängig davon, ob es einen kurzen oder langen zytoplasmatischen Anteil aufweist. Proteine mit kurzem zytoplasmatischen Anteil weisen in ihrer Transmembranregion eine positiv-geladene Aminosäure auf, wodurch sie in Assoziation mit einem DAP12-Signalmolekül, welches ein ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) enthält, ein aktivierendes Signal auslösen können. (Bakker et al., 2000, Vilches and Parham, 2002) Proteine mit langem zytoplasmatischen Anteil enthalten hingegen typischerweise zwei inhibitorische Immun-Tyrosin-basierte Motive (Immune Tyrosine Inhibitory Motifs, ITIM), über die sie ein inhibitorisches Signal übermitteln (Lanier, 1998, Olcese et al., 1997).

Die Liganden der KIR-Rezeptoren sind polymorphe Epitope der HLA-Moleküle (Uhrberg et al., 1997, Sawicki et al., 2001).

Die individuelle Ausstattung mit KIR-Rezeptoren ist variabel in Anzahl und Art der Rezeptoren, sodass es viele verschiedene Haplotypen gibt. Um das Klassifikationssystem möglichst einfach zu gestalten, wird in Abhängigkeit vom Vorhandensein bestimmter KIR-Gene zwischen KIR Haplotyp A und KIR Haplotyp B unterschieden. Ein Haplotyp B liegt vor, wenn mindestens eines der folgenden Gene vorhanden ist: KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 oder KIR3DS1. Er ist somit vor allem durch das Vorhandensein von aktivierenden KIRs gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu weist der Haplotyp A lediglich KIR2DS4 und KIR2DL4 als aktivierende Rezeptoren auf und ist durch das Fehlen der oben genannten Gene charakterisiert. (Hsu et al., 2002, Marsh et al., 2003, Uhrberg et al., 1997)

1.6.1 KIR Ligand-Modell

Die Arbeitsgruppe um Loredana Ruggeri fand heraus, dass die KIR Ligand-Inkompatibilität stark mit der NK-Zell-Alloreaktivität korreliert, welche wiederum zu einer geringeren Rezidivrate, weniger GvHD und besseren Überlebensraten der AML-Patienten führte (Ruggeri et al., 2002). Aus diesen Erkenntnissen wurde das KIR Ligand-Modell entwickelt, um anhand der bei Spender und Empfänger vorliegenden KIRs und HLA-Liganden die NK-Zell Alloreaktivität vorherzusagen. Aus den HLA-Liganden und den inhibitorischen KIRs wird ein HLA-Match bzw.

Mismatch (MM) zwischen Spender und Empfänger bestimmt, fehlt dabei dem Empfänger ein vom Spender exprimierter inhibitorischer KIR Ligand, kommt es aufgrund des fehlenden inhibierenden Signals an die NK-Zelle zur Alloreaktivität. Als KIR Liganden werden dabei HLA-I-Moleküle benannt (vgl. Kapitel 9, Tabelle 33). (Velardi et al., 2002)

1.6.2 B-Content Score

Sarah Cooley et al. untersuchten den Einfluss der KIR Haplotypen A und B auf das Rezidivrisiko und Gesamtüberleben von AML- und ALL-Patienten nach HLA-identischer HSZT. Während sie bei den ALL-Patienten keinen Einfluss finden konnten, zeigte sich bei den AML-Patienten eine unterschiedliche Prognose, je nach Haplotyp des Spenders. Dabei unterteilten sie die Haplotypen noch weiter anhand des Vorliegens der Genmotive A und B in den zentromerischen und telomerischen Regionen des Chromosoms in Cen-A und Cen-B, sowie Tel-A und Tel-B und errechneten aus den vorliegenden Kombinationen den sogenannten B-Content Score (siehe Tabelle 1) (Cooley et al., 2010).

Tabelle 1: Berechnung des B-content Scores anhand der Anzahl an B-Motiven. Modifiziert nach Cooley et al. (2010)

KIR Genotyp (Spender)	B-content Score	Zentromerische Region	Telomerische Region
A	0	A/A	A/A
B	1	A/A oder A/B	A/B oder A/A
	2	A/A oder A/B oder B/B	B/B oder A/B oder A/A
	3	A/B oder B/B	B/B oder A/B
	4	B/B	B/B

Es zeigte sich, dass Patienten mit Spendern, welche einen B-content Score ≥ 2 haben, ein geringeres Rezidivrisiko und ein verbessertes Gesamtüberleben hatten, als Patienten mit Spendern deren Score bei 0-1 lag. Ein Cen-B-Motiv wies darüber hinaus noch einen stärkeren protektiven Effekt im Vergleich zu einem Tel-B-Motiv auf.

Basierend auf dieser Veröffentlichung von Cooley et al. (2010) wurden Gruppen erstellt, in denen die Scores 0 = *Neutral*, 1+2 = *Better* und 3+4 = *Best* entsprechend dem *Donor KIR B-content group Calculator*² zusammengefasst werden.

1.7 CH 14.18-Anti-GD2-Therapie

CH 14.18 ist ein chimärer Antikörper, der sich gegen das Oberflächenantigen GD2 richtet, ein Gangliosid, welches in großer Menge auf Neuroblastomzellen exprimiert wird (Modak and Cheung, 2007). Darüber hinaus wird GD2 auch auf Melanomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Glioblastomen exprimiert, sowie physiologisch von Hirn- und Nervengewebe (Mujoo et al., 1987). CH 14.18 ist eine Weiterentwicklung des murinen Antikörpers 14G2a, welcher aufgrund seiner hohen Immunogenität zur Bildung von humanen Anti-Maus-Antikörpern geführt hatte. Für CH 14.18 wurde der konstante Teil des Antikörpers durch ein humanes IgG-Fc-Gen ersetzt, so dass nur noch der variable Teil des Antikörpers murinen Ursprungs ist und die Immunogenität deutlich reduziert werden konnte. (Handgretinger et al., 1995) Therapeutisch eingesetzt induziert CH 14.18, insbesondere in Kombination mit IL-2 (Interleukin-2) oder GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), nach Bindung an die Neuroblastomzellen durch ADCC und CDC eine Zytolyse; eine Bindung an Hirngewebe wird dabei durch die Blut-Liquor-Schranke verhindert (Barker and Reisfeld, 1993, Yu et al., 2010).

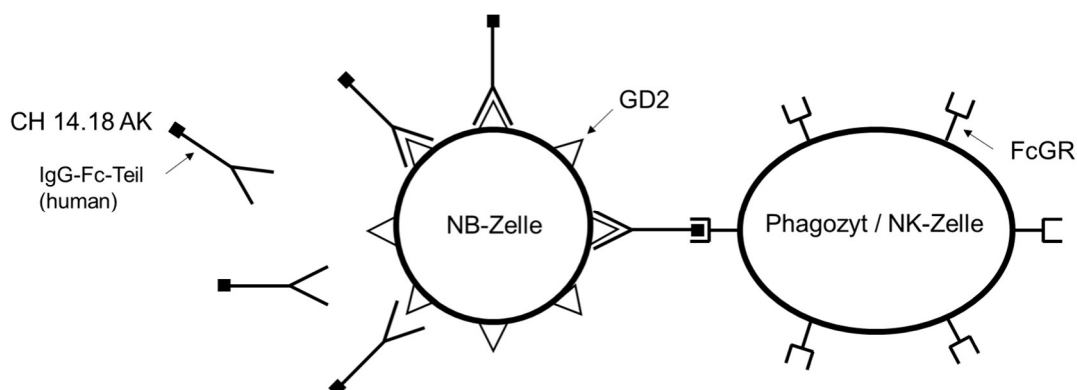


Abbildung 2: Schematisierte Darstellung der Interaktion des Anti-GD2-Antikörpers CH 14.18 mit dem Oberflächenantigen GD2 auf Neuroblastomzellen (NB) und den FcGR auf Immunzellen (AK = Antikörper, NK-Zelle = natürliche Killerzelle)

² http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html

Als Nebenwirkungen der Therapie treten, v. a. in den ersten Therapiezyklen, viszerale Schmerzen und neuropathische Extremitätenschmerzen während der Infusion des Antikörpers auf, welche regelhaft starke analgetische Therapie notwendig machen. Als weitere Nebenwirkungen können allergische Reaktionen mit capillary leak syndrome, Hautsymptomen mit starkem Juckreiz bis zum anaphylaktischen Schock, sowie vorübergehend auch Gelenkbeschwerden auftreten.

1.8 Fc-Gamma-Rezeptor (FcGR) Polymorphismus

Fc-Rezeptoren sind Membranrezeptoren, die sich auf diversen Zellen des Immunsystems finden. Nach ihrer Bindungsaffinität zu den Fc-Fragmenten der unterschiedlichen Immunglobuline unterscheidet man Fc α (CD89, bindet an IgA), Fc γ (CD64, CD32, CD16; bindet an IgG), Fc ϵ (bindet an IgE), Fc μ (bindet an IgM) und FcRn (neonataler Fc γ -Rezeptor, bindet mit schwacher Affinität an IgG).

FcGR, mit Ausnahme von FcGR2B, sind aktivierende Rezeptoren welche ADCC und CDC induzieren (Hanson and Barb, 2015).

Nahezu alle monoklonalen Antikörper, die aktuell therapeutisch eingesetzt werden scheinen direkt oder indirekt in Abhängigkeit von FcGR zu wirken (Dahal et al., 2015). Die Gene für die Fc γ -Rezeptoren befinden sich auf Chromosom 1. Es können 3 Klassen von Fc γ -Rezeptoren unterschieden werden, FcGR1 (=CD64), FcGR2 (=CD32) und FcGR3 (=CD16) (Gessner et al., 1998, Ravetch and Perussia, 1989). NK-Zellen exprimieren v. a. FcGR3A (=CD16); FcGR2A (=CD32) wird von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert. (Koehn et al., 2012, Nimmerjahn and Ravetch, 2008) Es treten diverse Polymorphismen (Austausch einzelner Basen eines Gens mit einer Häufigkeit von >1 % in der Bevölkerung) der Fc-Region auf, einige davon scheinen von klinischer Relevanz zu sein (Mellor et al., 2013). So kann man bei FcGR2A (rs1801274) u. a. durch einen Basenaustausch C \rightarrow T zwischen Allel R (mit der Aminosäure Arginin an Position 131) und Allel H (mit der Aminosäure Histidin an Position 131) unterscheiden (Warmerdam et al., 1991), aus denen sich dann die Genotypen FcGR2A RR, FcGR2A HR und FcGR2A HH ergeben. Entsprechend

entstehen bei FcGR3A (rs396991) durch einen Basenaustausch T → G die Genotypen FF, VF und VV aus den Allelen F (Phenylalanin an Position 158) und V (Valin an Position 158) (Koene et al., 1997, Wu et al., 1997). Die Allele unterscheiden sich in ihrer Bindungsaffinität zu humanen IgG-Molekülen, wobei die Allele H und V eine hohe Affinität und R und F eine niedrigere Affinität aufweisen (Koene et al., 1997, Mellor et al., 2013, Warmerdam et al., 1991, Wu et al., 1997). Die Ausstattung der Zellen mit den verschiedenen FcGR erwies sich wiederum als relevanter Einflussfaktor hinsichtlich des Erfolgs einer Immuntherapie (Cheung et al., 2006, Siebert et al., 2016, Wang et al., 2015).

1.9 SUFU - Supressor of fused

Supressor of fused (SUFU) ist ein cytoplasmatisches Protein, welches vom SUFU-Gen, einem Tumorsuppressor-Gen auf Chromosom 10q24.32, codiert wird (Taylor et al., 2002) und als negativer Regulator des Hedgehog-Signalwegs (Hh) agiert. (Cherry et al., 2013, Kogerman et al., 1999) Der Hh-Signalweg spielt während der Embryonalzeit eine entscheidende Rolle bei der Morphogenese (Zellwachstum und -differenzierung, Gewebe- und Organentwicklung). Im adulten Organismus ist er relevant für die Aktivierung der Immunantwort, Gewebereparatur und Regeneration, sowie für die Regulation der Stammzellteilung. (Cherry et al., 2013, Henao-Martinez et al., 2013) Störungen in diesem Signalweg führen somit während der Embryonalentwicklung zu Fehlbildungen, während Fehlfunktionen oder Funktionsverlust des Hh-Signalweges nach der Embryonalentwicklung an der Entwicklung diverser Tumore beteiligt sind. (Cherry et al., 2013 nach Barakat et al. (2010), Ingham et al. (2011), Jiang and Hui (2008), Nieuwenhuis and Hui (2005), Teglund and Toftgard (2010), Varjosalo and Taipale (2008))

Zusammengefasst läuft der Signalweg bei Säugetieren wie folgt ab: Ein Hh-Ligand bindet an Ptc, den Patched Membranrezeptor, welcher im ungebundenen Zustand das Transmembranprotein Smoothed (Smo) unterdrückt. Durch die Bindung des Liganden an Ptc wird die Unterdrückung von Smo aufgehoben, sodass dieser seine Funktion als Regulator der Transkriptionsfaktoren-Aktivität ausüben kann. Die Effektoren dieses Signalweges sind dann die

Transkriptionsfaktoren Gli 1-3 (Gliom-assoziiertes Zink-Finger Protein). Der Hauptregulator der Gli-Aktivität bei Säugetieren ist das Tumorsuppressorprotein SUFU. (Cherry et al., 2013 nach Cheng and Yue (2008), Dunaeva et al. (2003), Kogerman et al. (1999), Merchant et al. (2004))

SUFU reguliert, unabhängig vom Primär-Ziliium, über Beeinflussung der Produktion von Gli-Aktivatoren und Gli-Hemmern, sowie der Hemmung des Gli-abbauenden Proteins Spop, die Menge an Gli-Protein in der Zelle und die Transformation der Gli-Proteine in ihre aktivierende oder inhibierende Form als Transkriptionsfaktor und hierüber die Aktivität des Hh-Signalweges. In Abwesenheit von SUFU kommt es zu einer Liganden-unabhängigen, kontinuierlichen Aktivierung des Hh-Signalwegs. (Chen et al., 2009)

Es sind viele verschiedene SNPs (single nucleotide polymorphism, Austausch eines einzelnen Basenpaares) des SUFU-Gens mit, je nach Lokalisation auf dem Gen und Art des SNPs, unterschiedlichen Auswirkungen auf das daraus entstehende Protein, bekannt. Bari et al. (2015) beispielsweise untersuchten in ihrer Arbeit die Assoziation zwischen dem SNP rs17114808, bei welchem es sich um einen Austausch der Aminosäure Cytosin durch Thymin in der 3' untranslated region des SUFU-Gens auf Chromosom 10 handelt und der Inzidenz einer aGvHD bei Patienten nach HSZT. Sie fanden eine höhere Inzidenz an aGvHD bei für das Major-Allel (CC) homozygoten Patienten, verglichen mit Patienten welche heterozygot (CT) oder homozygot für das Minor-Allel (TT) waren. Der SNP reguliert die Menge an erzeugtem Transkript sowie die Menge an produziertem Protein. (Bari et al., 2015)

1.10 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit gliedert sich in 3 Teile, welche jeweils den Einfluss genetischer Varianten in Rezeptoren und Proteinen auf den Therapieerfolg maligner Erkrankungen, vorrangig pädiatrischer Patienten, mittels unterschiedlicher Immuntherapien in den Fokus nimmt.

Der erste Teil befasst sich mit den KIR-Rezeptoren. Basierend auf der Arbeit von Sebastian Michaelis zur klinischen Relevanz des KIR Haplotyps bei ALL-Patienten nach hHSZT (Michaelis, 2015) wird in dieser Arbeit die Bedeutung des KIR Haplotyps bei pädiatrischen Patienten mit soliden Tumoren, insbesondere Neuroblastomen, ebenfalls nach hHSZT, eruiert.

Teil zwei widmet sich den Fcγ-Rezeptoren. In Anlehnung an eine Arbeit von Nikolai Siebert (Siebert et al., 2016) wird die Relevanz der FcGR3A-Genotypen V gegenüber F, sowie FcGR2A H gegenüber R für die Therapie mit dem Ch14.18-Antikörper bei pädiatrischen Neuroblastompatienten untersucht.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem SNP rs17114808 des SUFU-Gens. In Bezug auf die Arbeit von Rafijul Bari (Bari et al., 2015) mit pädiatrischen Patienten wird in dieser Arbeit der Einfluss des SUFU-Genotyps auf die Wahrscheinlichkeit nach Stammzelltransplantation eine GvHD zu entwickeln für pädiatrische und adulte Patienten analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
	Kirsch
Kühlschrank (4°C)	Kirsch
Zentrifuge	Eppendorf Micro Centrifuge 5415C
	Hettich Rotina 420R
Vortexmischer	Heidolph REAX 2000
	JK MS1 Minishaker
Photometer	Thermo Scientific Peggab Nanodrop2000 Spectrophotometer
Pipetten	Eppendorf Research plus 0,5-10 µl
	Eppendorf Reference 0,5-10 µl
	Eppendorf 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl
Cycler	Bio-Rad CFX96™ Real-Time-System
	C1000™ Thermal Cycler
	Applied Biosystems GeneAmp® PCR System9700
Mikrowelle	DéLonghiPerfecto MW 311
Gelelektrophorese	PeqLab Elektrophorese-Apparatur für Agarosegele Modell 40-1214
	Bio-RAD Power PAC 200
Geldokumentation	Li-Cor Odyssey Fc

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Labormaterial	Artikel; Hersteller
Pipettenspitzen	Biosphere®Filter Tip 20, 100, 1000; Sarstedt
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 2 ml; Eppendorf
	Multiply®-Pro Gefäße 0,5 ml; Sarstedt
	Low-Profile PCR-Tubes; BioRad

Labormaterial	Artikel; Hersteller
Deckel	Opical Flat 8-Cap Strips; BioRad
DNA-Isolation	QIAamp DNA Blood Mini Kit®; Qiagen
Ethanol	Merck

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Kits

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die DNA-Isolation

Reagenz	Artikel; Hersteller
DNA-Isolation	QIAamp DNA Blood Mini Kit®; Qiagen
Ethanol	Merck

2.1.3.1 KIR

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die KIR-Typisierung

Reagenz	Artikel; Hersteller
SybrGreen Mix	KAPA SybrFast qPCR Master Mix; PeqLab
H2O	Nuclease-Free Water; Promega
	DEPC-Water RNase free; PeqLab
Primer	mwg operon; Eurofins genomics

2.1.3.2 FcGR2A

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die FcGR2A-Typisierung

Reagenz	Artikel; Hersteller
MasterMix	Go-Taq Colorless Master-Mix; Promega
Primer	mwg operon; Eurofins genomics
H2O	Nuclease-Free Water; Promega
	DEPC-Water RNase free; PeqLab
Puffer	Cut Smart; New England Biolabs
Enzym	BstUI; New England Biolabs

2.1.3.3 FcGR3A

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die FcGR3A-Typisierung

Reagenz	Artikel; Hersteller
SybrGreen	KAPA SybrFast qPCR Master Mix; PeqLab
H2O	Nuclease-Free Water; Promega
	DEPC-Water RNase free; PeqLab
Primer	mwg operon; Eurofins genomics

2.1.3.4 SUFU

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Reagenzien für die SUFU-Typisierung

Reagenz	Artikel; Hersteller
MasterMix	TaqMan® Genotyping Master Mix; LifeTechnologies
Primer	LifeTechnologies
Sonde FAM	TaqMan® 6FAM-MGBNFQ; LifeTechnologies
Sonde VIC	TaqMan® VIC-MGBNFQ; LifeTechnologies
H2O	Nuclease-Free Water; Promega
	DEPC-Water RNase free; PeqLab

2.1.3.5 Gelelektrophorese

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Geräte für die Gelelektrophorese

Reagenz	Artikel; Hersteller
TBE	Rotiphorese® 10x TBE Puffer; 1M Tris-Borat, 20mM EDTA-Puffer; Roth
Agarose	SeaKem® LE Agarose; Lonza
Fluoreszenzfarbstoff	GelRed™ Nucleic Acid, Gel Stain; Biotium
Ladepuffer	BlueJuice™, Gel Loading Buffer; Invitrogen
Ladder	100bp DNA Ladder; Invitrogen
Gelkammer	PeqLab Elektrophorese-Apparatur für Agarosegele Modell 40-1214; PeqLab

2.1.4 Primer

2.1.4.1 KIR

Für die KIR Haplotyp-Typisierung wurden die Primersequenzen (entsprechend IUB-Code) aus Arbeiten von Alves et al. und für KIR2DS3 von Vilches et al. entnommen (Alves et al., 2009, Vilches et al., 2007).

Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer für die KIR-Typisierung

Rezeptor	Forward	Reverse
2DL1	GTT GGT CAG ATG TCA TGT TTG AA	CCT GCC AGG TCT TGC G
2DL2	AAA CCT TCT CTC TCA GCC CA	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A
2DL3	AGA CCC TCA GGA GGT GA	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA
2DL4	TCA GGA CAA GCC CTT CTG C	GGA CAG GGA CCC CAT CTT TC
2DL5	ATC TAT CCA GGG AGG GGA G	CAT AGG GTG AGT CAT GGA G
3DL1	CCA TYG GTC CCA TGA TGC T	CCA CGA TGT CCA GGG GA
	TCC ATC GGT CCC ATG ATG TT	
3DL2	CAT GAA CGT AGG CTC CG	GAC CAC ACG CAG GGC AG
3DL3	AAT GTT GGT CAG ATG TCA G	GCY GAC AAC TCA TAG GGT A
2DS1	TCT CCA TCA GTC GCA TGA G	GGT CAC TGG GAG CTG AC
	TCT CCA TCA GTC GCA TGA A	
2DS2	TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	CCC TGC AAG GTC TTG CA
2DS3	CTT GTC CTG CAG CTC CT	GCA TCT GTA GGT TCC TCC T
2DS4	GGT TCA GGC AGG AGA GAA T	CTG GAA TGT TCC GTK GAT G
2DS5	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	CTG ATA GGG GGA GTG AGT
3DS1	CAT CGG TTC CAT GAT GCG	CCA CGA TGT CCA GGG GA
	CAT CAG TTC CAT GAT GCG	
2DP1	CGA CAC TTT GCA CCT CAC	GGG AGC TGA CAA CTG ATG
3DP1f1	GTG TGG TAG GAG CCT TAG	GAA AAC GGT GTT TCG GAA TAC
3DP1f2	GTA CGT CAC CCT CCC ATG ATG TA	GAA AAC GGT GTT TCG GAA TAC
GALC	TTA CCC AGA GCC CTA TCG TTC T	GTC TGC CCA TCA CCA CCT ATT

2.1.4.2 FcGR2A

Folgende von Jiang et al. (1996) vorgeschlagenen Primersequenzen wurden für die Bestimmung des FcGR2A Genotyps verwendet:

FcGR2A_Forward 5'GGA AAA TCC CAG AAA TTC TCG C3'
FcGR2A_Reverse 5'CAA CAG CCT GAC TAC CTA TTA CGC GGG3'

2.1.4.3 *FcGR3A*

Die Primersequenzen für die Bestimmung des FcGR3A Genotyps wurden entsprechend der Empfehlung von Dall'Ozzo et al. (2003) übernommen.

FcGR3A_Forward	5' TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGT C 3'
FcGR3A_Reverse V-Allel	5' AGA CAC ATT TTT ACT CCC ATC 3'
FcGR3A_Reverse F-Allel	5' GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCG GTG ATG TTC ACA GTC TCT GAT CAC ACA TTT TTA CTC CCA TA 3'

2.1.4.4 *SUFU*

Zur Bestimmung des SUFU-SNP-Genotyp wurden die Primersequenzen sowie die Basensequenzen der Sonden FAM und VIC aus der Arbeit von Bari et al. (2015) verwendet.

SUFU_Forward	5' CCC CTT TCC TGC CTT CTT ACC 3'
SUFU_Reverse	5' TCA TGA CTT TGC TTT GAA GAG GTG TA 3'
SUFU_6FAM	5' ATG GGA CTG TTA IAA TAC T-MGBNFQ 3'
SUFU_VIC	5' TGG GAC TGT TAC AAT ACT-MGBNFQ 3'

2.1.5 ***DNA-Proben und klinische Daten***

Der größte Teil der verwendeten DNA-Proben stammt von den gesunden Stammzellspendern (DNA-Proben für KIR-, FcGR-Genotypisierung) oder von den entsprechenden Patienten vor ihrer HSZT (SUFU-Typisierung). Diese DNA-Proben wurden im Rahmen routinediagnostischer Blutuntersuchungen durch das Chimärismuslabor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen gesammelt und bei - 20 °C aufbewahrt. Waren in diesem Rahmen keine Proben zu den jeweiligen Patienten, die typisiert werden sollten, vorhanden wurden entweder DNA-Proben des Patienten, welche nach der Transplantation gewonnen wurden und einen vollständigen Spenderchimärismus aufwiesen (somit äquivalent zur Spenderprobe) oder EDTA-Blut zur Gewinnung der DNA verwendet.

Die klinischen Daten der pädiatrischen Patienten stammen hauptsächlich aus den Verlaufs- und Entlassberichten der Patienten, welche im Krankenhausinformationssystem der Universitätsklinik Tübingen erfasst sind. Bei den erwachsenen Patienten, welche in die SUFU-Typisierung eingeschlossen wurden, stammt der größte Teil der klinischen Daten aus der Studienzentrale der Medizinischen Klinik - Innere Medizin II, welche uns freundlicherweise von Prof. Bethge zur Verfügung gestellt wurden. Darüber hinaus wurden ebenfalls die Verlaufs- und Entlassberichte der Patienten gesichtet. Für die pädiatrischen Patienten standen zusätzlich zu den Arztbriefen Daten aus der Studienzentrale der Kinderklinik (Ansprechpartner Prof. Handgretinger) und der Phase II-CH 14.18-Studie (Phase II feasibility study using CH 14.18/CHO antibody and subcutaneous interleukin 2 after haploidentical stem cell transplantation in children with relapsed neuroblastoma) (Ansprechpartner: Prof. Peter Lang) zur Verfügung. (Ethik-Votum Nr. 588/2011A; ClinicalTrials.gov (NCT02258815))

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

Der Großteil der verwendeten DNA-Proben war zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden und wurde vom Chimärismuslabor der Kinderklinik Tübingen bei - 20 °C gelagert, 13 Proben wurden vom KMT Labor der Kinderklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Weitere Proben wurden mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit® aus EDTA Vollblut gewonnen. Hierzu wurden 200 µl Vollblut, 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer in ein 1,5 µl Eppendorf Gefäß pipettiert und gevortext. Nach 10 min Inkubation bei 56 °C, wurden 200 µl 96%iges Ethanol dazugegeben, gevortext und kurz zentrifugiert. Als nächstes wurde der Probenmix auf eine QIAamp Mini Spin Column gegeben. Nach 1 min Zentrifugation bei 6000 g wurden 500 µl AW1-Puffer zum Waschen zugegeben, erneut zentrifugiert (1 min, 6000 g) und dann 500 µl AW2-Puffer auf die Säule pipettiert und nochmals zentrifugiert (3 min, 20000 g). Das Filtrat wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß gestellt und 10 µl Nuclease-freies Wasser zugegeben um die DNA zu

extrahieren. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde nochmals 1 min bei 6000 g zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung der DNA im Filtrat wurde abschließend photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2).

2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten und bereits aus der Routinediagnostik vorhandenen DNA-Proben erfolgte mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer. Hierbei wurde durch das Gerät die Absorption der DNA-Probe bei 260 nm Wellenlänge gemessen, da DNA und RNA bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum haben und hieraus durch den zugrundeliegenden Algorithmus die Konzentration in ng/µl bestimmt.

2.2.3 Quantitative Real-Time PCR – KIR, FcGR3A und SUFU

Die KIR-, FcGR3A- und SUFU-Genotypisierung erfolgte mittels Real-Time PCR. Diese bietet gegenüber der konventionellen PCR den Vorteil, dass das Reaktionsprodukt in Anschluss an die PCR nicht mittels einer Gelelektrophorese analysiert werden muss, um Rückschlüsse auf das Amplifikat zu erhalten. Stattdessen kann die Analyse mittels fluoreszierender Farbstoffe und anschließender Schmelzkurvenanalyse oder mit Hilfe von fluorogenen Sonden direkt anhand des PCR-Produktes erfolgen.

Für die KIR- und FcGR3A-Typisierung wurde der KAPA SYBR FAST qPCR Master-Mix von PeqLab verwendet, welcher den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I beinhaltet. Dieser Farbstoff lagert sich unspezifisch an die dsDNA an, wobei sich mit steigender dsDNA-Menge die Fluoreszenz erhöht. (siehe Abbildung 3A) Um zwischen verschiedenen spezifischen und unspezifischen Fragmenten zu unterscheiden, wird nach der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei Erreichen des Schmelzpunktes, welcher v. a. abhängig von Länge und Basenzusammensetzung des Fragments ist, denaturiert die dsDNA und der Farbstoff wird freigesetzt, was wiederum eine Änderung der Fluoreszenz bewirkt. Anhand des so bestimmten Schmelzpunktes kann dann der Rückschluss auf das amplifizierte Fragment erfolgen.

Für die SUFU-Typisierung wurde die Methode der TaqMan-Sonden genutzt. Die eingesetzten MGB-Sonden VIC und FAM bestehen aus Oligonukleotiden die an ihren Enden zwei unterschiedliche Farbstoffe tragen. Der Farbstoff am 3'-Ende wird als Quencher bezeichnet und verhindert bei räumlicher Nähe, dass der am 5'-Ende gebundene fluorogene Reporter-Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Während des PCR-Zyklus denaturiert die dsDNA und die Sonden, je nach Genotyp VIC oder FAM, können komplementär an die DNA-Stränge binden. Passen die Basensequenzen von DNA und Sonde vollständig zueinander wird die Sonde stabil an die DNA gebunden. Trifft nun die Taq-Polymerase im Laufe der Elongation des DNA-Strangs auf die Sonde wird die Exonucleaseaktivität des Enzyms aktiviert und die Sonde hydolytisch vom DNA-Strang abgespalten. Dabei werden Reporter- und Quencher-Farbstoff der Sonde voneinander getrennt und der Quencher kann nicht mehr verhindern, dass der Reporter bei einer spezifischen Wellenlänge fluoresziert (siehe Abbildung 3B). Je mehr Sonden nun durch passende Bindung an die amplifizierte DNA gespalten werden, desto stärker die Fluoreszenz und somit das gemessene Signal, woraus wiederum Rückschlüsse auf das amplifizierte DNA-Fragment gezogen werden können.

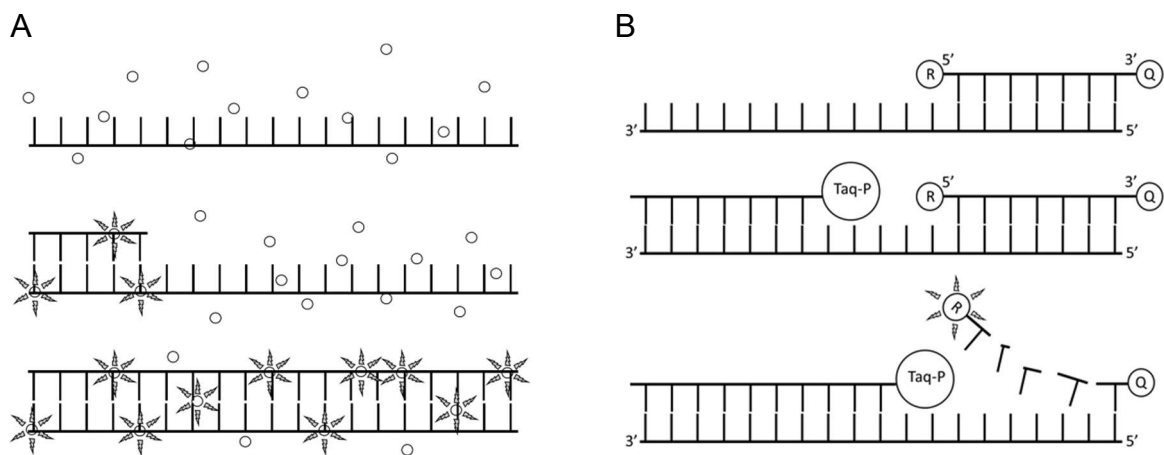


Abbildung 3: A: Funktionsprinzip SybrGreen während der PCR-Amplifikation. Mit steigender Menge an dsDNA steigt die Signalstärke an. B: Funktionsprinzip TaqMan-Sonden während der PCR-Amplifikation. Durch Spaltung der Sonde bei Synthese des komplementären DNA-Stranges beginnt der Reporter zu fluoreszieren.

(○) SybrGreen; * fluoreszierender Farbstoff; ||||| DNA-Strang; (R) Reporter-Farbstoff, (Q) Quencher-Farbstoff; |||||^{Taq-P} TaqMan-Sonde (VIC oder FAM))

Die Vorgehensweise für die Genotypisierung der verschiedenen Gene wird im Folgenden beschrieben (siehe Kapitel 2.2.3.1 - 2.2.5).

2.2.3.1 PCR KIR

Folgende Reaktionszusammensetzungen wurden verwendet (siehe Tabelle 11):

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die KIR-PCR

Reagenz	Volumen
SYBR Green Mix	5,0 µl
Genomische DNA	1,0 µl [10 ng/µl]
H ₂ O	1,2 µl
Primer-Mix	2,8 µl [1 µl Primer KIR _{Forward} ≙ 2,5 pmol] [1 µl Primer KIR _{Reverse} ≙ 2,5 pmol] [0,4 µl Primer GALC _{Forward} ≙ 1 pmol] [0,4 µl Primer GALC _{Reverse} ≙ 1 pmol]

Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 12 dargestellten Protokoll.

Tabelle 12: PCR-Protokoll für die KIR-PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95 °C	20 s
Amplifikation	32	95 °C	3 s
		64 °C	20 s
Schmelzkurve	1	76 °C	1 s
		90 °C	+0,1 °C/s
Kühlen	1	25 °C	2 s

Für jede DNA Probe wurde zunächst ein Mastermix aus SYBR Green Mix, DNA und DNase freiem H₂O hergestellt (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermixes für die KIR-PCR

Reagenz	Volumen
SYBR Green Mix	100,0 µl
DNA	20,0 µl [10 ng/µl]

Reagenz	Volumen
H ₂ O	24,0 µl

In jedes Tube wurden 7,2 µl Master-Mix pipettiert und anschließend 2,8 µl Primer-Mix zugegeben. Dies wurde für alle 17 KIR-Gene getrennt wiederholt. Im Primer-Mix enthalten waren, neben den für das jeweilige KIR-Gen spezifischen Forward- und Reverse-Primern, auch die Forward- und Reverse-Primer für GALC, welches als Positivkontrolle diente. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz bei dem die DNA mit 1 µl H₂O ersetzt wurde mitgeführt. Nun erfolgte die PCR nach o.g. Protokoll und im Anschluss an den letzten PCR-Zyklus eine Schmelzkurvenanalyse um anhand der charakteristischen Schmelztemperaturen den Genotyp zu ermitteln. Hierbei wurde die Temperatur, beginnend mit 76 °C, pro Sekunde um 0,1 °C bis auf 90 °C erhöht und die Signalstärke nach jeder Temperaturerhöhung gemessen. Das Vorhandensein der charakteristischen Schmelzkurve eines Amplifikats zeigt dabei das Vorliegen des entsprechenden Gens an.

Zur Bestimmung des KIR Haplotyps wurden die gemessenen Schmelzpunkte der Real-Time PCR in ein von Sebastian Michaelis (Michaelis, 2015) entworfenes Microsoft Excel-Sheet übertragen, welches aus der Kombination der in der Probe vorhanden KIR-Gene den jeweiligen Haplotyp errechnet.

2.2.3.2 PCR FcGR3A

Folgende Reaktionszusammensetzungen wurden verwendet (siehe Tabelle 14):

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die FcGR3A-PCR

Reagenz	Volumen
SYBR Green Mix	5,0 µl
Genomische DNA	1,0 µl [10 ng/µl]
H ₂ O	2,0 µl
Primer Forward	1,0 µl [5 pmol]
Primer Reverse F oder V	1,0 µl [5 pmol]

Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 15 dargestellten Protokoll.

Tabelle 15: PCR-Protokoll für die FcGR3A-PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95 °C	1 min
Amplifikation	35	95 °C 59 °C	3 s 20 s
Schmelzkurve	1	75 °C 95 °C	1 s +0,2 °C/s
Kühlen	1	25 °C	HOLD

Für jede DNA Probe wurde zunächst ein Mastermix aus SYBR Green Mix, DNA und DNase freiem H₂O hergestellt (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Zusammensetzung des Mastermixes für die FcGR3A-PCR

Reagenz	Volumen
SYBR Green Mix	10,0 µl
DNA	2,0 µl [10 ng/µl]
H ₂ O	4,0 µl

In jedes Tube wurden 8 µl Master-Mix pipettiert und anschließend 1 µl Primer Forward und 1 µl Primer Reverse (für jede DNA Probe wurde ein Ansatz mit Primer FcGR3A_{RF} und ein Ansatz mit Primer FcGR3A_{RV} erstellt) zugegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz bei dem die DNA mit 1 µl H₂O ersetzt wurde mitgeführt.

Analog zum Vorgehen bei der KIR-Typisierung erfolgte die PCR und im Anschluss an den letzten PCR-Zyklus eine Schmelzkurvenanalyse, um anhand der charakteristischen Schmelztemperaturen den FcGR3A Genotyp zu ermitteln. Hierbei wurde die Temperatur, beginnend mit 75 °C, pro Sekunde um 0,2 °C bis auf 95 °C erhöht und die Signalstärke nach jeder Temperaturerhöhung gemessen. Das Vorhandensein der charakteristischen Schmelzkurve eines Amplifikats zeigt auch hier das Vorliegen des entsprechenden Gens an, die Schmelzpunkte betragen 83 °C für das V-Allel und 88 °C für das F-Allel.

2.2.3.3 PCR SUFU

Auch die Bestimmung des SUFU Genotyps erfolgte anhand einer Realtime PCR. Hier wurde nach dem von Bari et al. (2015) vorgeschlagenen SNP-Assay vorgegangen.

Folgende Reaktionszusammensetzungen wurden verwendet (siehe Tabelle 17):

Tabelle 17: Reaktionsansatz für die SUFU-PCR

Reagenz	Volumen
Taqman Genotyping Master Mix	12,5 µl
Primer Forward	1,0 µl [± 5 pmol]
Primer Reverse	1,0 µl [± 5 pmol]
Sonde FAM	1,25 µl [± 0,25 µM]
Sonde VIC	1,25 µl [± 0,25 µM]
H ₂ O	3,0 µl
Genomische DNA	5,0 µl [±100 ng]

Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 18 aufgezeigten Protokoll.

Tabelle 18: PCR-Protokoll für die SUFU-PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Vorwärmen	1	50 °C	2 min
Denaturierung	1	95 °C	10 min
Amplifikation	45	95 °C 60 °C	15 s 1 min
Kühlen	1	25 °C	FINAL PLATE READ

Für jede DNA Probe wurden alle Reagenzien in ein Tube pipettiert, gevortext und anschließend die PCR durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit den genannten Reagenzien, aber anstelle der DNA mit insgesamt 8 µl H₂O.

Die Bestimmung der Genotypen erfolgte anschließend anhand des Vorhandenseins von Amplifikaten mit C oder T Allelen, die mit den Sonden 6FAM (T-Allel) und VIC (C-Allel) (Bari et al., 2015) detektiert werden konnten.

2.2.4 Konventionelle PCR mit Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) - FcGR2A

Für die FcGR2A Genotypisierung wurde eine klassische PCR mit RFLP und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt.

Folgende Reaktionszusammensetzungen wurden verwendet (siehe Tabelle 19):

Tabelle 19: Reaktionsansatz für die FcGR2A-PCR

Reagenz	Volumen
Go-Taq Colorless Master-Mix	12,5 µl
Primer Forward	1,5 µl [5 µM]
Primer Reverse	1,5 µl [5 µM]
Genomische DNA	1,0 µl [10 ng]
H ₂ O	8,5 µl

Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 20 aufgezeigten Protokoll:

Tabelle 20: PCR-Protokoll für die FcGR2A-PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95 °C	2 min
Amplifikation	30	95 °C	15 s
		55 °C	30 s
		72 °C	30 s
Abschließende Elongation	1	72 °C	5 min

Für jede DNA-Probe wurde alle oben genannten Reagenzien in ein Tube pipettiert, das Reaktionsgemisch gevortext und dann die PCR durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Tube mit den gleichen Reagenzien, bei dem jedoch die DNA durch 1 µl DNase-freies H₂O zusätzlich ersetzt wurde.

Im Anschluss erfolgte der enzymatische Verdau des Reaktionsprodukts (RFLP), hierzu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet (Tabelle 21):

Tabelle 21: Reaktionsansatz für den enzymatischen Verdau des FcGR2A-PCR-Produkts

Reagenz	Volumen
PCR-Produkt	4,5 µl
Cut Smart Puffer	1,0 µl
Enzym BstUI	0,5 µl [± 5 u (10000 u/ml)]
H ₂ O	4,0 µl

Das PCR-Produkt wurde mit dem Puffer und H₂O gemischt und das Restriktionsenzym BstUI zugegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 120 min bei 60 °C im Thermocycler inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.5) um anhand der Banden den FcGR2A-Genotyp der DNA Proben zu ermitteln. Die Allele H und R unterscheiden sich in ihrer Fragmentlänge, sodass der jeweilige Genotyp anhand des Bandenmusters bestimmt werden kann. Die Fragmente weisen folgende Länge auf: HH 343 bp, RR 322 bp. Der Genotyp HR weist jeweils ein Fragment beider Längen auf.

2.2.5 Gelelektrophorese

Mit einer Gelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden, da die geladenen Moleküle schneller in Richtung der positiv geladenen Anode wandern, je kleiner und stärker negativ sie geladen sind.

Für die Trennung der DNA-Amplifikate aus der PCR wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. Dazu wurden 2 g Agarose mit 100 ml 10 %igem TBE-Puffer gemischt und so lange in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurden 10 µl Gel-Red hinzugefügt und das flüssige Gel in die vorbereitete Gelelektrophoresekammer gegeben. Nach Abkühlen und Polymerisation des Agarosegels wurde die Kammer mit TBE-Puffer gefüllt und anschließend mit der DNA beladen. Hierfür wurden 8 µl des Reaktionsprodukts mit 2 µl Blue Juice Loading Buffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. In eine weitere Geltasche wurde ein Mix aus 2 µl eines 100 bp DNA-Markers, 8 µl H₂O und 2 µl Blue Juice Loading Buffer gegeben, deren

Banden bei der Auswertung als Referenz für die Länge der DNA-Amplifikate dienten. Nach ca. 60 min Laufzeit bei 120 V erfolgte die Auswertung des Gels mit Hilfe des Infrared Imaging System Li-cor Odyssey Fc.

2.3 Software und Statistik

Die Datenerfassung der Real-Time PCR erfolgte mit der Software CFX96 Real-Time PCR Detection System der Firma Bio-Rad. Die Bestimmung des KIR Haplotyps erfolgte im Anschluss an die PCR über ein von Sebastian Michaelis entworfenes Microsoft Excel-Sheet (Michaelis, 2015). Die Berechnung der relativen Häufigkeiten in Prozent für die Übersichtstabellen erfolgte ebenfalls über Microsoft Excel, für die statistische Auswertung der Daten wurde GraphPad Prism 8.4.3 und 9.1.2 verwendet. Da die Statistiksoftware GraphPad Prism eine zeitpunktbezogene Auswertung der zugrundeliegenden Daten ermöglicht, kommt es aufgrund des Studiendesigns zwangsläufig zur Zensierung mancher Überlebenszeiten und damit zu geringfügigen Abweichungen in den prozentualen Häufigkeiten zwischen den in den Übersichtstabellen dargestellten Prozentwerten (Microsoft Excel) und denen in Text und Grafiken (GraphPad Prism).

Das Gesamtüberleben (GÜ) umfasst dabei alle Patienten die beim Letzten Follow up (LFU) noch lebten, unabhängig vom Remissionsstatus. Als LFU gilt der letzte Nachbeobachtungstermin vor Ende der Datenakquise oder das Todesdatum. Das Ereignisfreie Überleben (EFÜ) erfasst die Zeit von HSZT bzw. Antikörpertherapie bis zum Auftreten eines Rezidivs oder Versterben des Patienten. Unter Nicht-rezidivbedingte Sterblichkeit (non-relapse mortality, NRM) fallen alle Patienten, die ohne ein vorheriges Rezidiv verstorben sind, der Begriff Rezidiv wiederum umfasst alle Patienten, die einen Rückfall erlitten haben.

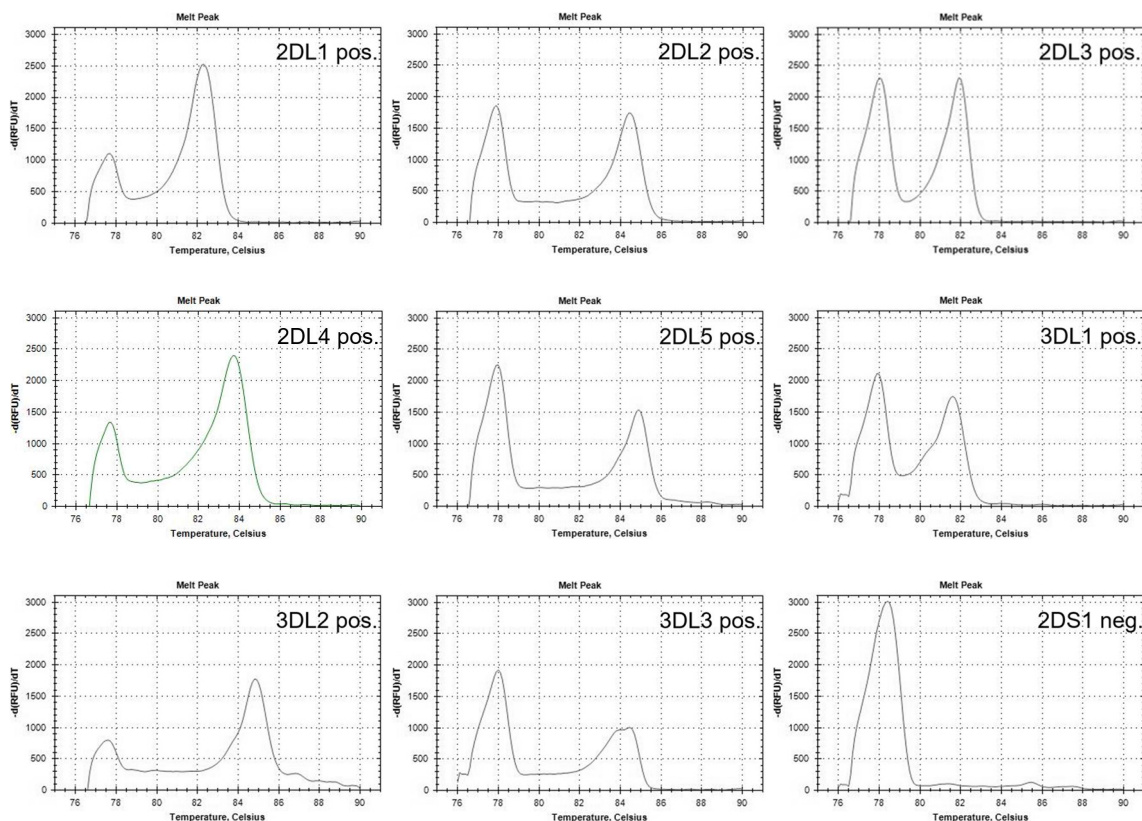
Das Signifikanzniveau der zweiseitigen p-Werte wurde bei 5 % festgelegt. Die verwendeten Testverfahren waren Fisher's exact test oder Chi Quadrat Test. Die Überlebenszeitanalyse erfolgte mittels Kaplan-Meier-Diagrammen (Log-rank Test).

3. Ergebnisse

3.1 KIR

3.1.1 KIR Haplotyp Bestimmung mittels Schmelzkurvenanalyse

Die Bestimmung des KIR Haplotyps erfolgte mittels Real-Time PCR (vgl. Kapitel 2.2.3). Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Schmelzkurven eines Spenders mit KIR Haplotyp B. Ein erster Peak bei ca. 78 °C zeigt das Vorhandensein von GALC an und dient der Positivkontrolle. Folgt diesem ein zweiter Peak, so zeigt dies das Vorhandensein des entsprechenden Genes an. Für die Rezeptoren 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DP1 und 3DP1f2 ist eine eindeutige Schmelzkurve erkennbar. 2DS1, 2DS5, 3DS1, 3DP1f1 zeigen keine Schmelzkurve, sie werden daher als negativ gewertet.



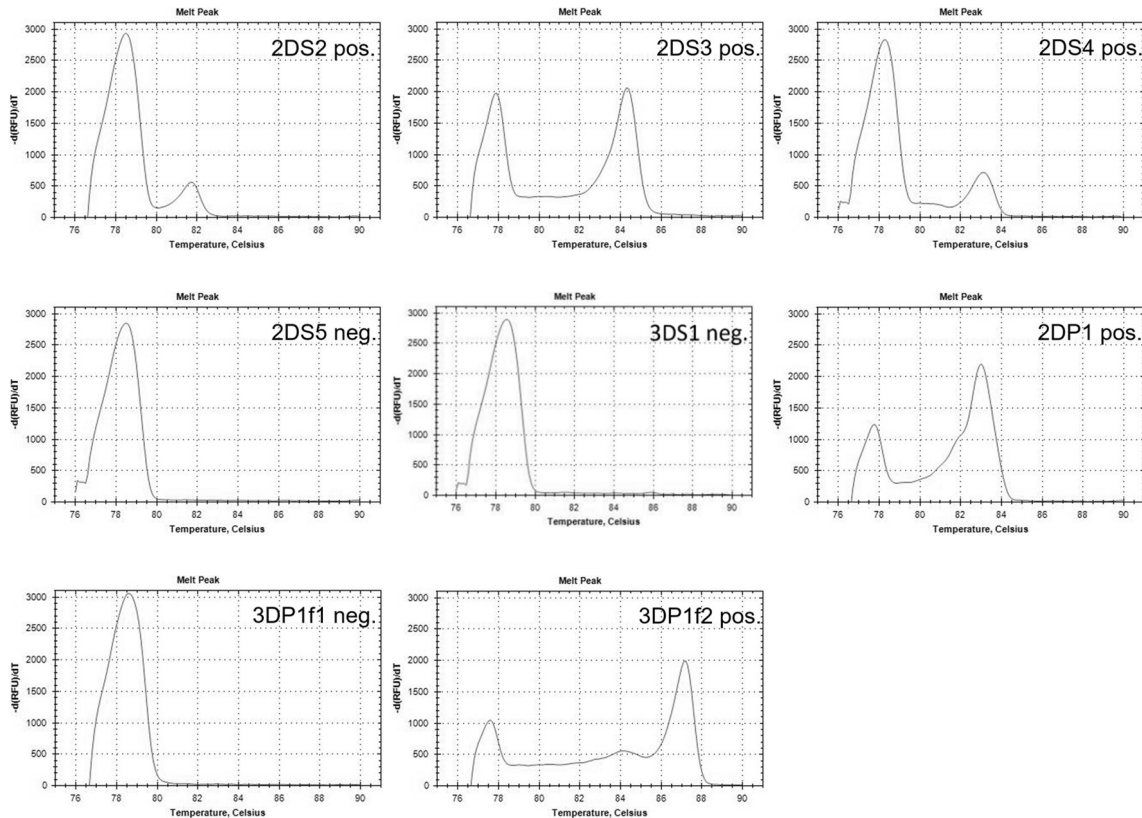


Abbildung 4: Beispielhafte Schmelzkurven eines gesunden Spenders mit KIR Haplotyp B (pos. = positiv, neg. = negativ, x-Achse = relative fluorescence units, y-Achse = Temperatur)

Die aus den Schmelzkurven ermittelten Schmelzpunkte wurden anschließend in eine Microsoft-Excel-Datentabelle (siehe Kapitel 2.2.3.1) übertragen, in welcher aus der Kombination der exprimierten Rezeptoren der KIR Haplotyp und der B-Content Score für den jeweiligen Spender ermittelt wurden. Entsprechend dem KIR Haplotyp ihrer Spender, welcher nach Ausbildung eines vollständigen Chimärismus (alle blutbildenden Zellen stammen nun von Spenderzellen ab) auch ihrem eigenem entspricht, wurden die Patienten den Gruppen KIR A und KIR B zugeordnet.

3.1.2 Überlebenszeitanalyse aller KIR-typisierten pädiatrischen Patienten

3.1.2.1 Patientencharakteristika

Es wurden DNA-Proben der Stammzellspender von 73 haploident transplantierten pädiatrischen Patienten mit unterschiedlichen malignen

Erkrankungen nach dem im Material und Methoden beschriebenen Protokoll (siehe Kapitel 2.2.3.1) KIR-typisiert und der klinische Verlauf der Patienten nach der Stammzelltransplantation untersucht. Bei den Spendern handelte es sich zu 97,3 % um die Eltern (Vater: n=39, 53,4 %; Mutter: n=32, 43,8 %) und zu 2,7 % um Geschwister (n=2).

Die haploidenten HSZTs fanden zwischen 2005 und 2017 statt, die Patienten waren dabei zwischen 3 und 26 Jahren alt. Die klinischen Daten wurden bis Juli 2019 erhoben. In der nachfolgenden Tabelle (siehe Tabelle 22) sind die weiteren Patientencharakteristika aufgelistet.

Tabelle 22: Patientencharakteristika der KIR-typisierten Patienten

KIR-Patienten (n=73)						
	A	%	B	%	p	gesamt %
Anzahl						
	18	24,7	55	75,3		73
Diagnose					0,11	
Ewing-Sarkom	2	11,1	6	10,9		8 11,0
Neuroblastom	10	55,6	40	72,7		50 68,5
Rhabdomyosarkom	3	16,7	8	14,5		11 15,1
Sonstige	3	16,7	1	1,8		4 5,5
Geschlecht					0,13	
männlich	10	55,6	42	76,4		52 71,2
weiblich	8	44,4	13	23,6		21 28,8
Alter bei HSZT					0,69	
Min.	5,1		3			3
Max.	24,6		26,2			26,2
Durchschnittsalter	11,5		9			9,6
Remissionsstatus bei HSZT					0,70	
komplette Remission	4	22,2	14	25,5		18 24,7
Teilremission	12	66,7	38	69,1		50 68,5
Progress	2	11,1	3	5,5		5 6,8
Spender					0,29	
männlich	12	66,7	28	50,9		40 54,8
weiblich	6	33,3	27	49,1		33 45,2
Bestrahlung					0,28*	
keine	16	88,9	51	92,7		67 91,8
TBI	2	11,1	1	1,8		3 4,1
TLI	0	0,0	2	3,6		2 2,7
unbekannt	0	0,0	1	1,8		1 1,4

KIR-Patienten (n=73)							
	A	%	B	%	p	gesamt	%
Graft Manipulation					0,20*		
CD3/19 Depletion	9	50,0	39	70,9		48	65,8
CD3/19 Depletion und CD34+ Selektion	6	33,3	11	20,0		17	23,3
α/β-TCR Depletion	3	16,7	3	5,5		6	8,2
unbekannt	0	0,0	2	3,6		2	2,7
Grad der akuten GvHD					0,02*		
°0	7	38,9	21	38,2		28	38,4
°1	7	38,9	30	54,5		37	50,7
°2	1	5,6	4	7,3		5	6,8
°3	3	16,7	0	0,0		3	4,1
Grad der chronischen GvHD					0,80*		
°0	14	77,8	44	80,0		58	79,5
°1	2	11,1	7	12,7		9	12,3
°2	2	11,1	3	5,5		5	6,8
°3	0	0,0	1	1,8		1	1,4
B-content Score					<0,0001*		
0	18	100,0	1	1,8		19	26,0
1+2	0	0,0	47	85,5		47	64,4
3+4	0	0,0	7	12,7		7	9,6
KIR Ligand-Modell					0,80*		
Match	11	61,1	32	58,2		43	58,9
Mismatch	3	16,7	13	23,6		16	21,9
unbekannt	4	22,2	10	18,2		14	19,2
Rezidiv					0,26		
ja	10	55,6	39	70,9		49	67,1
nein	8	44,4	16	29,1		24	32,9
Überleben zum Zeitpunkt des letzten Follow up					>0,9999		
Am Leben	7	38,9	20	36,4		27	37,0
Verstorben	11	61,1	35	63,6		46	63,0
aktueller Status					0,78*		
komplette Remission	7	38,9	16	29,1		23	31,5
NRM	1	5,6	4	7,3		5	6,8
Stable Disease	0	0,0	2	3,6		2	2,7
Rezidiv/Progress	0	0,0	2	3,6		2	2,7
Verstorben nach Rezidiv	10	55,6	31	56,4		41	56,2

* Wert aufgrund der geringen Patientenzahl in einigen Subgruppen nicht verlässlich verwertbar

(HSZT = hämatopoetische Stammzelltransplantation; TBI = total body irradiation, TLI = total lymphoid irradiation;

TCR = T-Zellrezeptor, GvHD = Graft-versus-Host Disease; NRM = non-relapse mortality)

3.1.2.2 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach KIR Haplotyp

Von den 73 Spendern weisen 18 (24,7 %) den KIR Haplotyp A, 55 (75,3 %) den Haplotyp B auf.

38,9 % (n=7) der Patienten mit einem KIR Haplotyp A-Spender wiesen bis zum LFU kein Rezidiv oder Tod auf, bei den Patienten welche eine KIR Haplotyp B-Spende erhalten hatten, waren es nur 21,3 % (n=12) (p=0,25). Die Patienten der KIR A-Gruppe weisen somit ein geringfügig, jedoch nicht signifikant, besseres EFÜ auf. Betrachtet man das GÜ, so sind beim LFU 38,9 % (n=7) der Patienten aus der KIR A-Gruppe und 31,6 % (n=20) der Patienten aus der KIR B-Gruppe noch am Leben (p=0,64) (siehe Abbildung 5).

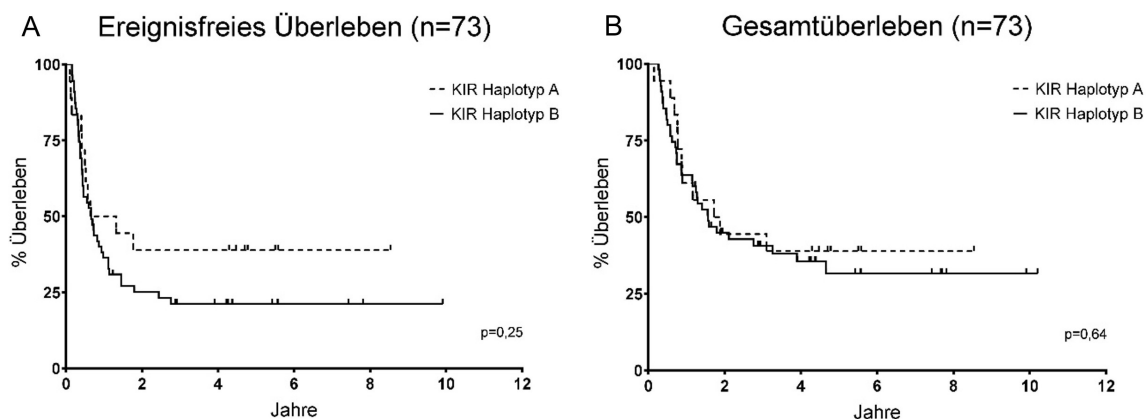


Abbildung 5: A Ereignisfreies Überleben von Patienten mit KIR Haplotyp A bzw. B-Spendern; B Gesamtüberleben von Patienten mit KIR Haplotyp A- bzw. B-Spendern in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Die Rezidivrate beträgt für Patienten der KIR A-Gruppe 58,5 % (n=10), die NRM 6,3 % (n=1). Für Patienten der KIR B-Gruppe liegt die Rezidivrate bei 73,8 % (n=39) und die NRM bei 21,1 % (n=4) (Rezidivrate: p=0,29, NRM: p=0,51) (siehe Abbildung 6).

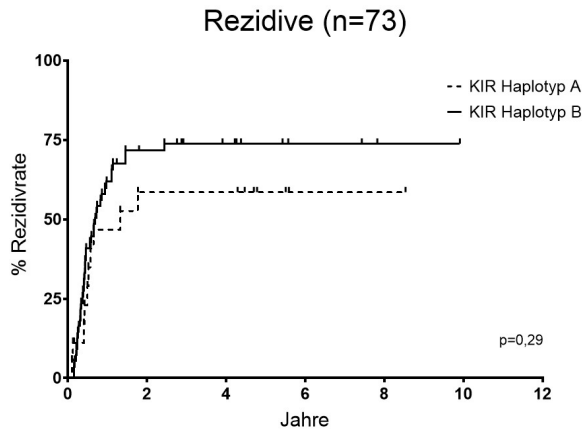


Abbildung 6: Rezidivrate der KIR A und B- Patienten in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

3.1.2.3 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach Remissionsstatus vor HSZT

Da der Remissionsstatus des Patienten vor Transplantation den Ausgangspunkt für den weiteren klinischen Verlauf darstellt, wurden EFÜ und GÜ in Abhängigkeit vom Remissionsstatus vor HSZT betrachtet.

18 Patienten (24,7 %) befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation in kompletter Remission (complete remission, CR), 50 Patienten (68,5 %) in Teilremission (partial remission, PR) und 5 Patienten (6,8 %) in Progress. Patienten in CR vor Transplantation zeigen mit 37,5 % (n=7) ein tendenziell, jedoch nicht signifikant, besseres EFÜ gegenüber Patienten, die sich nicht in CR befanden. Bei diesen sind es 22,2 % (n=12) (p=0,17). Beim GÜ zeigt sich ein geringerer Unterschied: Patienten in CR 41,3 % (n=8) gegenüber 32,3 % bei Patienten ohne CR (n=19) (p=0,47) (siehe Abbildung 7).

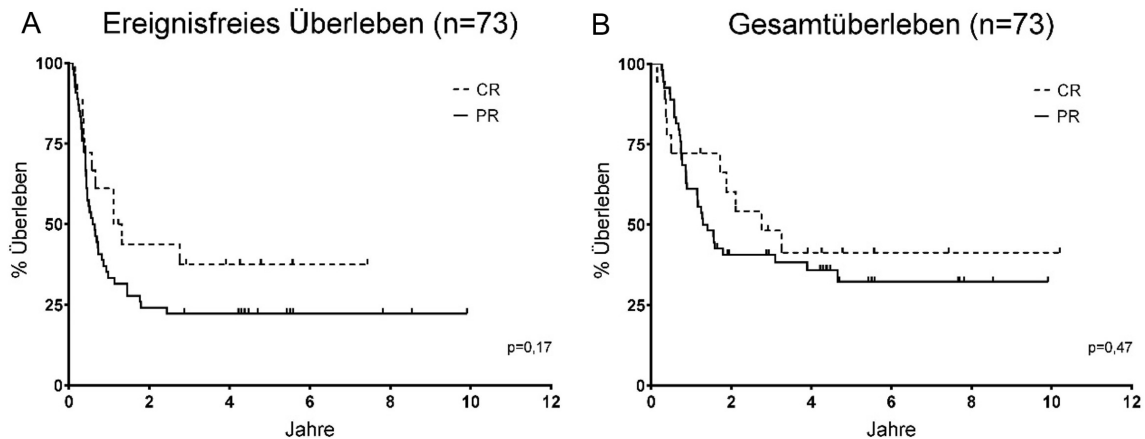


Abbildung 7: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Patienten getrennt nach Remissionsstatus vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) in Jahren nach HSZT. PR fasst Patienten in PR und Progress zusammen. (CR = complete remission, PR = partial remission)

In den Untergruppen KIR A und B befanden sich in der KIR A-Gruppe 22,2 % (n=4) der Patienten vor HSZT in CR, 66,7 % (n=12) in PR und 11,1 % (n=2) in Progress, bei den Patienten in der KIR B-Gruppe waren es 25,5 % (n=14) in CR, 69,1 % (n=38) in PR und 5,5 % (n=3) in Progress (p=0,70).

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im EFÜ und GÜ im Vergleich der Gruppen KIR A-CR vor HSZT gegenüber KIR B-CR vor HSZT und KIR A-PR vor HSZT gegenüber KIR B-PR vor HSZT. Die PR-Gruppe umfasst dabei jeweils alle Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in CR befanden, größtenteils Patienten im PR sowie eine geringe Anzahl an Patienten in Progress. In der KIR A-CR Gruppe beträgt das EFÜ 25,0 % (n=1), in der KIR B-CR Gruppe 41,7 % (n=6) (p=0,52), das GÜ für KIR A-CR 25,0 % (n=1) und für KIR B-CR 46,3 % (n=7) (p=0,31). Für die Patienten in der PR-Gruppe finden sich folgende Ergebnisse: EFÜ KIR A-PR 42,9 % (n=6), KIR B-PR 14,6 % (n=6) (p=0,09); GÜ KIR A-PR 42,9 % (n=6), KIR B-PR 27,3 % (n=13) (p=0,40) (siehe Abbildung 8).

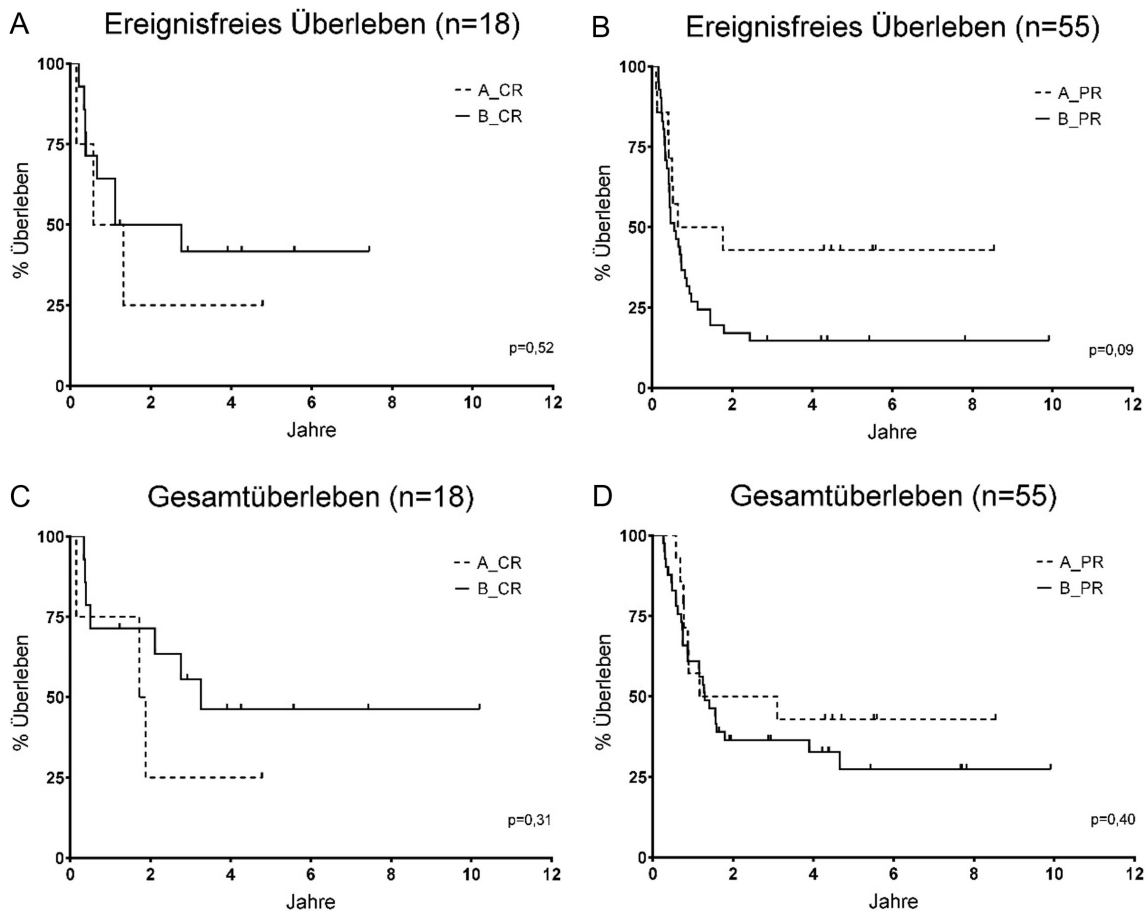


Abbildung 8: Ereignisfreies Überleben (A+B) und Gesamtüberleben (C+D) getrennt nach KIR Haplotyp A und B in Abhängigkeit vom Remissionsstatus vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT), jeweils in Jahren nach HSZT. PR fasst Patienten in PR und Progress zusammen. (CR = complete remission, PR = partial remission)

Es zeigt sich für Patienten in CR vor HSZT ein tendenziell besseres EFÜ und GÜ wenn sie mit KIR B-Spendern transplantiert wurden, für Patienten in PR ist dies für Patienten mit KIR A-Spendern der Fall. Für beide Gruppen waren die Ergebnisse jedoch nicht signifikant.

3.1.2.4 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit vom B-Content Score

Der B-Content Score wurde anhand eines von Sebastian Michaelis erstellten und auf den Erkenntnissen von Cooley et al. (2010) basierenden Algorithmus mittels Microsoft-Excel-Datentabelle ermittelt und entsprechend dem *Donor KIR B-content group calculator*³ in 3 Gruppen (Score 0; 1+2; 3+4, siehe Kapitel 1.6.2)

³ http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html

zusammengefasst. 26 % (n=19) der Spender hatten einen Score von 0, 64,4 % (n=47) Spender einen Score von 1 oder 2 und 9,6 % (n=7) einen Score von 3, ein Score von 4 lag bei keinem der Spender vor. Bei Patienten die einen Score 0-Spender hatten, beträgt das EFÜ 36,8 % (n=7), bei einem Score von 1+2 25,1 % (n=12) und bei einem Score von 3 0 % (n=0) (p=0,19). Die Überlebensrate bis zum LFU beträgt bei einem Score von 0 40,5 % (n=8), bei einem Score von 1+2 34,4 % (n=17) und bei einem Score von 3 0 %⁴ (GÜ: p=0,72) (siehe Abbildung 9).

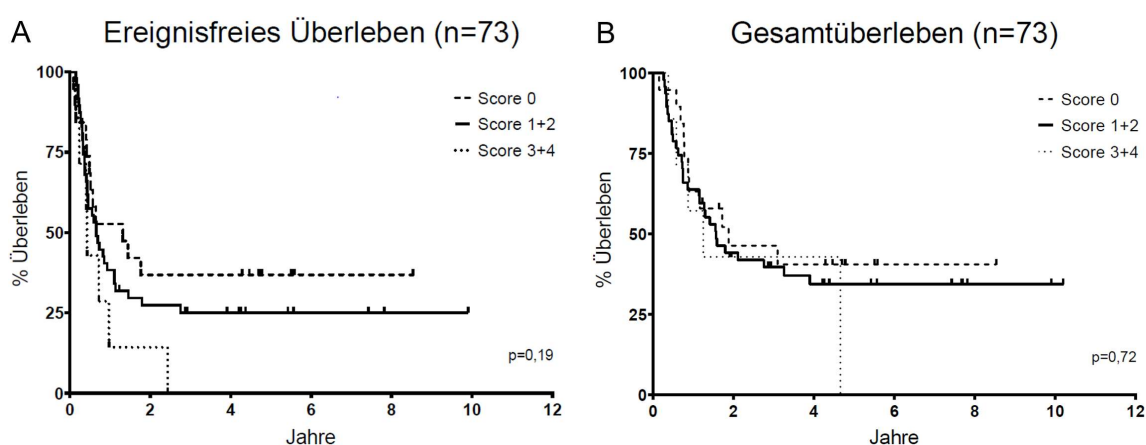


Abbildung 9: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Patienten in Abhängigkeit vom B-Content Score in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

3.1.2.5 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit vom KIR Ligand-Modell

Die Ermittlung der HLA-Mismatches (MM) für die Auswertung nach dem KIR Ligand-Modell erfolgte mit dem *KIR Ligand Calculator*⁵. Für 59 der 73 KIR-typisierten Stammzellspender und Patienten war der HLA-Status erhebbar. 16 der Paare (27,1 %) wiesen ein Mismatch auf, 43 (72,9 %) nicht. Die Anzahl der HLA-Mismatches übt keinen signifikanten Einfluss auf das EFÜ und das GÜ aus. Das EFÜ beträgt 24,9 % (n=11) für die Gruppe mit 0 MM, 35,7 % (n=5) für die mit 1 MM und 0 % (n=0) für die mit 2 MM (p=0,27). Ähnliche Ergebnisse zeigen

⁴ 2 Patienten waren zum Zeitpunkt ihres LFU noch am Leben, wiesen jedoch eine sehr kurze Nachbeobachtungszeit < 2 Jahre nach hSST auf, was bei der Berechnung durch die Statistiksoftware entsprechend einberechnet wurde.

⁵ <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>

sich für das GÜ: 32,3 % (n=15) bei 0 MM, 37,5 % (n=6) bei 1 MM und 0 % (n=0) bei 2 MM (p=0,32) (siehe Abbildung 10).

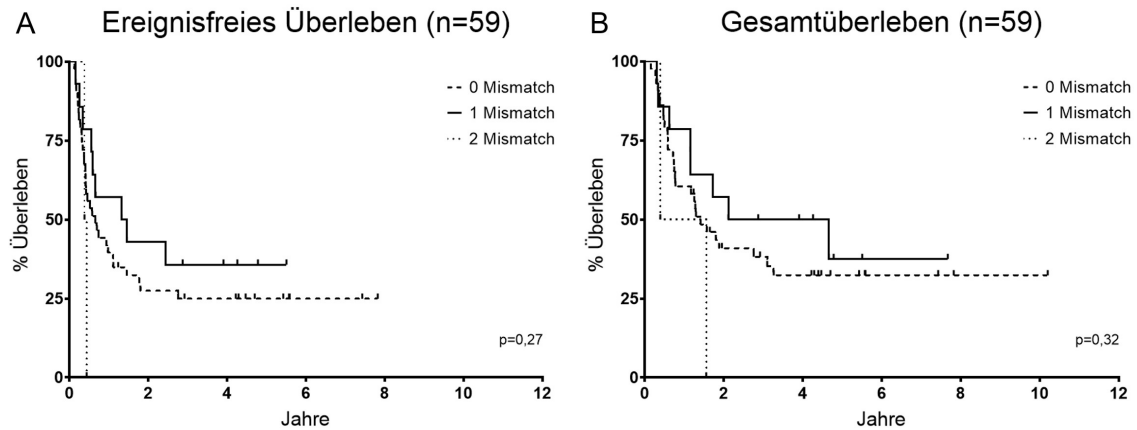
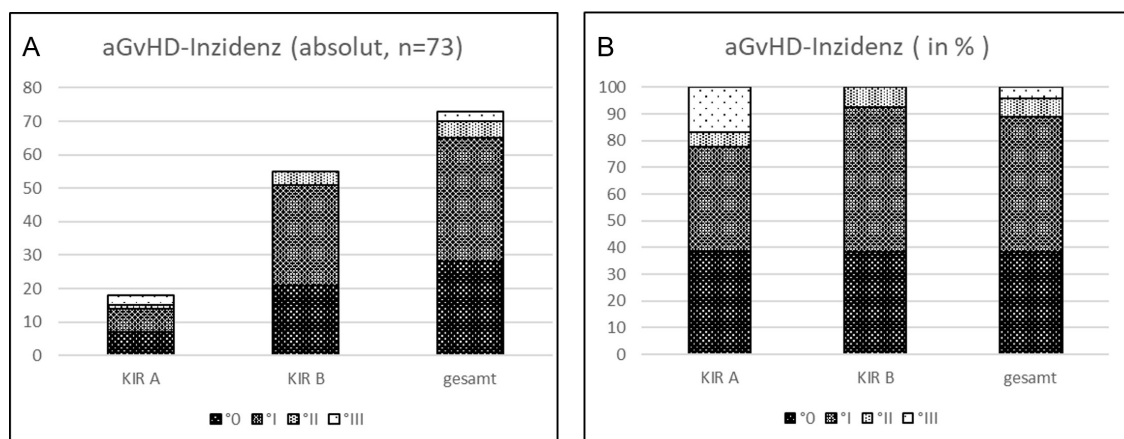


Abbildung 10: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) abhängig von den HLA-Mismatches in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

3.1.2.6 Verteilung der Inzidenzen der GvHD in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp

Bezüglich der Inzidenz einer akuten oder chronischen GvHD konnte kein Unterschied zwischen den KIR Haplotypen gefunden werden. Die Inzidenz der aGvHD (Grad °I-IV) beträgt 38,9 % (n=11) bei KIR A gegenüber 38,2 % (n=34) bei KIR B (p>0,9999). Bei der cGvHD sind es 77,8 % (n=4) bei KIR A gegenüber 80,0 % (n=11) bei KIR B (p>0,9999) (siehe Abbildung 11).



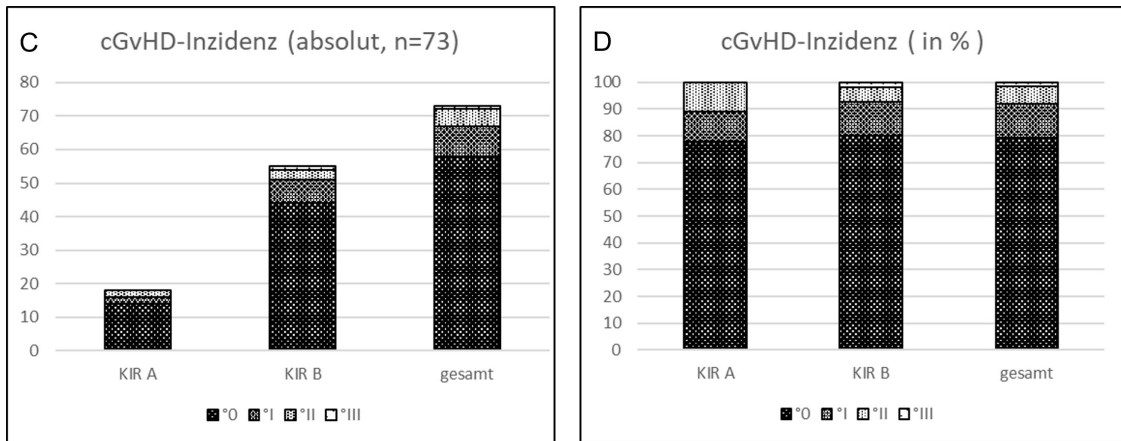


Abbildung 11: Inzidenz von akuter (A+B) und chronischer (C+D) Graft-versus-Host Disease (aGvHD bzw. cGvHD) in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp

3.1.3 Überlebenszeitanalyse der pädiatrischen Neuroblastom Patienten

3.1.3.1 Patientencharakteristika

50 der 73 KIR-typisierten Patienten hatten die Diagnose eines Neuroblastoms, so dass nach Auswertung der gesamten Kohorte eine getrennte Betrachtung dieser Patienten erfolgte. Tabelle 23 zeigt die Patientencharakteristika der Neuroblastompatienten.

Tabelle 23: Patientencharakteristika der KIR-typisierten Neuroblastompatienten

	Neuroblastompatienten (n=50)				p	gesamt	%
	A	%	B	%			
Anzahl							
	10	20,0	40	80,0		50	
Geschlecht					0,40		
männlich	7	70,0	33	82,5		40	80,0
weiblich	3	30,0	7	17,5		10	20,0
Alter bei HSZT					0,74		
Min.	5,1		3			3	
Max.	17		19,1			19,1	
Durchschnittsalter	7,8		7,8			7,8	
n-myc-Status					0,15		
positiv	3	30,0	6	15,0		9	18,0
negativ	4	40,0	29	72,5		33	66,0
unbekannt	3	30,0	5	12,5		8	16,0

Neuroblastompatienten (n=50)						
	A	%	B	%	p	gesamt %
Remissionsstatus bei HSZT					0,40	
komplette Remission	3	30,0	8	20,0		11 22,0
Teilremission	6	60,0	31	77,5		37 74,0
Progress	1	10,0	1	2,5		2 4,0
Spender					0,74	
männlich	6	60,0	21	52,5		27 54,0
weiblich	4	40,0	19	47,5		23 46,0
Bestrahlung					0,77*	
keine	10	100,0	38	95,0		48 96,0
TBI	0	0,0	1	2,5		1 2,0
unbekannt	0	0,0	1	2,5		1 2,0
Graft Manipulation					0,35*	
CD3/19 Depletion	6	60,0	30	75,0		36 72,0
CD3/19 Depletion und CD34+ Selektion	4	40,0	8	20,0		12 24,0
unbekannt	0	0,0	2	5,0		2 4,0
Grad der akuten GvHD					0,17*	
°0	5	50,0	17	42,5		22 44,0
°1	4	40,0	20	50,0		24 48,0
°2	0	0,0	3	7,5		3 6,0
°3	1	10,0	0	0,0		1 2,0
Grad der chronischen GvHD					0,12	
°0	7	70,0	32	80,0		39 78,0
°1	1	10,0	7	17,5		8 16,0
°2	2	20,0	1	2,5		3 6,0
B-content Score					<0,0001*	
0	10	100,0	1	2,5		11 22,0
1+2	0	0,0	34	85,0		34 68,0
3+4	0	0,0	5	12,5		5 10,0
KIR Ligand-Modell					0,96*	
Match	6	60,0	22	55,0		28 56,0
Mismatch	2	20,0	9	22,5		11 22,0
unbekannt	2	20,0	9	22,5		11 22,0
Rezidiv					0,71	
ja	6	60,0	28	70,0		34 68,0
nein	4	40,0	12	30,0		16 32,0
Überleben zum Zeitpunkt des letzten Follow up					>0,9999	
Am Leben	4	40,0	18	45,0		22 44,0
Verstorben	6	60,0	22	55,0		28 56,0

Neuroblastompatienten (n=50)						
	A	%	B	%	p	gesamt %
aktueller Status					0,79*	
komplette Remission	4	40,0	14	35,0		18 36,0
NRM	0	0,0	2	5,0		2 4,0
Stable Disease	0	0,0	2	5,0		2 4,0
Rezidiv/Progress	0	0,0	2	5,0		2 4,0
Verstorben nach Rezidiv	6	60,0	20	50,0		26 52,0

* Wert aufgrund der geringen Patientenzahl in einigen Subgruppen nicht verlässlich verwertbar

(HSZT = hämatopoetische Stammzelltransplantation; TBI = total body irradiation, TLI = total lymphoid irradiation;

TCR = T-Zellrezeptor, GvHD = Graft-versus-Host Disease; NRM = non-relapse mortality)

3.1.3.2 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach KIR Haplotyp

10 (20,0 %) der insgesamt 50 Stammzellspender wiesen den KIR Haplotyp A auf, 40 (80,0 %) den Haplotyp B. Die Patienten der KIR A Gruppe befanden sich zum Zeitpunkt des LFU zu 40,0 % (n=4) in CR, 60,0 % (n=6) waren aufgrund eines Rezidivs verstorben. Von den Patienten der KIR B-Gruppe befanden sich beim LFU 35,0 % (n=14) in CR, jeweils 5,0 % (n=2) hatten ein Rezidiv oder wiesen eine stable disease (SD) auf. 50,0 % (n=20) waren auf Grund eines Rezidivs und 5,0 % (n=2) durch NRM verstorben, das GÜ beträgt somit für KIR A 40,0 % (n=4) und für KIR B 39,6 % (n=18). Die Patienten der KIR A Gruppe zeigen mit 40,0 % (n=4) im Vergleich zu 24,2 % (n=10) bei KIR B ein tendenziell, jedoch nicht signifikant, besseres EFÜ ($p=0,29$), während sich im GÜ kein Unterschied zeigt ($p=0,86$) (siehe Abbildung 12).

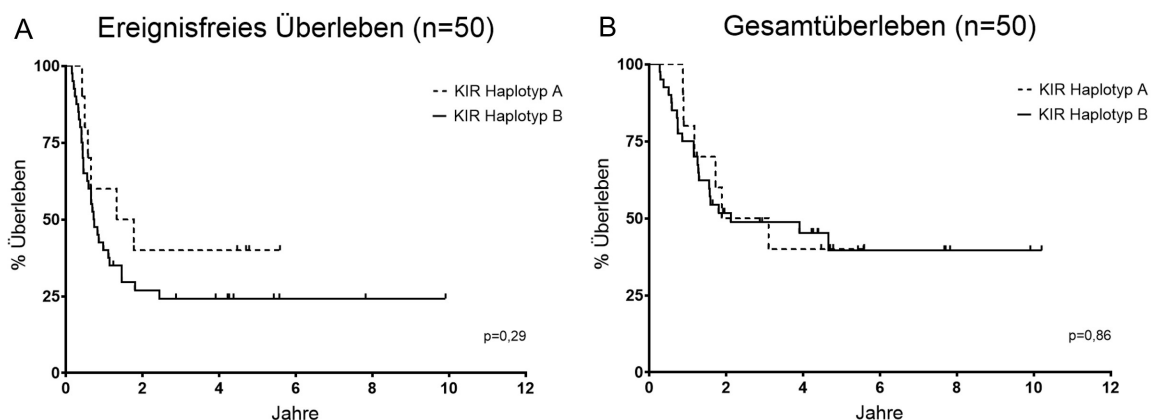


Abbildung 12: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten getrennt nach KIR Haplotyp in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Die Rezidivrate beträgt für Patienten der KIR A Gruppe 60,0 % (n=6), Patienten die aufgrund von NRM verstorben sind, kamen in dieser Untergruppe nicht vor. Für Patienten der KIR B Gruppe liegt die Rezidivrate bei 72,5 % (n=28) und die NRM bei 11,8 % (n=2) (Rezidivrate: p=0,37, NRM: p=0,41) (siehe Abbildung 13).

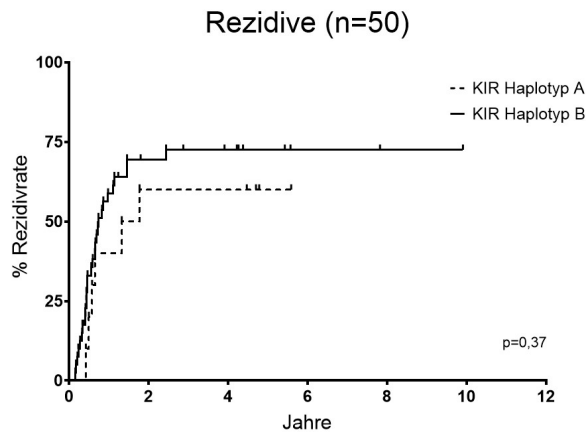


Abbildung 13: Rezidivrate der KIR A und B-Patienten in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

3.1.3.3 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach Remissionstatus vor HSZT

Auch in dieser Gruppe erfolgte wie in Kapitel 3.2.1.3 eine Auswertung getrennt nach Remissionsstatus vor HSZT. 22,0 % (n=11) der Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der HSZT in CR, 74,0 % (n=37) in PR und 4,0 % (n=2) in Progress. Die Patienten die sich in CR befanden, weisen ein EFÜ von 43,6 % (n=5) auf, die Patienten in PR und Progress ein EFÜ von 23,1 % (n=7) (p=0,24). Das GÜ in der CR-Gruppe beträgt 51,1 % (n=6) und 36,4 % (n=16) in der PR/Progress-Gruppe (p=0,43) (siehe Abbildung 14).

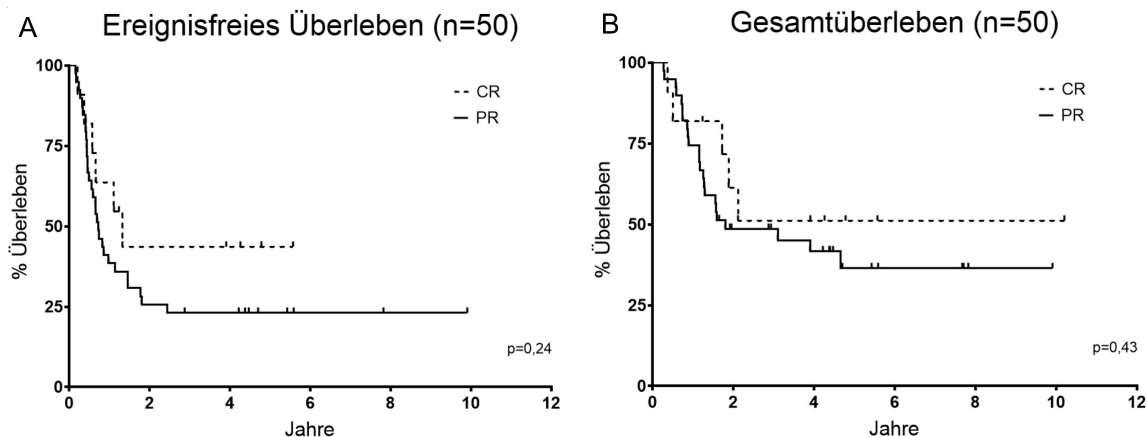


Abbildung 14: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten getrennt nach Remissionsstatus vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) in Jahren nach HSZT. PR fasst Patienten in PR und Progress zusammen. (CR = complete remission, PR = partial remission)

Im Anschluss erfolgte die Auswertung zusätzlich jeweils getrennt nach KIR A und B. Für die Untergruppe der Patienten mit CR vor HSZT konnten, aufgrund der geringen Patientenzahl von insgesamt nur 3 Patienten in der KIR A - CR-Gruppe, keine verlässlichen Aussagen getroffen werden. In der Untergruppe PR vor HSZT zeigen sich folgende Ergebnisse: KIR A: EFÜ 42,9 % (n=3), GÜ ebenfalls 42,9 % (n=3); KIR B: EFÜ 14,6 % (n=6), GÜ 35,0 % (n=13). Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (EFÜ: p=0,22; GÜ: p=0,78) (siehe Abbildung 15).

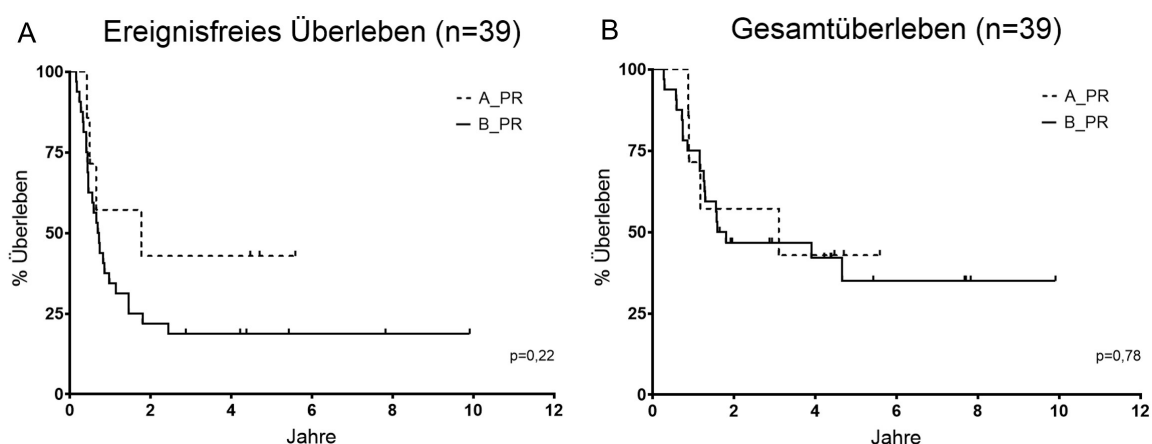


Abbildung 15: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten getrennt nach KIR Haplotyp und Remissionsstatus vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) in Jahren nach HSZT. PR fasst Patienten in PR und Progress zusammen. (CR = complete remission, PR = partial remission)

3.1.3.4 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach B-Content Score

Der B-Content Score wurde wie in Kapitel 3.1.2.4 beschrieben ermittelt. 22 % (n=11) der Spender hatten einen Score von 0, 68,0 % (n=34) einen Score von 1+2 und 10 % (n=5) einen Score von 3. Einen Score von 4 hatte keiner der Spender.

Für Patienten der Score 0-Gruppe liegt das EFÜ bei 36,4 % (n=4) und das GÜ bei 41,6 % (n=5), für die der Score 1+2-Gruppe liegt das EFÜ bei 28,9 % (n=10) und das GÜ bei 42,6 % (n=15). Von den Patienten der Score 3+4-Gruppe erlitten alle ein Rezidiv oder verstarben (EFÜ=0 %), das GÜ liegt bei 0 %⁶ (EFÜ: p=0,32; GÜ: p=0,92) (siehe Abbildung 16).

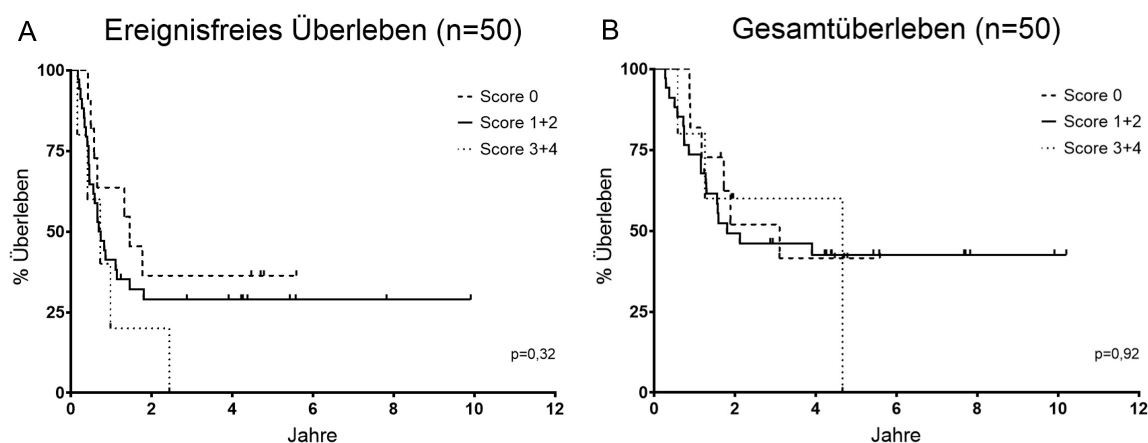


Abbildung 16: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten in Abhängigkeit vom B-Content Score in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

3.1.3.5 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit vom KIR Ligand-Modell

Die Berechnung der HLA-Mismatches der Neuroblastompatienten und ihrer Spender erfolgte analog zu Kapitel 3.1.2.5. Für 39 der 50 Patient-Spender-Paare war der HLA-Status erhebbar. Das EFÜ der Gruppe ohne HLA-Mismatch (n=28)

⁶ 2 Patienten waren zum Zeitpunkt ihres LFU noch am Leben, wiesen jedoch eine sehr kurze Nachbeobachtungszeit < 2 Jahre nach hHSZT auf, was bei der Berechnung durch die Statistiksoftware entsprechend einberechnet wurde.

beträgt 27,5 % (n=8), das GÜ 40,2 % (n=12). Nur einer der Patienten wies 2 HLA-Mismatches auf, daher erfolgte die Auswertung kombiniert für alle Patienten mit HLA-Mismatch (n=11). Für diese Gruppe zeigt sich ein EFÜ von 36,4 % (n=4) und ein GÜ von 36,4 % (n=5) (EFÜ: p=0,33; GÜ: p=0,52) (siehe Abbildung 17).

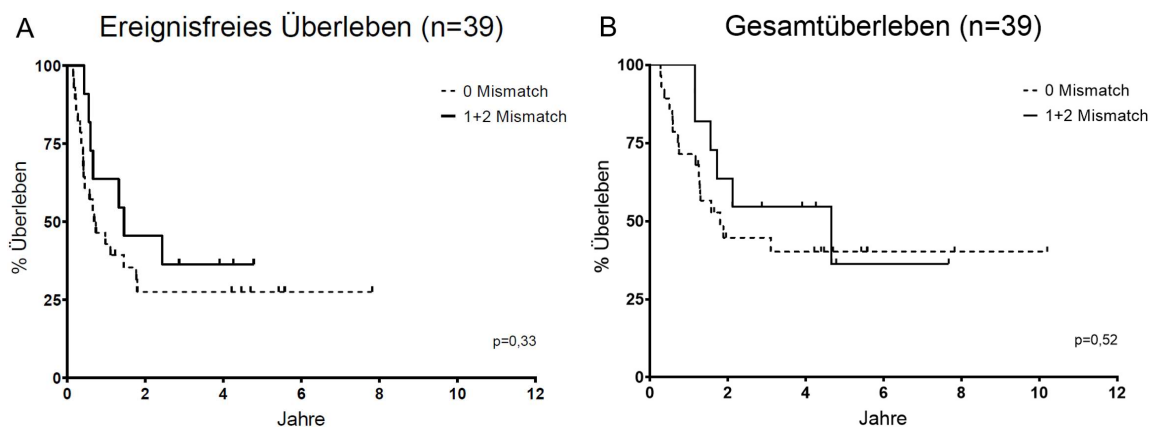


Abbildung 17: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der Neuroblastompatienten in Abhängigkeit von den HLA-Mismatches in Jahren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

3.1.3.6 Verteilung der Inzidenzen der GvHD in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp

Die Inzidenz der aGvHD beträgt für die KIR A-Patienten 50,0 % (n=5) und für die KIR B-Patienten 57,5 % (n=23) (p=0,73). Etwas niedrigere Inzidenzen finden sich jeweils für die cGvHD mit 30,0 % (n=3) für KIR A und 20,0 % (n=8) für KIR B (p=0,67) (siehe Abbildung 18).

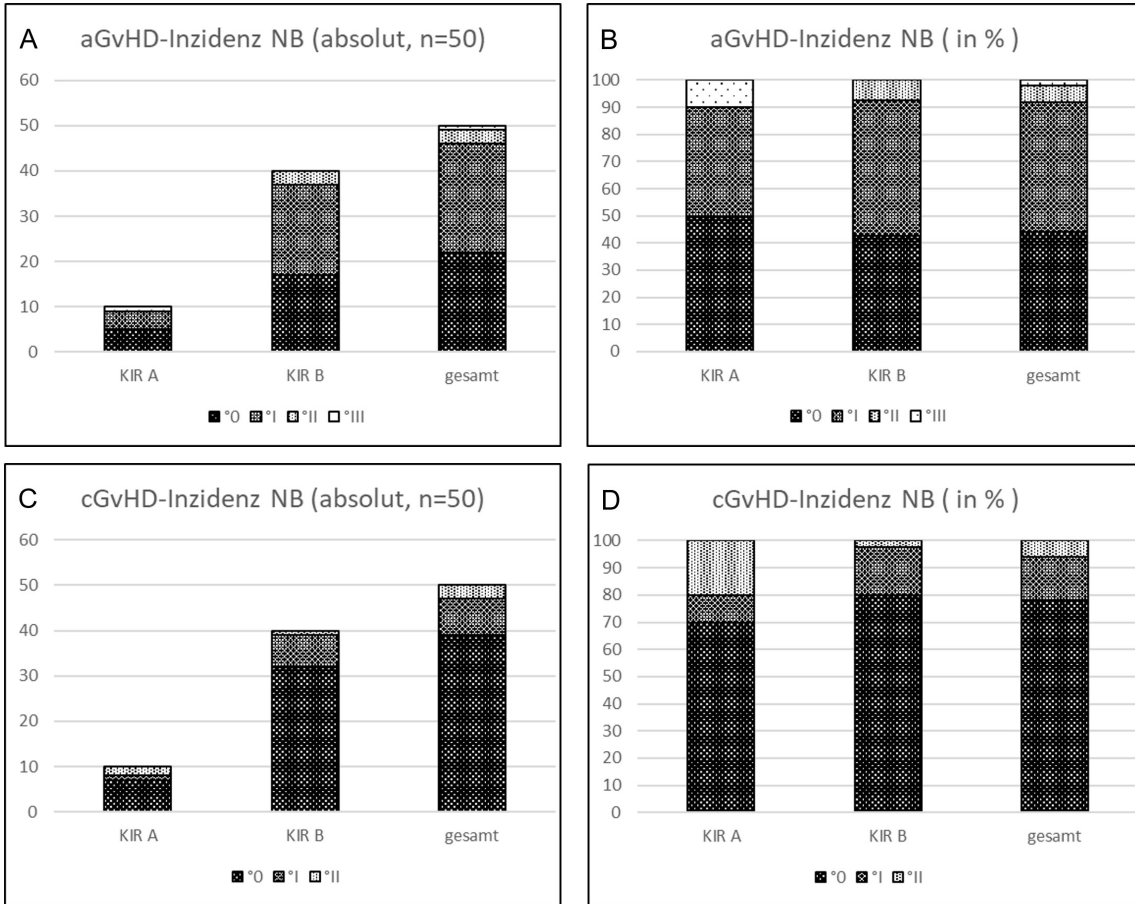


Abbildung 18: Inzidenz von akuter (A+B) und chronischer (C+D) Graft-versus-Host Disease (aGvHD bzw. cGvHD) der Neuroblastompatienten (NB) in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp

3.2 FcGR und CH 14.18-Antikörper-Therapie

3.2.1 FcGR-Genotyp Bestimmung mittels PCR

Die Bestimmung des FcGR2A-Genotyps erfolgte mittels konventioneller PCR und anschließender Gelelektrophorese nach RFLP (vgl. Kapitel 2.2.4 und 2.2.5). Abbildung 19 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen Gelelektrophorese. Der Genotyp wurde anhand der Anzahl und Größe der Banden ermittelt. Dabei entspricht das längere Fragment dem H-Allel (343 bp) und das kürzere Fragment dem R-Allel (322 bp). Findet sich eine Doppelbande liegen beide Allele und somit der heterozygote Genotyp HR vor.

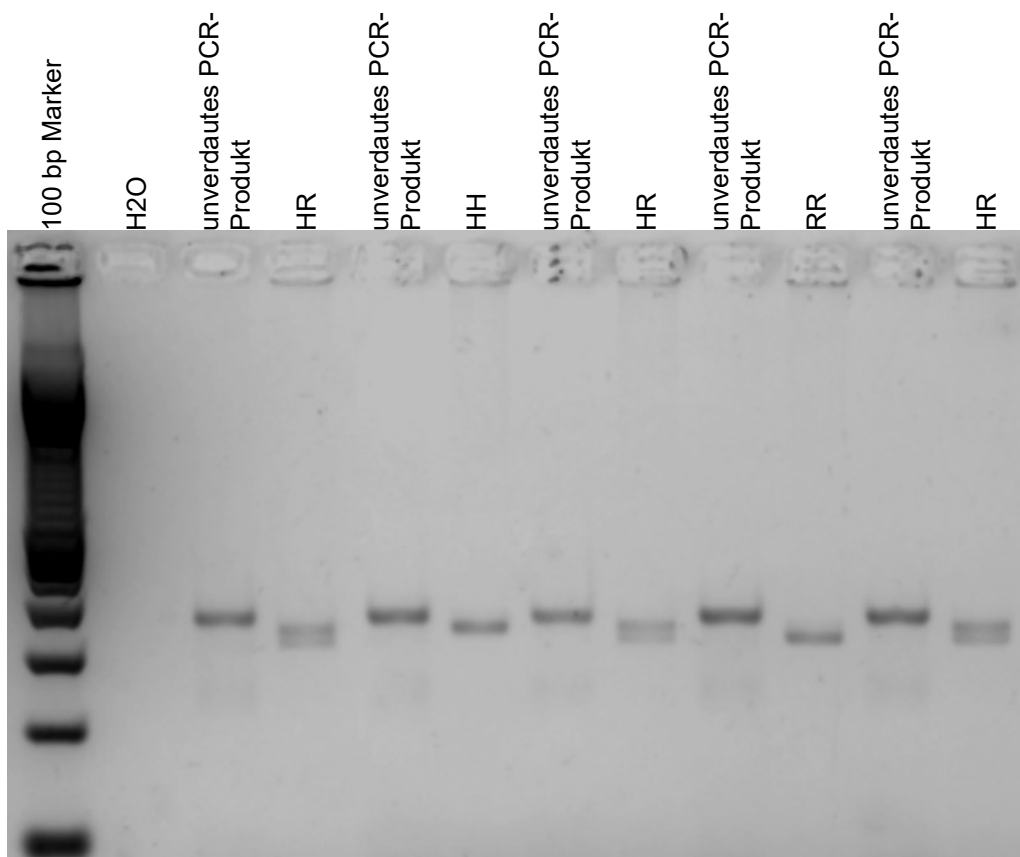


Abbildung 19: Gelelektrophorese zur Bestimmung des FcGR2A-Genotyps. H-Bande = 343 bp, R-Bande = 322 bp, unverdaute Bande = 366 bp

Der FcGR3A-Genotyp wurde durch quantitative Real-Time PCR bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.3). Abbildung 20 zeigt beispielhaft die daraus resultierenden Schmelzkurven. Liegt das F- bzw. V-Allel vor, so kann für den Reaktionsansatz

mit dem entsprechenden Reverse-Primer für F oder V (RF, RV) ein Peak bei der charakteristischen Schmelztemperatur beobachtet werden. Aus der Kombination der Kurven von RV und RF derselben Probe kann dann der jeweilige Genotyp ermittelt werden.

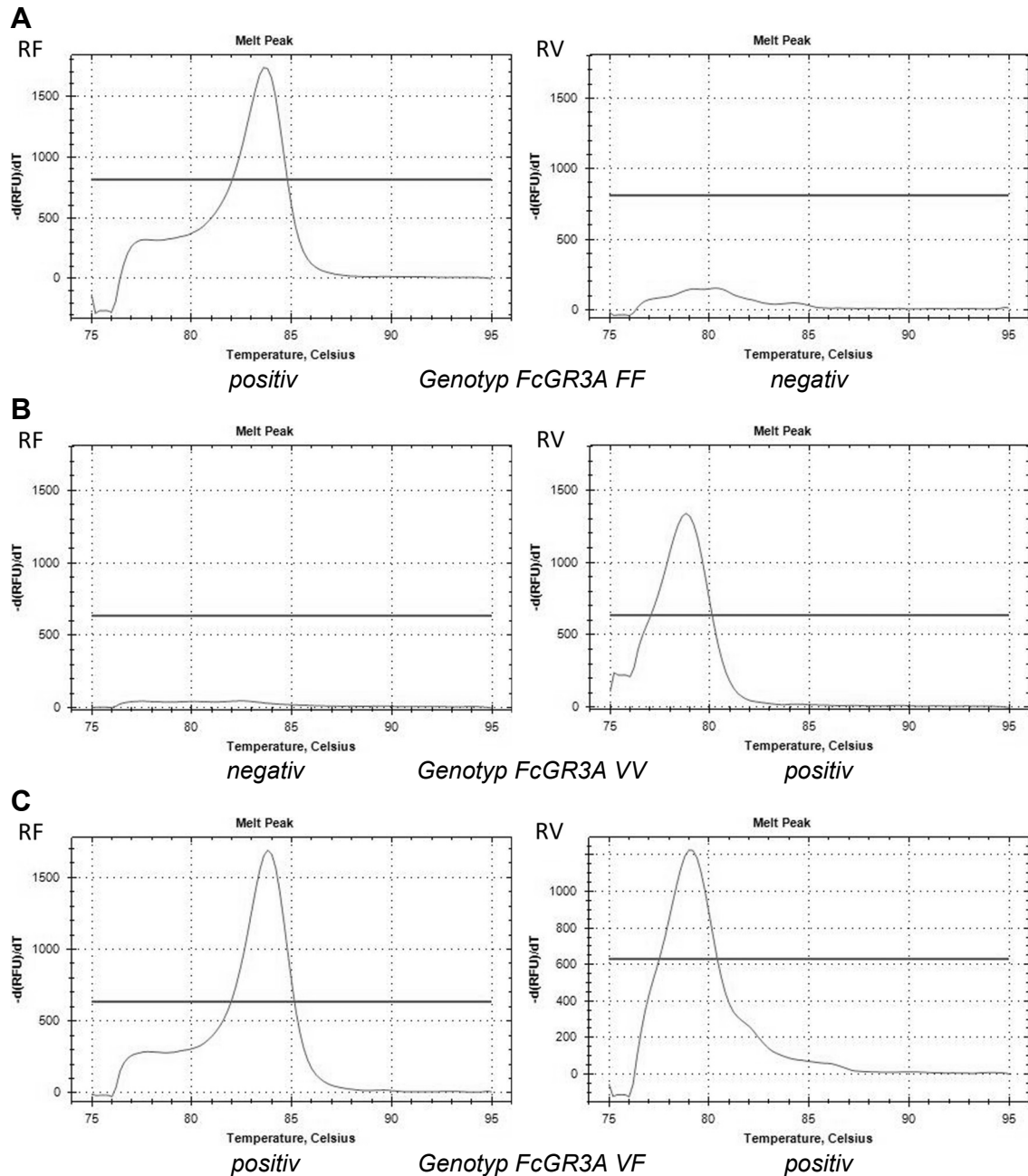


Abbildung 20: Schmelzkurven einer FcGR3A Real-Time PCR für die Genotypen FF (A), VV (B) und VF (C). (RF = Primer Reverse F; RV = Primer Reverse V)

3.2.2 Patientencharakteristika

Es wurden die DNA-Proben von 33 pädiatrischen Neuroblastompatienten nach HSZT, anhand des im Kapitel 2.2.4 und 2.2.3.2 beschriebenen Protokolls bezüglich ihres FcGR2A- und FcGR3A-Genotyps typisiert und der klinische Verlauf der Patienten nach Beginn der Therapie mit dem CH 14.18 - Antikörper untersucht. Die Patienten der Studienkohorte waren zu Beginn der Antikörpertherapie zwischen 3,6 und 17,2 Jahre (Durchschnitt 8,3 Jahre) alt. Die Therapien wurden im Zeitraum von 2005 bis 2019 in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen durchgeführt und die klinischen Daten bis Juli 2019 erhoben.

Die ermittelte Verteilung der Genotypen entspricht näherungsweise den erwarteten Häufigkeiten in einer europäischen Bevölkerung⁷. Sie betrug bei FcGR2A 15,2 % für den Genotyp HH (erwartet: 26,5 %), 72,7 % für den Genotyp HR (erwartet: 45,1 %) und 12,1 % für den Genotyp RR (erwartet: 28,3 %). Bei FcGR3A hatten 27,3 % der Patienten den Genotyp VV (erwartet: 13,6 %), 30,3 % den Genotyp VF (erwartet: 45,3 %) und 42,4 % den Genotyp FF (erwartet: 41,1 %). Die Anzahl der erhaltenen Antikörpergaben variierte zwischen 1-17 Zyklen. Weitere Patientencharakteristika sind in den folgenden Tabellen (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25) aufgeführt.

Tabelle 24: Patientencharakteristika unterteilt nach FcGR2A-Genotyp

	FcGR2A				p	gesamt	%
	HH/HR	%	RR	%			
Anzahl							
	29	87,9	4	12,1		33	
Geschlecht					>0,9999*		
männlich	25	86,2	4	100,0		29	87,9
weiblich	4	13,8	0	0,0		4	12,1
Alter bei HSZT					0,23		
Min.	3,3		5,7			3,3	
Max.	17		7,2			17	
Durchschnittsalter	8,2		6,7			8	

⁷ abrufbar auf NCBI

FcGR3A: CSAgilent, ss491608261

FcGR2A: HapMap-CEU, ss44034688

FcGR2A							
	HH/HR	%	RR	%	p	gesamt	%
Alter zu Beginn der Antikörpertherapie					0,13		
Min.	3,6		6,9			3,6	
Max.	17,2		7,6			17,2	
Durchschnittsalter	8,4		7,2			8,3	
Zytogenetik					0,86*		
n-myc negativ	21	72,4	3	75,0		24	72,7
n-myc positiv	6	20,7	1	25,0		7	21,2
unbekannt	2	6,9	0	0,0		2	6,1
Remissionsstatus bei HSZT					0,92*		
komplette Remission	6	20,7	1	25,0		7	21,2
Teilremission	22	75,9	3	75,0		25	75,8
Progress	1	3,4	0	0,0		1	3,0
Remissionsstatus vor Antikörpertherapie					0,72*		
komplette Remission	7	24,1	1	25,0		8	24,2
Teilremission	18	62,1	3	75,0		21	63,6
unbekannt	4	13,8	0	0,0		4	12,1
Anzahl Antikörperzyklen					0,41		
Min.	1		1			1	
Max.	17		9			17	
Durchschnitt	6,6		7,4			6,6	
Median	6		9			6	
Rezidiv					0,34		
ja	16	55,2	1	25,0		17	51,5
nein	13	44,8	3	75,0		16	48,5
Aktueller Status					0,35*		
komplette Remission	13	44,8	2	50,0		15	45,5
NRM	1	3,4	1	25,0		2	6,1
Rezidiv/Progress	1	3,4	0	0,0		1	3,0
Verstorben nach Rezidiv	14	48,3	1	25,0		15	45,5
FcGR3A					0,62		
VV/VF	16	55,2	3	75,0		19	57,6
FF	13	44,8	1	25,0		14	42,4
Überleben zum Zeitpunkt des letzten Follow up					>0,9999		
Am Leben	14	48,3	2	50,0		16	48,5
Verstorben	15	51,7	2	50,0		17	51,5

* Wert aufgrund der geringen Patientenzahl in einigen Subgruppen nicht verlässlich verwertbar

(HSZT = hämatopoetische Stammzelltransplantation, NRM = non-relapse-mortality)

Tabelle 25: Patientencharakteristika unterteilt nach FcGR3A-Genotyp

	FcGR3A				p	gesamt	%
	VV/VF	%	FF	%			
Anzahl							
	19	57,6	14	42,4		33	
Geschlecht					>0,9999		
männlich	17	89,5	12	85,7		29	87,9
weiblich	2	10,5	2	14,3		4	12,1
Alter bei HSZT					0,99		
Min.	3,6		3,3			3,3	
Max.	16,9		17			17	
Durchschnittsalter	7,6		8,5			8	
Alter zu Beginn der Antikörpertherapie					0,94		
Min.	4,2		3,6			3,6	
Max.	17,1		17,2			17,2	
Durchschnittsalter	8		8,7			8,3	
Zytopenetik					0,24		
n-myc negativ	12	63,2	12	85,7		24	72,7
n-myc positiv	6	31,6	1	7,1		7	21,2
unbekannt	1	5,3	1	7,1		2	6,1
Remissionsstatus bei HSZT					0,45*		
komplette Remission	5	26,3	2	14,3		7	21,2
Teilremission	13	68,4	12	85,7		25	75,8
Progress	1	5,3	0	0,0		1	3,0
Remissionsstatus vor Antikörpertherapie					0,25		
komplette Remission	6	31,6	2	14,3		8	24,2
Teilremission	12	63,2	9	64,3		21	63,6
unbekannt	1	5,3	3	21,4		4	12,1
Anzahl Antikörperzyklen					0,85		
Min.	1		1			1	
Max.	9		17			17	
Durchschnitt	6,2		7,2			6,6	
Median	6		7,5			6	
Rezidiv					0,30		
ja	8	42,1	9	64,3		17	51,5
nein	11	57,9	5	35,7		16	48,5
Aktueller Status					0,4*		
komplette Remission	9	47,4	6	42,9		15	45,5
NRM	2	10,5	0	0,0		2	6,1
Rezidiv/Progress	0	0,0	1	7,1		1	3,0
Verstorben nach Rezidiv	8	42,1	7	50,0		15	45,5

	FcGR3A				p	gesamt	%
	VV/VF	%	FF	%			
FcGR2A					0,62		
HH/HR	16	84,2	13	92,9		29	87,9
RR	3	15,8	1	7,1		4	12,1
Überleben zum Zeitpunkt des letzten Follow up					>0,9999		
Am Leben	9	47,4	7	50,0		16	48,5
Verstorben	10	52,6	7	50,0		17	51,5

* Wert aufgrund der geringen Patientenzahl in einigen Subgruppen nicht verlässlich verwertbar

(HSZT = hämatopoetische Stammzelltransplantation, NRM = non-relapse-mortality)

3.2.3 **Überlebenszeitanalyse der mit CH 14.18-Antikörper therapierten Patienten**

Nach der Genotypisierung der Patienten erfolgte die Untersuchung hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen Genotyp und Verlauf der Erkrankung während der CH 14.18-Antikörpertherapie und im Anschluss daran.

3.2.3.1 *Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach FcGR-Genotyp*

Am Ende des Beobachtungszeitraumes waren 45,1 % (n=14) der Patienten mit Genotyp FcGR2A HH/HR und 50,0 % (n=2) der Patienten mit Genotyp RR noch am Leben (GÜ: p=0,77). Das EFÜ beträgt 38,9 % (n=12) für den Genotyp HH/HR und 50,0 % (n=2) für den Genotyp RR (p=0,65).

Für FcGR3A zeigen sich folgende Ergebnisse: GÜ Genotyp VV/VF 43,9 % (n=9), Genotyp FF 46,9 % (n=7) (p=0,64) und EFÜ Genotyp VV/VF 45,2 % (n=9), Genotyp FF 32,7 % (n=5) (p=0,53).

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Genotypen HH/HR vs. RR bzw. VV/VF vs. FF hinsichtlich des GÜ und des EFÜ der Patienten nach der Antikörpertherapie (siehe Abbildung 21).

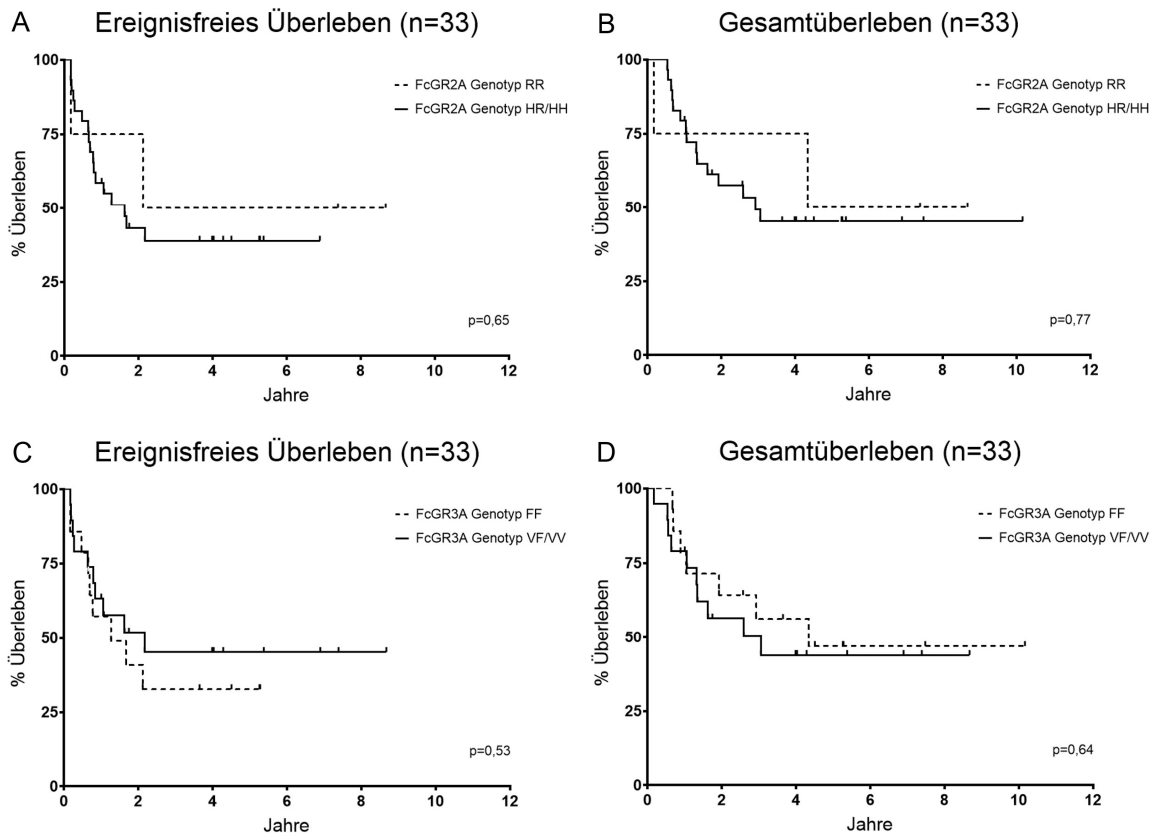


Abbildung 21: Ereignisfreies Überleben (A+C) und Gesamtüberleben (B+D) nach FcGR-Genotyp in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18

Die Rezidivrate beträgt für FcGR2A HH/HR 57,9 % (n=16), die NRM 7,7 % (n=1). Für FcGR2A RR liegt die Rezidivrate bei 33,3 % (n=1) und die NRM bei 25,0 % (n=1) (Rezidivrate: p=0,34, NRM: p=0,18) (siehe Abbildung 22 A).

Entsprechend findet sich bei FcGR3A VV/VF eine Rezidivrate von 47,0 % (n=8) und eine NRM von 14,7 % (n=2). Für den Genotyp FF liegt die Rezidivrate bei 67,3 % (n=9), Patienten die während des Beobachtungszeitraums ohne Rezidiv verstarben fanden sich in dieser Gruppe nicht (Rezidivrate: p=0,30, NRM: p=0,27) (siehe Abbildung 22 B).

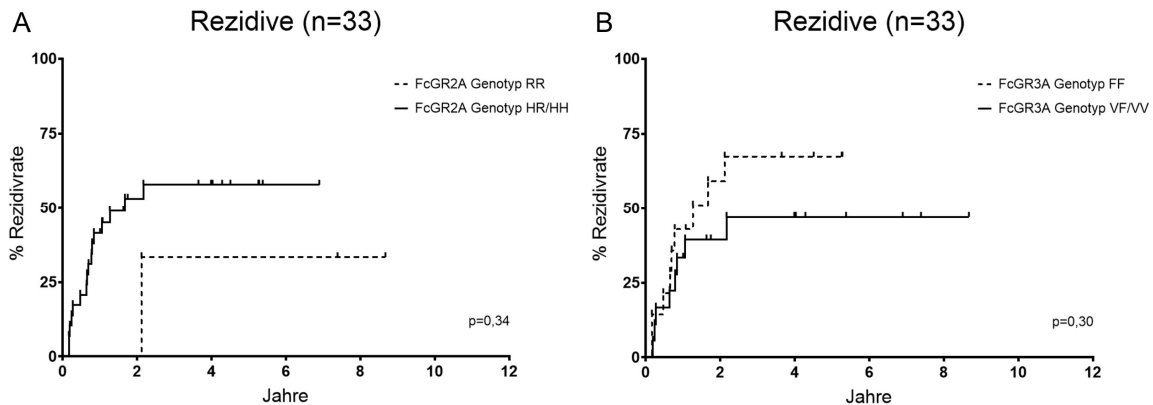


Abbildung 22: Rezidivrate abhängig vom FcGR2A (A) bzw. FcGR3A-Genotyp(B) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18

3.2.3.2 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben nach Remissionsstatus vor Antikörpertherapie

Im Anschluss erfolgte die getrennte Auswertung in 2 Untergruppen CR und PR (PR beinhaltet dabei alle Patienten in PR, Progress oder SD), abhängig vom Remissionsstatus zu Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18, da vermutet wurde, dass dieser einen relevanten Einfluss auf den Therapieerfolg hat. Der Remissionsstatus vor Beginn der Antikörpertherapie war für 29 der 33 Patienten erhebbar.

Von den 8 Patienten die zu Beginn der Therapie mit CH 14.18 eine CR aufwiesen, befanden sich beim LFU 5 Patienten (62,5 %) in CR, 1 Patient (12,5 %) hatte ein Rezidiv erlitten und 2 Patienten (25 %) sind ohne vorheriges Rezidiv verstorben. Von den 21 Patienten in PR vor der Antikörpertherapie waren 9 Patienten (42,9 %) beim LFU in CR und 12 Patienten (57,1 %) hatten ein Rezidiv. Das EFÜ beträgt 60,0 % (n=5) für die Patienten in CR und 37,0 % (n=8) für die Patienten in PR (p=0,37), das GÜ 58,3 % (n=5) für Patienten in CR und 44,4 % (n=10) für Patienten in PR (p=0,74). Es können keine signifikanten Unterschiede bezüglich EFÜ und GÜ zwischen den Gruppen CR bzw. PR vor Antikörpertherapie festgestellt werden (siehe Abbildung 23).

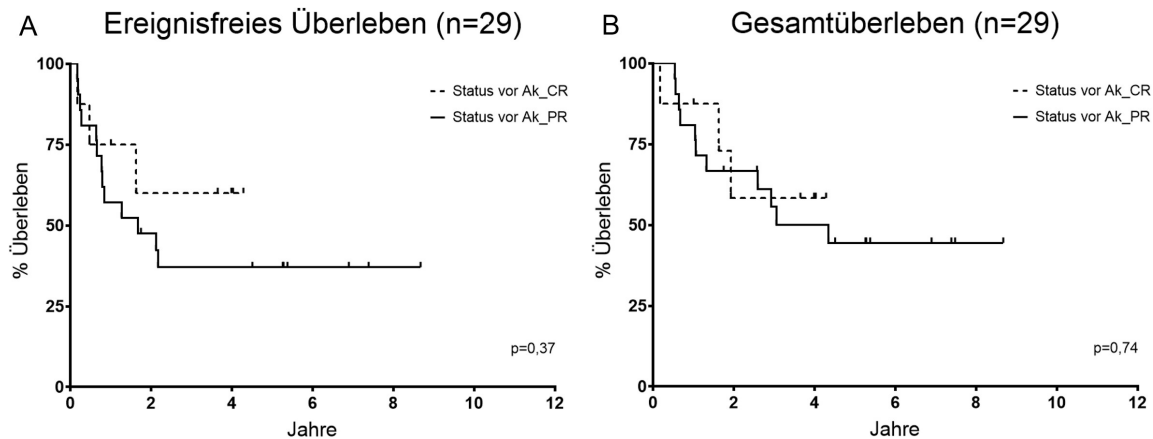
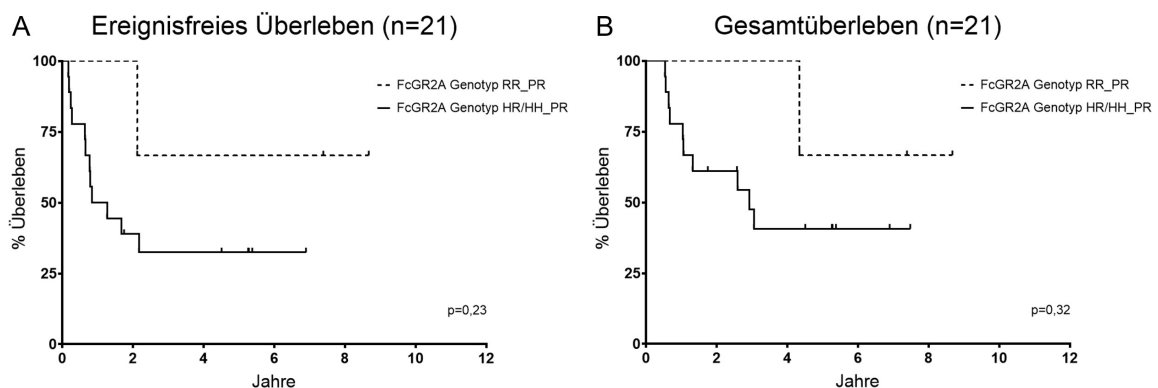


Abbildung 23: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18 (Ak) unterteilt nach Remissionsstatus vor Antikörpertherapie. PR fasst Patienten in PR und Progress zusammen. (CR = complete remission, PR = partial remission)

Getrennt nach Genotypen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Das EFÜ für Patienten aus der Gruppe FcGR2A - PR vor Antikörpertherapie beträgt 32,4 % (n=6) für den Genotyp HR/HH und 66,7 % (n=2) für den Genotyp RR (p=0,23). Das GÜ für Genotyp HR/HH 40,7 % (n=8) und 66,7 % (n=2) für Genotyp RR (p=0,32).

Für FcGR3A - PR zeigen sich folgende Ergebnisse: EFÜ Genotyp VF/VV 40,0 % (n=5), Genotyp FF 33,3 % (n=3) (p=0,91), GÜ Genotyp VF/VV 38,9 % (n=5), Genotyp FF 51,9 % (n=5) (p=0,42). Abbildung 24 zeigt die Überlebenszeitkurven.

Aufgrund der geringen Patientenzahl von n=1 bzw. n=2 der Genotypen FcGR2A RR und FcGR3A FF in der Gruppe „CR vor Antikörpertherapie“, konnte für diese Gruppe keine Überlebenszeitanalyse erfolgen.



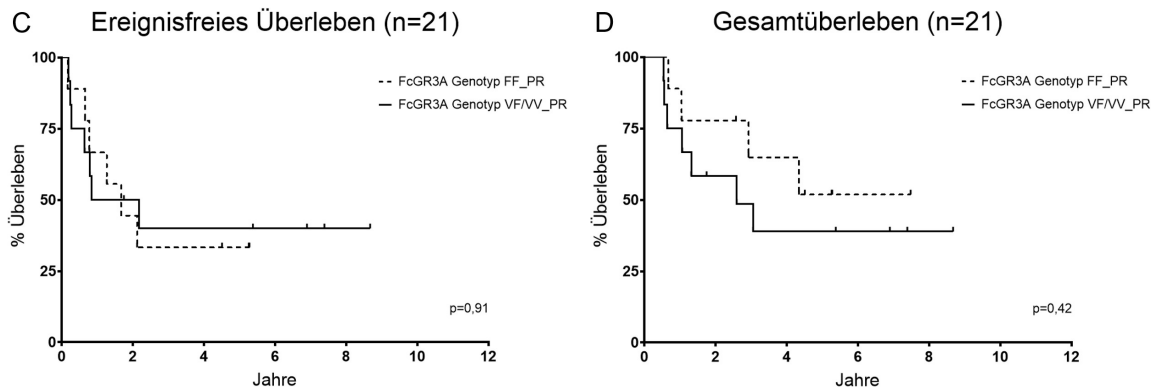


Abbildung 24: Ereignisfreies Überleben (A+C) und Gesamtüberleben (B+D) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie unterteilt nach Genotyp und Remissionsstatus vor Antikörpertherapie mit CH 14.18. PR fasst Patienten in Teilremission und Progress zusammen.

3.2.3.3 Hoch- und niederaffine FcGR-Gruppen und ihr Einfluss auf Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben

Analog zur Arbeit von Siebert et al. (2016) wurden die Patienten außerdem, nach der Kombination ihrer FcGR2A- und 3A-Genotypen in Gruppen mit hoher bzw. niederer Bindungsaffinität zu IgG-Molekülen aufgeteilt (siehe Abbildung 25), wobei die Patienten der hochaffinen Gruppe jeweils mindestens ein Allel mit hoher Bindungsaffinität für FcGR2A und eines für FcGR3A aufweisen müssen. Alle Patienten mit einem oder zwei homozygot niederaffinen Genotypen wurden der niederaffinen Gruppe zugeordnet.

FcGR2A \ FcGR3A	HH (n=5)	HR (n=24)	RR (n=4)
VV (n=9)	3	6	0
VF (n=10)	1	6	3
FF (n=14)	1	12	1

Abbildung 25: Einteilung der FcGR Genotypen in hoch- und niederaffine Gruppen (Hochaffin = dunkelgrau (n=16), niederaffin = hellgrau (n=17))

Das EFÜ liegt in der hochaffinen Gruppe bei 40,5 % (n=7) und in der niederaffinen Gruppe bei 39,2 % (n=7). Das GÜ beträgt 38,7 % (n=7) für die

hochaffine Gruppe und 51,0 % (n=9) für die niederaffine Gruppe (siehe Abbildung 26).

Die Analyse des GÜ und EFÜ zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten der hoch- und niederaffinen Gruppe (EFÜ: 0,83; GÜ: p=0,44).

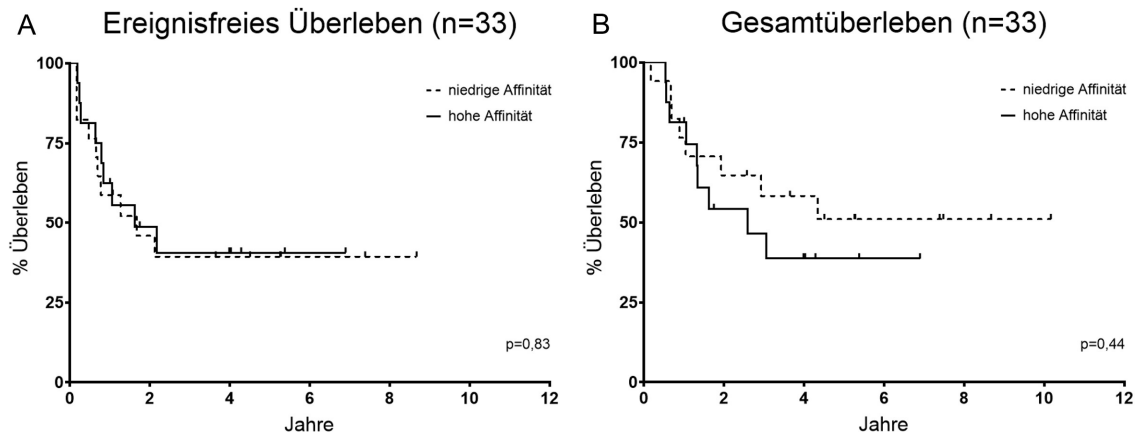


Abbildung 26: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) der hoch- und niederaffinen Gruppe in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18

Von den Patienten der hochaffinen Gruppe (n=16) hatten 53,7 % (n=8) einen Rückfall, die NRM beträgt 12,5 % (n=1), in der niederaffinen Gruppe (n=17) erlitten 58,0 % (n=9) der Patienten einen Rückfall, die NRM beträgt 6,7 % (n=1) (Rezidivrate: p=0,83, NRM: p>0,98) (siehe Abbildung 27).

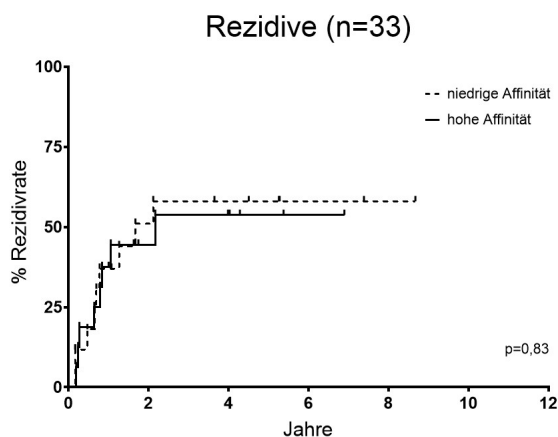


Abbildung 27: Rezidivrate der hoch- und niederaffinen Gruppe in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18

Es erfolgte in den Untergruppen hoch-/niederaffiner Genotyp ebenfalls eine Auswertung der Daten hinsichtlich des Einflusses des Remissionsstatus vor

Antikörpertherapie mit CH 14.18, dieser war für 29 der 33 Patienten erruierbar. Das EFÜ beträgt für die Patienten, die zu Beginn der Antikörpertherapie in CR waren 75,0 % (n=4), wenn sie zur hochaffinen Gruppe gehören und 33,3 % (n=1), wenn sie der niederaffinen Gruppe angehören (p=0,14). Für die Patienten in PR zu Beginn der Antikörpertherapie sind es 26,7 % (n=3) in der hochaffinen und 45,5 % (n=5) in der niederaffinen Gruppe (p=0,33). Das GÜ für die Gruppe der Patienten in CR vor Antikörpertherapie beträgt 75,0 % (n=4) für die hochaffine und 33,3 % (n=1) für die niederaffine Gruppe (p=0,29). Bei den Patienten in PR sind es 25,0 % (n=3) für die hochaffine Gruppe und 61,4 % (n=7) für die niederaffine (p=0,07). Abbildung 28 zeigt die Überlebenszeitkurven.

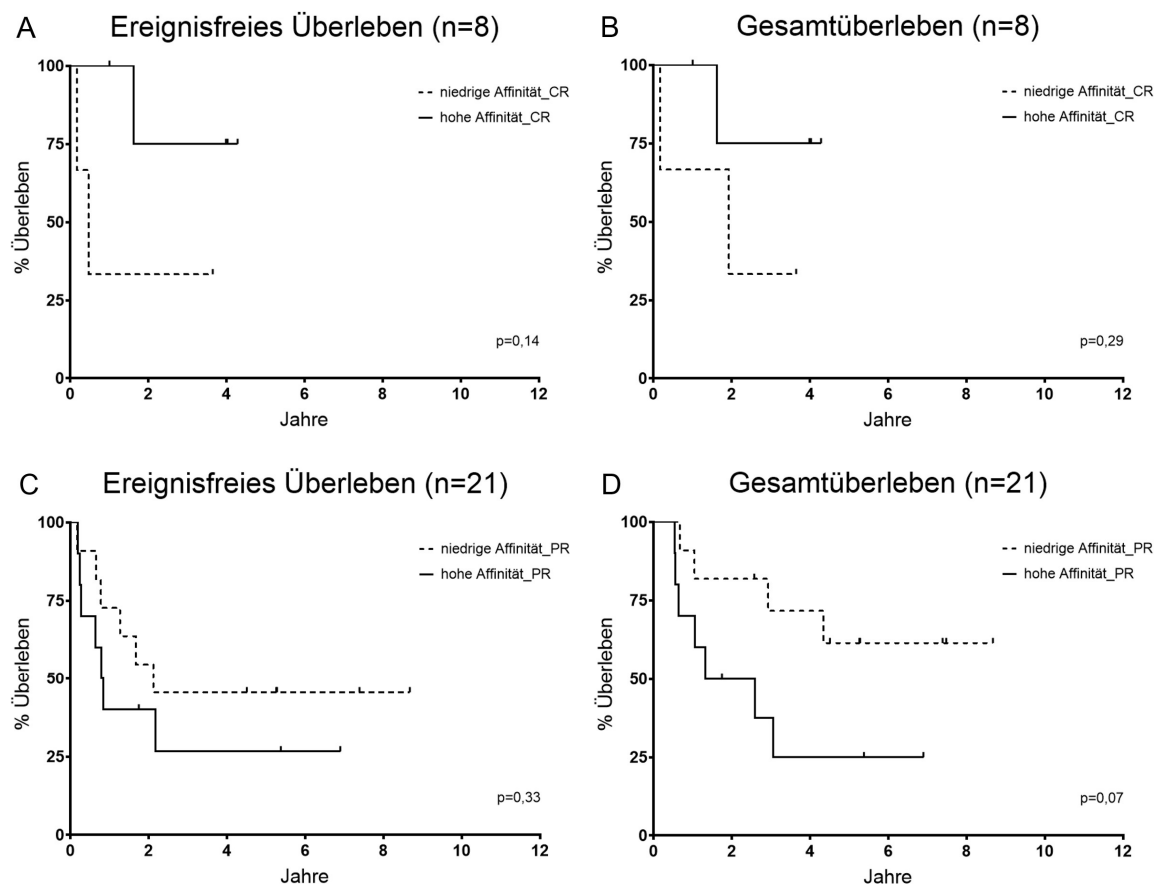


Abbildung 28: Ereignisfreies Überleben (A, C) und Gesamtüberleben (B, D) der hoch- und niederaffinen Gruppe in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie unterteilt nach Remissionsstatus vor Antikörpertherapie mit CH 14.18. PR fasst Patienten in PR und Progress zusammen. (CR = complete remission, PR = partial remission)

3.2.3.4 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit der Anzahl an erhaltenen CH 14.18-Antikörperzyklen

Die Patienten erhielten zwischen 1 und 17 Zyklen des CH 14.18 - Antikörpers. Von den 11 Patienten, die weniger als 6 Zyklen der Antikörpertherapie erhalten hatten, erlitten 9 (81,8 %) einen Rückfall, 1 Patient (9,1 %) verstarb ohne vorheriges Rezidiv und 1 Patient (9,1 %) befindet sich seit Ende der Antikörpertherapie in kompletter Remission. 22 Patienten erhielten 6 oder mehr Zyklen der Antikörpertherapie, von ihnen erlitten 8 (36,4 %) ein Rezidiv, 1 Patient (4,5 %) verstarb ohne vorheriges Rezidiv und 13 (59,1 %) befinden sich seit Ende der Antikörpertherapie in CR. Das EFÜ beträgt somit 0 %⁸ für Patienten mit weniger als 6 Antikörperzyklen und 57,0 % (n=13) für Patienten mit 6 oder mehr Zyklen ($p < 0,0001$). Beim GÜ sind es 0 %⁹ bei Patienten mit weniger als 6 Zyklen und 64,0 % (n=15) für Patienten mit ≥ 6 Zyklen ($p < 0,0001$) (siehe Abbildung 29).

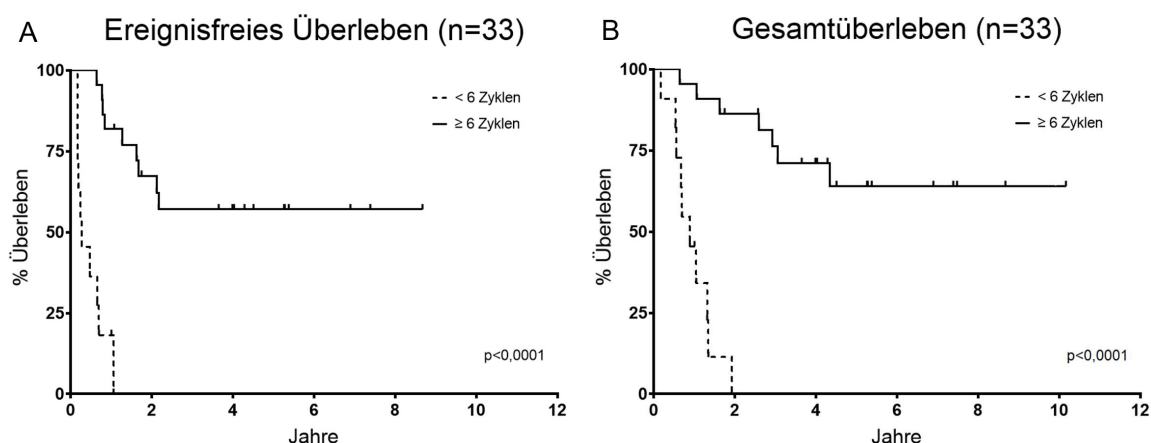


Abbildung 29: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie unterteilt nach Anzahl der erhaltenen CH 14.18 - Antikörperzyklen

⁸ 1 Patient war zum Zeitpunkt seines LFU rezidivfrei, wies jedoch eine sehr kurze Nachbeobachtungszeit von nur 1 Jahr nach Beginn der Therapie mit CH 14.18 auf, was bei der Berechnung durch die Statistiksoftware entsprechend einberechnet wurde.

⁹ 1 Patient war zum Zeitpunkt seines LFU noch am Leben, wies jedoch eine sehr kurze Nachbeobachtungszeit von nur 1 Jahr nach Beginn der Therapie mit CH 14.18 auf, was bei der Berechnung durch die Statistiksoftware entsprechend einberechnet wurde.

3.2.3.5 Gesamtüberleben und Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit einer n-myc-Amplifikation

Für 31 der 33 Patienten konnte der n-myc-Status erhoben werden, davon wiesen 7 Patienten eine n-myc-Amplifikation auf. Patienten mit n-myc-Amplifikation erlitten zu 28,6 % (n=2) ein Rezidiv, 57,1 % (n=4) befinden sich seit Ende der Antikörpertherapie mit CH 14.18 in CR, die NRM betrug 14,3 % (n=1). Bei den Patienten ohne n-myc-Amplifikation erlitten 62,5 % (n=15) ein Rezidiv und 33,3 % (n=8) befinden sich seit Ende der Antikörpertherapie in CR. Die NRM beträgt in dieser Gruppe 4,2 % (n=1). Das GÜ liegt bei 57,1 % (n=4) für Patienten mit n-myc-Amplifikation und bei 38,7 % (n=10) für Patienten ohne Amplifikation ($p=0,97$), das EFÜ bei 57,1 % (n=4) für Patienten mit n-myc-Amplifikation und 33,3 % (n=8) für solche ohne Amplifikation ($p=0,69$) (siehe Abbildung 30).

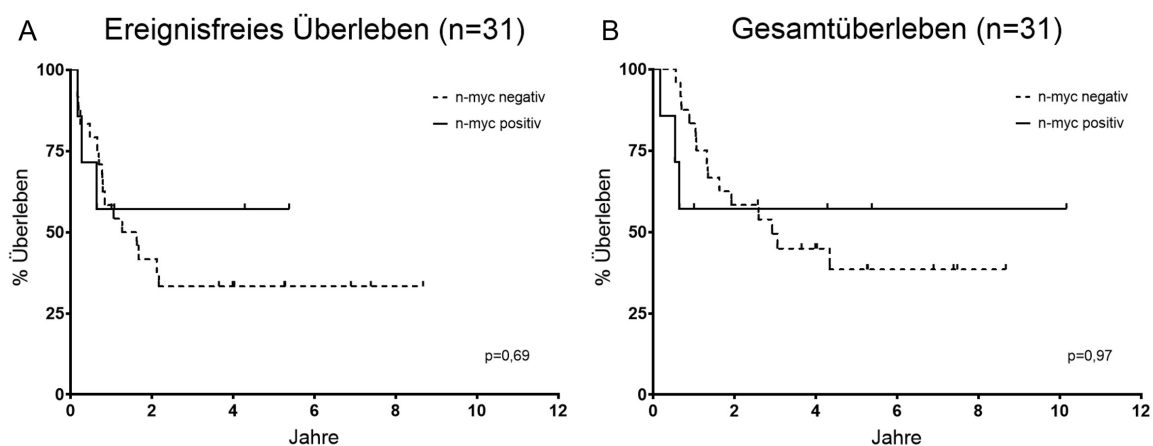


Abbildung 30: Ereignisfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Jahren nach Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18 nach Vorhandensein einer n-myc-Amplifikation

3.3 SUFU

3.3.1 SUFU-Genotyp Bestimmung mittels PCR

Der SUFU-Genotyp der Patienten wurde mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.3). Abbildung 31 zeigt beispielhaft ein solches PCR-Ergebnis. Anhand des Vorhandenseins der Kopien des C- bzw. T -Allels, welche mit den Sonden VIC (C-Allel) und FAM (T-Allel) detektiert werden können, kann der Genotyp für die jeweils untersuchte DNA-Probe bestimmt werden.

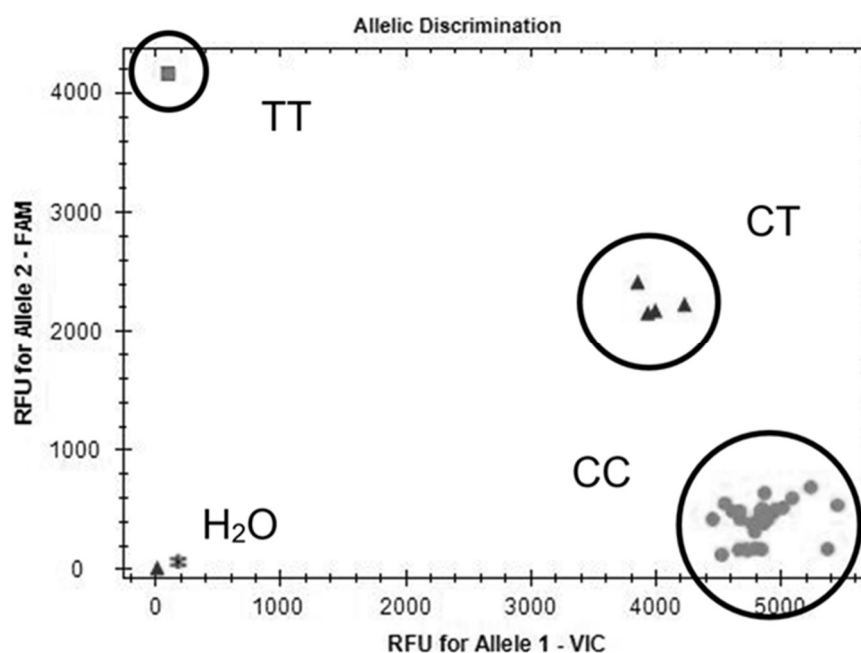


Abbildung 31: Beispiel eines PCR-Laufes zur Bestimmung des SUFU-Genotyps. ■ = homozygot für Allel T, ● = homozygot für Allel C, ▲ = heterozygot, Allel T und C; ▲* = H₂O = Negativkontrolle (RFU = relative fluorescence units)

3.3.2 Patientencharakteristika

Es wurden DNA-Proben von 733 adulten und 137 pädiatrischen Patienten, welche aufgrund verschiedener maligner und nicht-maligner Erkrankungen stammzelltransplantiert wurden, untersucht. Anschließend erfolgte eine Auswertung der Daten hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen dem vorliegenden Genotyp (CC oder CT/TT) und dem Auftreten einer aGvHD nach der Transplantation.

Die pädiatrischen Patienten waren zwischen 8 Wochen und 25 Jahren alt und wurden zwischen 2004 und 2015 in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen transplantiert. Die erwachsenen Patienten waren zwischen 18 und 77 Jahren alt und wurden zwischen 2004 und 2013 in der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen transplantiert. Die klinischen Daten wurden bis 2017 erhoben. Weitere Patientencharakteristika sind in Tabelle 26 dargestellt.

Die erwartete Allelfrequenz beträgt nach den auf NCBI verfügbaren Daten für Europäer¹⁰ für CC 82,1 % für CT 16,1 % und für TT 1,8 % vergleichbare Allelfrequenzen zeigten sich mit CC 80,4 %, CT 18,9 % und TT 0,7 % bei den Erwachsenen und CC 74,5 %, CT 24,0 % und TT 1,5 % bei den Kindern auch in dieser Arbeit.

Tabelle 26: Patientencharakteristika unterteilt nach SUFU Genotyp. Modifiziert nach Katz et al. (2018)

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	CC	%	CT/TT	%	p-Wert	CC	%	CT/TT	%	p-Wert
N										
	589	80,4	144	19,6		102	74,5	35	25,5	
Diagnose	0,274*					0,444*				
ALL	76	12,9	16	11,1		22	21,6	12	34,3	
AML	294	49,9	60	41,7		19	18,6	3	8,6	
CLL	11	1,9	1	0,7		0	0,0	0	0,0	
CML	14	2,4	6	4,2		1	1,0	0	0,0	
MDS	59	10,0	15	10,4		8	7,8	4	11,4	
M. Hodgkin	4	0,7	2	1,4		0	0,0	0	0,0	
MPS	32	5,4	10	6,9		0	0,0	0	0,0	
NHL	67	11,4	21	14,6		0	0,0	1	2,9	
Plasmozytom	24	4,1	8	5,6		0	0,0	0	0,0	
Immundefizienz	0	0,0	0	0,0		9	8,8	1	2,9	
Nicht-maligne Erkrankung	4	0,7	4	2,8		16	15,7	6	17,1	
Neuroblastom	0	0,0	0	0,0		8	7,8	4	11,4	
Sonstige maligne Erkrankungen	2	0,3	1	0,7		11	10,8	1	2,9	
Sonstige	2	0,3	0	0,0		8	7,8	3	8,6	

¹⁰ SUFU: HapMap-CEU, ss52072255

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	CC	%	CT/TT	%	p-Wert	CC	%	CT/TT	%	p-Wert
Alter bei HSZT	0,975					0,465*				
Min.	18,5		19,2			0,1		0,7		
Max.	76,9		74,7			25,0		21,7		
Durchschnittsalter	50,0		50,9			9,5		11,4		
Geschlecht	0,925					0,553				
Männlich	351	59,6	85	59,0		62	60,8	19	54,3	
Weiblich	238	40,4	59	41,0		40	39,2	16	45,7	
HLA Mismatch	0,201*					0,216*				
haploident	50	8,5	8	5,6		43	42,2	19	54,3	
3 antigen MM	4	0,7	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
2 antigen MM	29	4,9	13	9,0		0	0,0	1	2,9	
1 antigen MM	116	19,7	34	23,6		1	1,0	1	2,9	
0 antigen MM	390	66,2	89	61,8		58	56,9	14	40,0	
Stammzellquelle	0,103*					0,843*				
Knochenmark	20	3,4	8	5,6		45	44,1	14	40,0	
PBSC	568	96,4	134	93,1		57	55,9	20	57,1	
PBSC & Knochenmark	1	0,2	2	1,4		0	0,0	0	0,0	
Nabelschnurblut	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	2,9	
Graft Manipulation	0,098*					0,970*				
α/β-TCR Depletion	11	1,9	1	0,7		5	4,9	2	5,7	
CD34 Selektion	15	2,5	9	6,3		6	5,9	1	2,9	
CD3/19 Depletion	41	7,0	7	4,9		33	32,4	12	34,3	
CD3/19 Depletion & CD34 Selektion	0	0,0	0	0,0		14	13,7	5	14,3	
CD133 Selektion	0	0,0	0	0,0		1	1,0	0	0,0	
Leukapherese	484	82,2	114	79,2		0	0,0	0	0,0	
Keine	38	6,5	13	9,0		43	42,2	15	42,9	
Bestrahlung¹	0,779					0,116				
Ja	253	43,0	64	44,4		44	43,1	21	60,0	
Nein	336	57,0	80	55,6		58	56,9	14	40,0	
Konditionierung	0,638					1,000				
MAC	243	41,3	63	43,8		102	100,0	35	100,0	
RIC	346	58,7	81	56,3		0	0,0	0	0,0	
GVHD Prophylaxe²	0,891*					0,867*				
ATG/OKT3	356	60,4	93	64,6		0	0,0	1	2,9	
CNI	523	88,8	134	93,1		53	52,0	17	48,6	
MTX	209	35,5	59	41,0		43	42,2	13	37,1	
MMF	333	56,5	77	53,5		46	45,1	18	51,4	
keine Prophylaxe	1	0,2	0	0,0		6	5,9	3	8,6	

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	CC	%	CT/TT	%	p-Wert	CC	%	CT/TT	%	p-Wert
Maximaler Grad der GvHD	0,688					0,782*				
°0	300	50,9	74	51,4		45	44,1	18	51,4	
°I	120	20,4	36	25,0		32	31,4	8	22,9	
°II	75	12,7	15	10,4		7	6,9	2	5,7	
°III	78	13,2	16	11,1		16	15,7	6	17,1	
°IV	16	2,7	3	2,1		2	2,0	1	2,9	
Überleben zum Zeitpunkt des letzten Follow up	1,000					1,000				
Am Leben	297	50,4	72	50,0		65	63,7	22	62,9	
Verstorben	292	49,6	72	50,0		37	36,3	13	37,1	

* Wert aufgrund der geringen Patientenzahl in einigen Subgruppen nicht verlässlich verwertbar

¹ Ganzkörperbestrahlung; ² Mehrfachnennungen möglich

(ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CLL = chronisch lymphatische Leukämie, CML = chronisch myeloische Leukämie, MDS = myelodysplastisches Syndrom, MPS = myeloproliferatives Syndrom, NHL = Non-Hodgkin-Lymphom, HSZT = hämatopoetische Stammzelltransplantation, MM = Mismatch, PBSC = periphere Blutstammzellen, TCR = T-Zell-Rezeptor, MAC = myeloablative Konditionierung, RIC = dosisreduzierte Konditionierung, GvHD = Graft-versus-Host Disease, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Muromonab-CD3, CNI = Calcineurin-Inhibitoren, MTX = Methotrexat, MMF = Mycophenolat-Mofetil)

3.3.3 Verteilung der Inzidenzen der GvHD in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp

Insgesamt erkrankten 359 der 733 adulten Patienten an einer aGvHD (49,0 %). Von den 589 Patienten mit SUFU-Genotyp CC erkrankten 49,1 % (n=289), davon 33,1 % (n=195) an einer milden aGvHD (°I-II) und 16,0 % (n=94) an einer schweren aGvHD (°III-IV). Von den 144 Patienten mit Genotyp CT oder TT erkrankten 48,6 % (n=70), davon 35,4 % (n=51) an einer milden und 13,2 % (n=19) an einer schweren aGvHD (Inzidenz: p=0,92; Schweregrad: p=0,68).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei den pädiatrischen Patienten. Es erkrankten 74 von insgesamt 137 Patienten (54,0 %), 55,9 % (n=57) der CC homozygoten Patienten, davon 38,2 % (n=39) an einer milden und 17,6 % (n=18) an einer schweren aGvHD. Bei den Patienten mit CT/TT-Genotyp waren es 48,6 % (n=17), davon 28,6 % (n=10) an einer milden und 20,0 % (n=7) an einer schweren aGvHD (Inzidenz: p=0,56, Schweregrad: p=0,59).

Es kann somit zwischen den verschiedenen SUFU Genotypen weder ein Unterschied in der Inzidenz der aGvHD, noch in deren Schweregrad dargestellt werden (siehe Abbildung 32 und Tabelle 27).

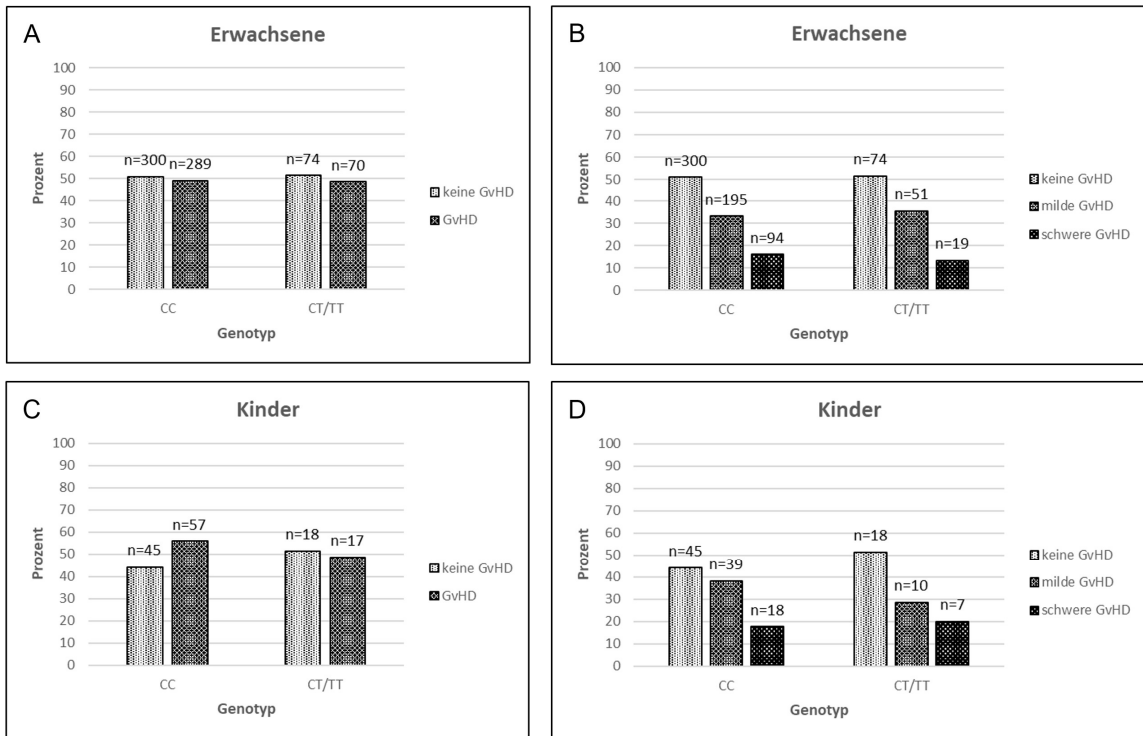


Abbildung 32: Inzidenz (A, C) und Schweregrad (B, D) der akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD) in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp. A/B adulte Patienten (n=733), C/D pädiatrische Patienten (n=137); (milde GvHD = GvHD °I-II, schwere GvHD = GvHD °III-IV) nach Katz et al. (2018)

Tabelle 27: Schweregrad der akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD) in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp. Modifiziert nach Katz et al. (2018).

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	CC	%	CT/TT	%	p-Wert	CC	%	CT/TT	%	p-Wert
N	589	80,4	144	19,6		102	74,5	35	25,5	
Maximaler Grad der GVHD					0,688					0,782
°0	300	50,9	74	51,4		45	44,1	18	51,4	
°I	120	20,4	36	25,0		32	31,4	8	22,9	
°II	75	12,7	15	10,4		7	6,9	2	5,7	
°III	78	13,2	16	11,1		16	15,7	6	17,1	
°IV	16	2,7	3	2,1		2	2,0	1	2,9	

Da die typisierten und analysierten Patienten eine sehr heterogene Gruppe bilden, wurden zusätzlich einzelne Untergruppen getrennt ausgewertet um

auszuschließen, dass die Ergebnisse durch die Heterogenität der Kohorten verfälscht wurden.

Folgende Untergruppen wurden analysiert (siehe Tabelle 28 und Tabelle 29) dabei wurden schrittweise die Co-Variablen reduziert.

Tabelle 28: Untergruppen SUFU – Erwachsene (angegeben sind jeweils die Einschlusskriterien der analysierten Untergruppe: Diagnose_Art des Transplantats_Art der Transplantation HLA identisch/haploident/HLA-Mismatch_Bestrahlung ja/nein_Art der Konditionierung myeloablattiv/reduzierte Intensität). Nach Katz et al. (2018)

Erwachsene						
Untergruppe		CC	%	CT/TT	%	p-Wert
AML_alle	GvHD °0	146	49,7	26	43,3	0,398
	GvHD °I-IV	148	50,3	34	56,7	
AML_PBSC	GvHD °0	142	49,8	26	44,8	0,565
	GvHD °I-IV	143	50,2	32	55,2	
AML_PBSC_haploident_keine Bestrahlung ¹	GvHD °0	16	50,0	3	60,0	>0,9999
	GvHD °I-IV	16	50,0	2	40,0	
AML_PBSC_haploident_keine Bestrahlung_RIC	GvHD °0	14	46,7	3	60,0	0,658
	GvHD °I-IV	16	53,3	2	40,0	
AML_PBSC_HLA identisch	GvHD °0	88	52,7	12	37,5	0,127
	GvHD °I-IV	79	47,3	20	62,5	
AML_PBSC_HLA identisch_Bestrahlung	GvHD °0	31	40,3	7	30,4	0,468
	GvHD °I-IV	46	59,7	16	69,6	
AML_PBSC_HLA identisch_Bestrahlung_MAC	GvHD °0	11	27,5	4	25,0	>0,9999
	GvHD °I-IV	29	72,5	12	75,0	
AML_PBSC_HLA identisch_Bestrahlung_RIC	GvHD °0	20	54,1	3	42,9	0,693
	GvHD °I-IV	17	45,9	4	57,1	
AML_PBSC_HLA identisch_keine Bestrahlung	GvHD °0	57	63,3	5	55,6	0,724
	GvHD °I-IV	33	36,7	4	44,4	
AML_PBSC_HLA identisch_keine Bestrahlung_RIC	GvHD °0	41	64,1	3	60,0	>0,9999
	GvHD °I-IV	23	35,9	2	40,0	
AML_PBSC_HLA-MM	GvHD °0	38	44,2	11	52,4	0,626
	GvHD °I-IV	48	55,8	10	47,6	
AML_PBSC_HLA-MM_Bestrahlung	GvHD °0	19	38,8	4	50,0	0,702
	GvHD °I-IV	30	61,2	4	50,0	
AML_PBSC_HLA-MM_Bestrahlung_MAC	GvHD °0	12	34,3	3	42,9	0,686
	GvHD °I-IV	23	65,7	4	57,1	
AML_PBSC_HLA-MM_keine Bestrahlung	GvHD °0	19	51,4	7	53,8	>0,9999
	GvHD °I-IV	18	48,6	6	46,2	
AML_PBSC_HLA-MM_keine Bestrahlung_RIC	GvHD °0	15	50,0	7	58,3	0,739
	GvHD °I-IV	15	50,0	5	41,7	

Erwachsene						
Untergruppe		CC	%	CT/TT	%	p-Wert
ALL_alle	GvHD °0	40	52,6	6	37,5	0,410
	GvHD °I-IV	36	47,4	10	62,5	
ALL_PBSC	GvHD °0	36	50,7	6	37,5	0,413
	GvHD °I-IV	35	49,3	10	62,5	
ALL_PBSC_haploident	GvHD °0	3	50,0	1	100,0	>0,9999
	GvHD °I-IV	3	50,0	0	0,0	
ALL_PBSC_HLA identisch	GvHD °0	24	48,0	4	36,4	0,526
	GvHD °I-IV	26	52,0	7	63,6	
ALL_PBSC_HLA identisch_Bestrahlung	GvHD °0	23	50,0	4	40,0	0,731
	GvHD °I-IV	23	50,0	6	60,0	
ALL_PBSC_HLA identisch_Bestrahlung_MAC	GvHD °0	22	48,9	3	42,9	>0,9999
	GvHD °I-IV	23	51,1	4	57,1	

¹Ganzkörperbestrahlung

(ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, MM = Mismatch, PBSC = periphere Blutstammzellen, MAC = myeloablative Konditionierung, RIC = dosisreduzierte Konditionierung)

Tabelle 29: Untergruppen SUFU – Kinder (angegeben sind jeweils die Einschlusskriterien der analysierten Untergruppe: Diagnose_Art der Transplantation HLA identisch/haploident _Bestrahlung ja/nein_Art des Transplantats). Nach Katz et al. (2018)

Kinder						
Untergruppe		CC	%	CT/TT	%	p-Wert
AML_alle	GvHD °0	9	47,4	1	33,3	>0,9999
	GvHD °I-IV	10	52,6	2	66,7	
ALL_alle	GvHD °0	7	31,8	6	50,0	0,462
	GvHD °I-IV	15	68,2	6	50,0	
ALL_haploident_Bestrahlung ¹	GvHD °0	3	30,0	3	50,0	0,607
	GvHD °I-IV	7	70,0	3	50,0	
ALL_haploident_Bestrahlung_PBSC	GvHD °0	3	30,0	3	60,0	0,329
	GvHD °I-IV	7	70,0	2	40,0	
ALL_HLA identisch_keine Bestrahlung	GvHD °0	4	36,4	3	50,0	0,644
	GvHD °I-IV	7	63,6	3	50,0	
ALL_HLA identisch_keine Bestrahlung_Knochenmark	GvHD °0	4	40,0	2	40,0	>0,9999
	GvHD °I-IV	6	60,0	3	60,0	

¹Ganzkörperbestrahlung

(ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, PBSC = periphere Blutstammzellen)

Wie aus den obenstehenden Tabellen ersichtlich, zeigt sich trotz homogeneren Gruppen sowohl bei den adulten als auch bei den pädiatrischen Patienten

zwischen den Patienten mit SUFU-Genotyp CC und jenen mit SUFU-Genotyp CT/TT kein signifikanter Unterschied in der Inzidenz einer aGvHD.

3.3.4 Analyse weiterer potentieller Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer GvHD

3.3.4.1 Einfluss der Vorbehandlung des Stammzelltransplantats (Graft Manipulation) auf die Entwicklung einer aGvHD

Ein möglicher Einflussfaktor auf die Entwicklung einer aGvHD nach HSZT ist die Behandlung des Grafts vor der Transplantation. Die Patienten erhielten entweder ein α/β -TCR- oder CD3/19 depletiertes Graft oder ein CD34+ selektioniertes, bzw. CD3/19 depletiertes und CD34+ selektioniertes Graft. Es zeigt sich in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Graft Manipulation und der Inzidenz einer aGvHD. Die Gruppe der Patienten, die an einer aGvHD erkrankte, unterscheidet sich hinsichtlich der Art der Graft Manipulation nicht signifikant von der Gruppe, die keine aGvHD entwickelte (Erwachsene: $p=0,925$; Kinder: $p=0,891$). Auch die Stammzellquelle (PBSC vs. Knochenmark vs. Nabelschnur) sowie die Passgenauigkeit des Spenders bezüglich der HLA-Merkmale (haploident vs. identisch vs. 1-3 Mismatch) unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Stammzellquelle: $p=0,829$ (Erwachsene), $p=0,310$ (Kinder); HLA-Mismatch: $p=0,790$ (Erwachsene), $p=0,763$ (Kinder)) (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Vergleich der Patientencharakteristika zwischen den Patientengruppen mit und ohne Auftreten einer akuten Graft-versus-Host Disease

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert
N	374	51,0	359	49,0		63	46,0	74	54,0	
Genotyp					0,926					0,556
CC	300	80,2	289	80,5		45	71,4	57	77,0	
CT/TT	74	19,8	70	19,5		18	28,6	17	23,0	

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert
Diagnose	0,108					0,004*				
ALL	46	12,3	46	12,8		13	20,6	21	28,4	
AML	172	46,0	182	50,7		10	15,9	12	16,2	
CLL	6	1,6	6	1,7		0	0,0	0	0,0	
CML	9	2,4	11	3,1		0	0,0	1	1,4	
MDS	33	8,8	41	11,4		6	9,5	6	8,1	
M. Hodgkin	4	1,1	2	0,6		0	0,0	0	0,0	
MPS	27	7,2	15	4,2		0	0,0	0	0,0	
NHL	46	12,3	42	11,7		1	1,6	0	0,0	
Plasmozytom	24	6,4	8	2,2		0	0,0	0	0,0	
Immundefizienz	0	0,0	0	0,0		4	6,3	6	8,1	
Nicht-maligne Erkrankung	5	1,3	3	0,8		15	23,8	7	9,5	
Neuroblastom	0	0,0	0	0,0		10	15,9	2	2,7	
Sonstige maligne Erkrankungen	1	0,3	2	0,6		3	4,8	9	12,2	
Sonstige	1	0,3	1	0,3		1	1,6	10	13,5	
Alter bei HSZT	0,987					0,941*				
Min.	18,5		18,9			0,1		0,1		
Max.	76,9		76,7			24,6		25,0		
Durchschnittsalter	50,1		48,2			9,9		9,5		
Geschlecht	0,599					0,735				
Männlich	226	60,4	210	58,5		38	60,3	43	58,1	
Weiblich	148	39,6	149	41,5		25	39,7	31	41,9	
HLA Mismatch	0,790*					0,763*				
haploident	31	8,3	27	7,5		27	42,9	35	47,3	
3 antigen MM	3	0,8	1	0,3		0	0,0	0	0,0	
2 antigen MM	19	5,1	23	6,4		0	0,0	1	1,4	
1 antigen MM	75	20,1	75	20,9		1	1,6	1	1,4	
0 antigen MM	246	65,8	233	64,9		35	55,6	37	50,0	
Stammzellquelle	0,829*					0,310*				
Knochenmark	15	4,0	13	3,6		30	47,6	29	39,2	
PBSC	357	95,5	345	96,1		32	50,8	45	60,8	
PBSC & Knochenmark	2	0,5	1	0,3		0	0,0	0	0,0	
Nabelschnurblut	0	0,0	0	0,0		1	1,6	0	0,0	
Graft Manipulation	0,925					0,891*				
α/β -TCR Depletion	6	1,6	6	1,7		4	6,3	3	4,1	
CD34 Selektion	14	3,7	10	2,8		3	4,8	4	5,4	
CD3/19 Depletion	26	7,0	22	6,1		19	30,2	26	35,1	
CD3/19 Depletion & CD34 Selektion	0	0,0	0	0,0		8	12,7	11	14,9	
CD133 Selektion	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	1,4	
Leukapherese	301	80,5	297	82,7		0	0,0	0	0,0	
Keine	27	7,2	24	6,7		29	46,0	29	39,2	

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert
Bestrahlung¹	<0,001					0,607				
Ja	135	36,1	182	50,7		28	44,4	37	50,0	
Nein	239	63,9	177	49,3		35	55,6	37	50,0	
Konditionierung	<0,001					>0,9999				
MAC	132	35,3	174	48,5		63	100,0	74	100,0	
RIC	242	64,7	185	51,5		0	0,0	0	0,0	
GvHD Prophylaxe²	0,390*					0,498*				
ATG/OKT3	250	66,8	199	55,4		0	0,0	1	1,4	
CNI	334	89,3	323	90,0		33	52,4	37	50,0	
MTX	139	37,2	129	35,9		27	42,9	29	39,2	
MMF	208	55,6	202	56,3		32	50,8	32	43,2	
keine	0	0,0	1	0,3		2	3,2	7	9,5	
Überleben zum Zeitpunkt des letzten Follow up	0,376					0,483				
Am Leben	182	48,7	187	52,1		38	60,3	49	66,2	
Verstorben	192	51,3	172	47,9		25	39,7	25	33,8	

* Wert aufgrund der geringen Patientenzahl in einigen Subgruppen nicht verlässlich verwertbar

¹ Ganzkörperbestrahlung, ² Mehrfachnennungen möglich

(ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CLL = chronisch lymphatische Leukämie, CML = chronisch myeloische Leukämie, MDS = myelodysplastisches Syndrom, MPS = myeloproliferatives Syndrom, NHL = Non-Hodgkin-Lymphom, HSZT = hämatopoetische Stammzelltransplantation, MM = Mismatch, PBSC = periphere Blutstammzellen, TCR = T-Zell-Rezeptor, MAC = myeloablative Konditionierung, RIC = dosisreduzierte Konditionierung, GvHD = Graft-versus-Host Disease, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Muromonab-CD3, CNI = Calcineurin-Inhibitoren, MTX = Methotrexat, MMF = Mycophenolat-Mofetil)

3.3.4.2 Einfluss von Konditionierungstherapie und Ganzkörperbestrahlung auf die Entwicklung einer aGvHD

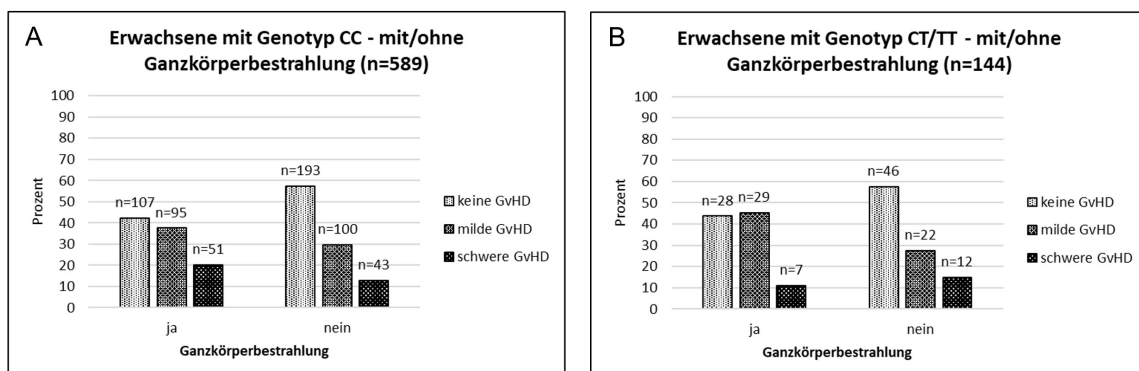
Es zeigen sich bei den adulten Patienten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit RIC gegenüber MAC und dem Einfluss einer Ganzkörperbestrahlung hinsichtlich des Auftretens einer aGvHD. Daher erfolgte eine genauere Betrachtung der Auswirkung dieser Parameter auf den Schweregrad der entwickelten aGvHD in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp.

Patienten mit Genotyp CC und vorausgehender Ganzkörperbestrahlung entwickeln signifikant häufiger eine aGvHD, als solche ohne Ganzkörperbestrahlung ($p < 0,0003$), der Schweregrad jedoch unterscheidet sich nicht signifikant (siehe Abbildung 33 A). Für Patienten mit Genotyp CT/TT findet sich diesbezüglich kein Unterschied ($p = 0,131$) (siehe Abbildung 33 B). Vergleicht

man alle Patienten welche eine Ganzkörperbestrahlung erhalten haben untereinander, so zeigt sich wiederum kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Schweregrade der aGvHD zwischen Patienten mit Genotyp CC und Patienten mit Genotyp CT/TT ($p=0,888$).

Ähnliche Ergebnisse zeigt die Untersuchung in Abhängigkeit von der Intensität der Konditionierungstherapie. Adulte Patienten mit Genotyp CC und MAC entwickeln signifikant häufiger eine aGvHD, als solche mit RIC ($p=0,008$) (siehe Abbildung 33 C), entsprechendes lässt sich auch für den Genotyp CT/TT beobachten ($p=0,044$) (siehe Abbildung 33 D), im Schweregrad findet sich bei keinem der Genotypen ein signifikanter Unterschied. Betrachtet man hingegen nur Patienten welche eine MAC erhalten haben, zeigt sich kein Unterschied zwischen Patienten mit Genotyp CC und solchen mit Genotyp CT/TT ($p=0,777$).

Für die Kohorte der pädiatrischen Patienten findet sich kein Unterschied für die Entwicklung einer aGvHD in Abhängigkeit von einer vorausgegangenen Ganzkörperbestrahlung ($p=0,607$), eine dosisreduzierte Konditionierung wurde nicht durchgeführt, alle Kinder erhielten eine MAC.



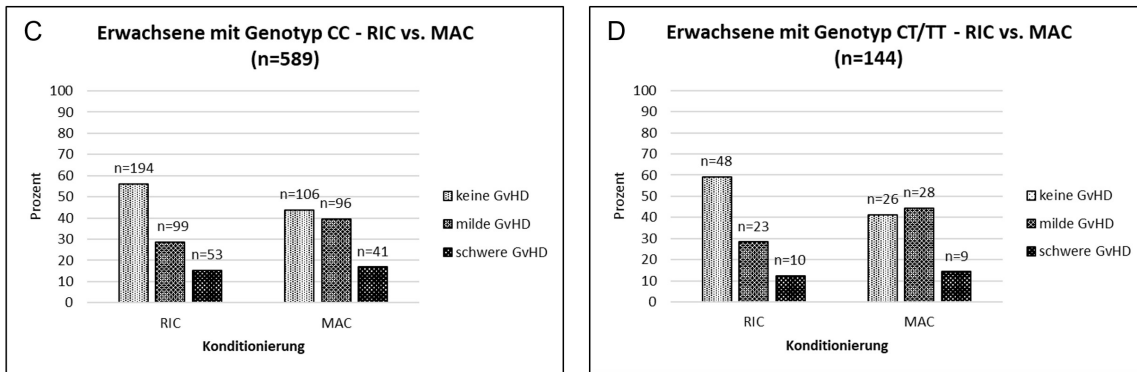


Abbildung 33: Ausprägung einer akuten Graft-versus-Host Disease (aGvHD) in Abhängigkeit von einer vorausgegangenen Ganzkörperbestrahlung bei adulten Patienten mit Genotyp CC (A) bzw. CT/TT (B) und Ausprägung einer aGvHD in Abhängigkeit von Konditionierungstherapie mit dosisreduzierter (RIC) bzw. myeloablativer Konditionierung (MAC) bei adulten Patienten mit Genotyp CC (C) bzw. CT/TT (D). (Milde GvHD = GvHD °I-II, schwere GvHD = GvHD °III-IV)

3.3.4.3 Einfluss der GvHD-Prophylaxe auf die Entwicklung einer aGvHD

Ein augenscheinlich potentiell relevanter Einflussfaktor auf die Entwicklung einer aGvHD nach HSZT ist die medikamentöse Prophylaxe. Daher wurden die Inzidenz der aGvHD aller Patienten und zusätzlich auch getrennt in den Untergruppen der AML- und ALL-Patienten in Abhängigkeit der zur Prophylaxe verwendeten Medikamente genauer ausgewertet. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Inzidenz und dem Schweregrad der aGvHD zwischen den verschiedenen zur GvHD-Prophylaxe verwendeten Medikamenten. (Erwachsene: p=0,390, Kinder: p=0,498) (siehe Tabelle 31 sowie Abbildung 34 und Abbildung 35).

Tabelle 31: Inzidenz Graft-versus-Host Disease (GvHD) in Abhängigkeit von den zur GvHD-Prophylaxe erhaltenen Medikamenten

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert
N	374	51,0	359	49,0		63	46,0	74	54,0	
GvHD Prophylaxe**					0,390					0,498
ATG/OKT3	250	66,8	199	55,4		0	0,0	1	1,4	
CNI	334	89,3	323	90,0		33	52,4	37	50,0	
davon CSA	132	35,3	148	41,2		33	52,4	36	48,6	
davon Tacrolimus	202	54,0	175	48,7		0	0,0	1	1,4	
MTX	139	37,2	129	35,9		27	42,9	29	39,2	

	Erwachsene (n=733)					Kinder (n=137)				
	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert	keine GvHD	%	GvHD	%	p-Wert
GvHD Prophylaxe**										
MMF	208	55,6	202	56,3		32	50,8	32	43,2	
keine	0	0,0	1	0,3		2	3,2	7	9,5	

** Mehrfachnennungen möglich

(GvHD = Graft-versus-Host Disease, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Muromonab-CD3, CNI = Calcineurin-Inhibitoren, CSA = Cyclosporin A, MTX = Methotrexat, MMF = Mycophenolat-Mofetil)

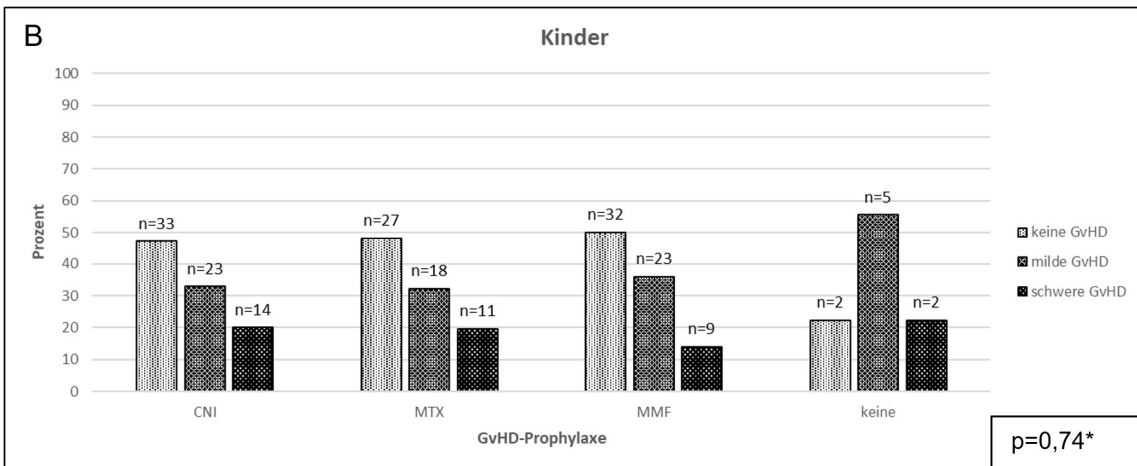
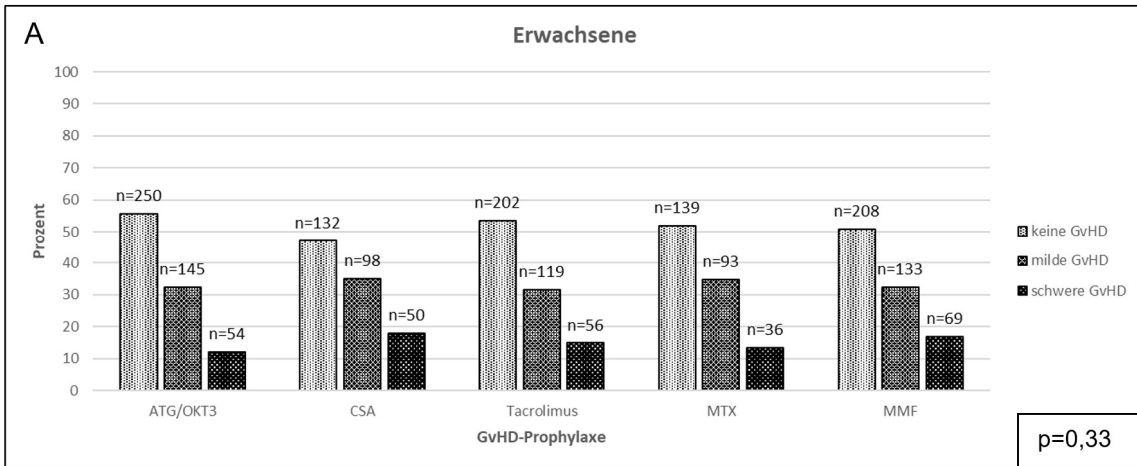


Abbildung 34: Inzidenz und Schweregrad der aGvHD der adulten (A) und pädiatrischen (B) Patienten, abhängig von den zur GvHD-Prophylaxe erhaltenen Medikamenten, Mehrfachnennungen möglich. Keine Darstellung von „ATG/OKT3“ (Kinder) bzw. „keine“ (Erwachsene) da dieses nur von einem Patienten erhalten wurde.

* Wert aufgrund der geringen Patientenzahl in einigen Subgruppen nicht verlässlich verwertbar (GvHD = Graft-versus-Host Disease, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Muromonab-CD3, CNI = Calcineurin-Inhibitoren, CSA = Cyclosporin A, MTX = Methotrexat, MMF = Mycophenolat-Mofetil)

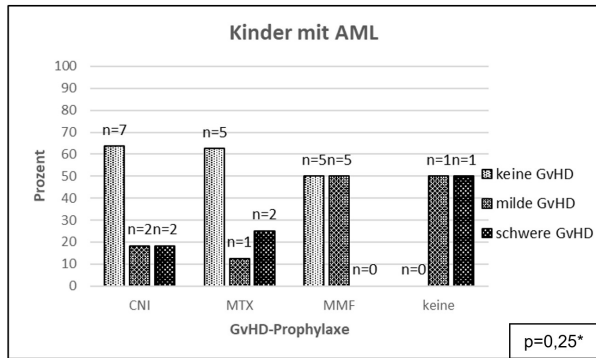
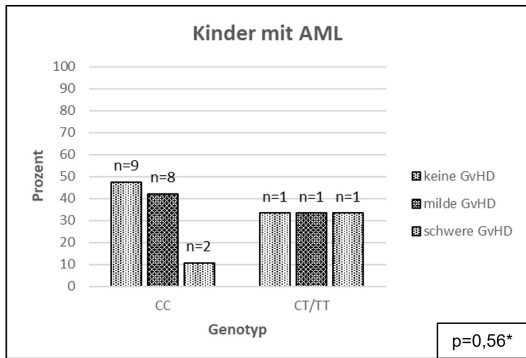
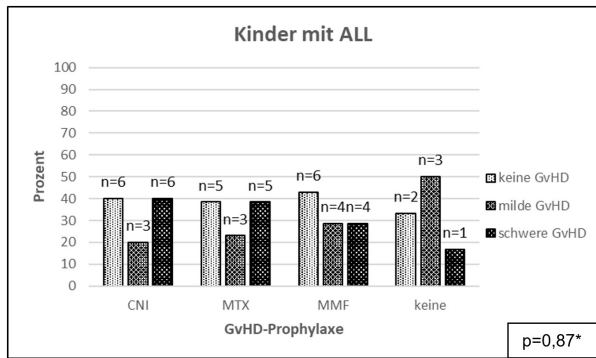
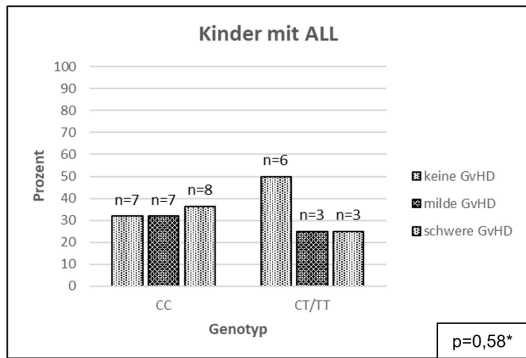
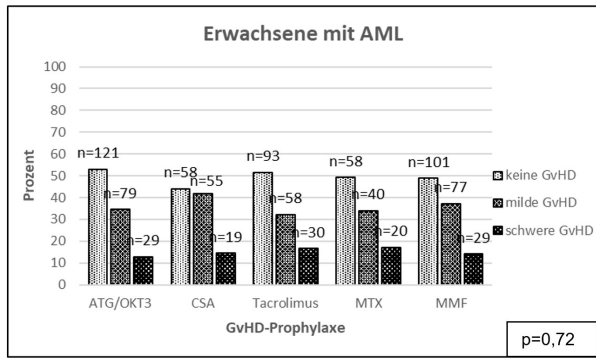
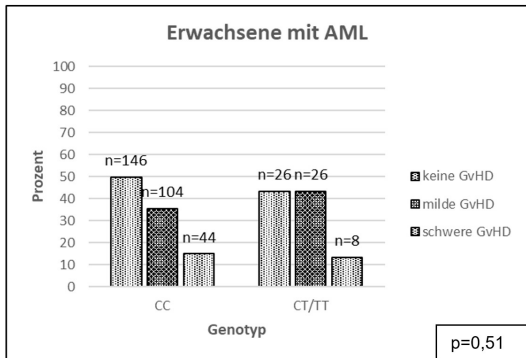
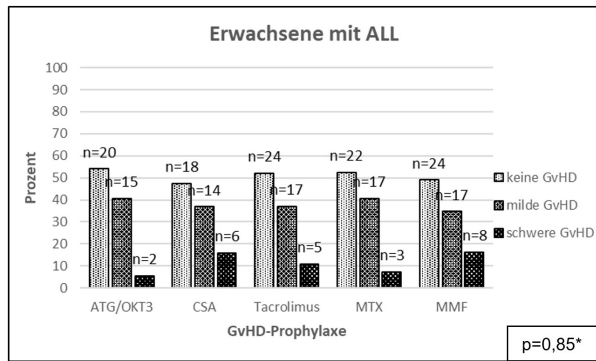
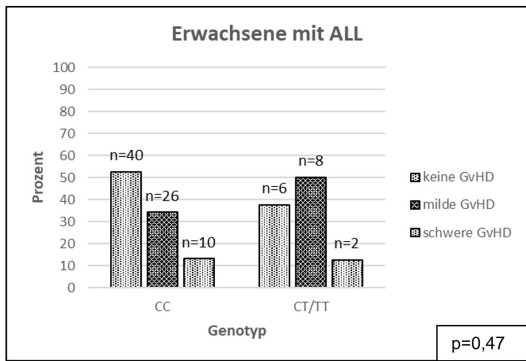


Abbildung 35: Inzidenz und Schweregrad der aGvHD in Abhängigkeit von den zu GvHD-Prophylaxe erhaltenen Medikamenten. Separat für AML und ALL Patienten.

* Wert aufgrund der geringen Patientenzahl in einigen Subgruppen nicht verlässlich verwertbar (ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Muromonab-CD3, CNI = Calcineurin-Inhibitoren, CSA = Cyclosporin A, MTX = Methotrexat, MMF = Mycophenolat-Mofetil)

3.3.5 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp

Das GÜ beträgt bei den adulten Patienten 50,3 % (n=369). Für die Patienten mit Genotyp CC beträgt es 50,4 % (n=297), für diejenigen mit Genotyp CT/TT 50,0 % (n=72) ($p > 0,9999$).

Bei pädiatrischen Patienten ist das GÜ mit 64,2 % (n=88) insgesamt etwas höher. Bei den Kindern mit Genotyp CC beträgt es 63,7 % (n=65), bei jenen mit Genotyp CT/TT 62,9 % (n=22) ($p > 0,9999$). Es kann somit kein Unterschied im GÜ in Abhängigkeit vom SUFU-Genotyp festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1 KIR

4.1.1 *Relevanz des KIR Haplotyps bei pädiatrischen Patienten mit soliden Tumoren, insbesondere Neuroblastomen*

In einigen Studien wurde bereits der Einfluss des KIR Haplotyps auf den Langzeiterfolg einer Stammzelltransplantation untersucht. Für die pädiatrische ALL, die AML und das Multiple Myelom wurde ein positiver Einfluss des KIR Haplotyp B auf das Gesamtüberleben und die Rückfallrate nach Stammzelltransplantationen beschrieben (Cooley et al., 2009, Cooley et al., 2010, Kroger et al., 2011, Michaelis et al., 2014, Michaelis, 2015). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zum Einfluss des KIR Haplotyps bei soliden Tumoren, insbesondere Neuroblastomen, können keinen entsprechenden Einfluss des Haplotyps B zeigen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in Gesamtüberleben und Rückfallrate zwischen Patienten mit einem Haplotyp A- und B-Spender. Einen offensichtlichen Grund hierfür gibt es nicht, jedoch kann vermutet werden, dass ein relevanter Unterschied zu den bisherigen Studien darin liegt, dass es sich in dieser Arbeit um Patienten mit soliden Tumoren handelt, während die Patienten in den oben genannten Studien jeweils Erkrankungen des hämatopoetischen Systems aufwiesen. Da es sich bei den soliden Tumoren um eine sehr heterogene Gruppe von Malignomen mit unterschiedlichen Mutationen und Signalwegen handelt, ist es schwierig für diese verschiedenen Erkrankungen einen gemeinsamen Therapieansatz zu finden. Das Erreichen der Tumorzellen ist für die NK-Zellen bei soliden Tumoren, im Vergleich zu hämatologischen Erkrankungen, deutlich erschwert, da sich die aberranten Zellen in festen Zellverbänden befinden, in die die Immunzellen zunächst eindringen müssen. Die Menge der eindringenden NK-Zellen ist jedoch entscheidend für die Bekämpfung der malignen Zellen (Gras Navarro et al., 2015, Takanami et al., 2001). Zudem bewirken solide Tumore in ihrem Umfeld ein Mikromilieu, welches durch vielfältige Zellen, beispielsweise Tumor-assoziierte Fibroblasten oder Tumor-assoziierte Makrophagen gebildet wird (Vitale et al.,

2014). Diese Zellen erzeugen ein chronisch entzündliches Milieu, welches dem Tumor Angiogenese und Proliferation ermöglicht und durch inhibitorische Signale Eindringen, Aktivität und Proliferation von NK-Zellen beeinträchtigt (Nayyar et al., 2019). Zudem zeigte sich der anfangs erwähnte positive Effekt des B-Haplotyps lediglich für die pädiatrische ALL und die AML, schon bei adulten Patienten mit ALL konnte der Effekt nicht mehr nachgewiesen werden (Cooley et al., 2010). Möglicherweise sind die notwendigen KIR Liganden also bereits bei der selben Erkrankung differierend, was eine Übertragbarkeit der Resultate auf andere Tumorentitäten noch schwieriger macht.

4.1.2 *Klinische Relevanz des Remissionsstatus vor HSZT*

Kinder, welche sich zum Zeitpunkt der Transplantation in CR befanden, weisen in dieser Arbeit ein etwas besseres GÜ und EFÜ auf als Kinder in PR oder Progress. Dies zeigt sich sowohl bei der Betrachtung der gesamten Kohorte als auch in der Untergruppe der Neuroblastompatienten, jedoch muss betont werden, dass die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen, welche bei Kindern mit Leukämien ebenfalls einen günstigen Effekt einer CR zum Zeitpunkt der Transplantation nachwiesen (Leung et al., 2011, Sanders et al., 2005) oder sogar den Remissionsstatus bei HSZT als wichtigsten prognostischen Faktor bei Kindern mit einer ALL identifizierten (Michaelis, 2015). Auch aus klinischen Gesichtspunkten erscheinen diese Ergebnisse plausibel, da bei Patienten in PR oder Progress im Gegensatz zu Patienten in CR zum Zeitpunkt der Transplantation noch eine Tumorlast vorliegt und daher davon auszugehen ist, dass sich diese Patienten in einer schlechteren Ausgangssituation befinden.

4.1.3 *Einfluss des B-Content Score auf Ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben*

Neben dem Einfluss des KIR Haplotyps gibt es auch Studien, die einen Zusammenhang zwischen B-Content Score und Langzeitergebnis nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation zeigen (Cooley et al., 2010, Michaelis, 2015, Oevermann et al., 2014).

Dabei entspricht der KIR Haplotyp A mit lediglich KIR2DS4 und KIR2DL4 als aktivierenden Rezeptoren einem Score von 0. Liegen weitere aktivierende Rezeptoren vor oder fehlen bestimmte inhibierende Rezeptoren, entspricht dies einem Haplotyp B mit einem Score von 1-4, je nach Anzahl der KIR B-Motive (Michaelis, 2015).

Während Arbeiten von Michaelis und Cooley et al. eine Korrelation eines höheren B-Content Score mit einer geringeren Rückfallrate und einem besseren Gesamtüberleben bei ALL und AML-Patienten aufzeigten (Cooley et al., 2010, Michaelis, 2015), kann ein solcher Zusammenhang in dieser Untersuchung weder für die Neuroblastompatienten, noch für die Gesamtkohorte ermittelt werden. Auch die Ergebnisse von Heatley et al. brachten uneinheitliche Ergebnisse. Während Heatley einen Vorteil hinsichtlich des GÜ bei AML-Patienten mit Cen-B-Motiv zeigen konnte, ergab sich für die Gesamtkohorte mit verschiedenen hämatologischen Neoplasien kein relevanter Unterschied hinsichtlich EFÜ und GÜ (Heatley et al., 2018).

Womöglich liegen die abweichenden Resultate in der vorliegenden Arbeit in der Heterogenität der Kohorte begründet, welche möglicherweise einen Effekt bei einzelnen Erkrankungen verschleiert, wobei erwähnt werden muss, dass auch in der homogenen Gruppe der Neuroblastompatienten kein signifikanter Einfluss von Haplotyp und B-Content Score gezeigt werden kann. Ein weiterer Aspekt ist auch hier die Tatsache, dass eine Betrachtung von Patienten mit soliden Tumoren erfolgte, bei denen ein geringerer Einfluss von Haplotyp und B-Content Score möglicherweise in der von hämatologischen Neoplasien abweichenden Tumorstruktur zugrunde liegt.

4.1.4 Relevanz des KIR Ligand-Modells auf die Spenderauswahl

In der vorliegenden Arbeit kann weder für pädiatrischen Neuroblastompatienten noch für die Gesamtkohorte der typisierten pädiatrischen Patienten ein Zusammenhang zwischen KIR Ligand-Mismatch und EFÜ oder GÜ gefunden werden. Ruggeri et al. (2002, 2007) konnten einen durch erhöhte Alloreaktivität verursachten positiven Zusammenhang zwischen KIR Ligand-Mismatch und

Überleben ihrer untersuchten AML-Patienten aufzeigen, ebenso zeigten dies Giebel et al. (2003) für Patienten mit diversen hämatologischen Neoplasien.

Wie auch in der hier durchgeführten Untersuchung mit Patienten, welche an soliden Tumoren leiden, konnten Ruggeri et al. (2002) selbst jedoch für die von ihnen untersuchten ALL-Patienten keinen entsprechenden positiven Effekt finden, genauso wie Davies et al. (2002) für AML- und CML-Patienten mit URD (un-related donor) Transplantation und Huang et al. (2007) für Patienten mit diversen hämatologischen Erkrankungen nach hHSZT.

Verneris et al. untersuchten 2020 bei pädiatrischen Patienten mit AML und ALL nach URD Transplantation gezielt den Effekt verschiedener Modelle, welche einen Einfluss des Spender-KIR-Genotyps und der KIR Alloreaktivität implizieren, darunter auch das KIR Ligand-Modell wie von Ruggeri et al. (2002) beschrieben. Sie fanden für keines der von ihnen untersuchten Modelle einen positiven Effekt bei den pädiatrischen Patienten, was sie unter anderem auf die Unterschiede zwischen pädiatrischen und adulten Patienten hinsichtlich Driver Mutationen, Thymusfunktion und Konditionierungsschemata zurückführten (Verneris et al., 2020). Ähnliche Gründe sind auch für die hier untersuchten Patienten anzunehmen. Zusätzlich zu den von Verneris benannten Unterschieden der kindlichen Physiologie und Erkrankungen, handelt es sich hier darüberhinaus nicht um die bereits häufig untersuchten hämatologischen Erkrankungen AML und ALL, sondern um solide Tumore mit abweichender Tumormorphologie, Tumorgenese und Tumorverhalten, so dass die vorhandenen Studienergebnisse nicht ohne weiteres auf solide Tumore übertragen werden können. Um die Relevanz des KIR Ligand-Modells für solide Tumore sicher beurteilen zu können, müssten zunächst Untersuchungen mit größerer Patientenzahl und homogener Studienkohorte hinsichtlich Remission bei Transplantation, Konditionierungstherapie etc. durchgeführt werden. Allerdings sind mittlerweile in der klinischen Anwendung bereits andere Modelle relevanter geworden, z.B. das KIR Haplotyp-Modell nach Cooley (siehe Kapitel 1.6.2), das KIR Ligand-Modell wurde zwischenzeitlich von einigen Autoren als ungeeignet für die Spenderauswahl eingestuft (Verneris et al., 2020, Witt, 2009).

4.1.5 Einfluss des KIR Haplotyps auf die Inzidenz einer GvHD

Analog zu den Ergebnissen von Sebastian Michaelis (2015) zeigen sich in dieser Arbeit weder für die Neuroblastompatienten noch für das Gesamtkollektiv signifikante Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz einer aGvHD zwischen Patienten mit KIR A und KIR B Haplotyp Spendern. Für den Schweregrad der aGvHD zeigt sich für die Untergruppe der Patienten mit schwerer aGvHD in der gemischten Gruppe ein signifikanter Wert zugunsten der Patienten mit KIR B-Spender, bei insgesamt nur 3 Patienten in dieser Untergruppe lässt sich jedoch keine Aussage hinsichtlich der klinischen Relevanz treffen. In allen anderen Untergruppen zeigt sich kein relevanter Unterschied hinsichtlich des Schweregrades der aGvHD und cGvHD in Abhängigkeit vom KIR Haplotyp.

Im Gegensatz dazu konnten Heatley et al. (2018) zeigen, dass AML-Patienten mit Cen-B-Motiv ein geringeres Risiko für die Entwicklung einer aGvHD aufweisen, dieser Effekt konnte jedoch lediglich für die AML-Patienten, nicht aber für Heatleys Gesamtkohorte mit verschiedenartigen hämatologischen Erkrankungen gezeigt werden.

Ebenso fanden Venstrom et al. (2010) eine signifikant reduzierte Rate an aGvHD °II-IV und transplantationsassoziiertes Mortalität bei Patienten mit AML, CML und MDS sofern beim Spender ein Haplotyp B, definiert durch die Expression von KIR3DS1, vorliegt. Den selben günstigen Effekt hinsichtlich des Auftretens einer aGvHD bei Haplotyp B konnten Littera et al. (2010) für Thalassämie-Patienten nach HSZT aufzeigen.

Ein Effekt des KIR Haplotyps auf die Inzidenz einer aGvHD wie in o. g. Untersuchungen gezeigt erscheint plausibel, da die KIR-Rezeptoren Einfluss auf die Aktivierung der NK-Zellen haben, welche wiederum relevant für die Entwicklung einer Alloreaktivität und somit einer aGvHD ist. Jedoch kamen die verschiedenen Studien nicht zu einheitlichen Ergebnissen. Dies scheint zum einen den differierenden Studiensettings und Therapieregimen und zum anderen einer mutmaßlich multifaktoriellen, noch nicht vollständig geklärten Genese der GvHD geschuldet zu sein. Der potentielle Effekt des KIR Haplotyps auf die Entwicklung einer aGvHD bleibt somit abschließend noch unzureichend geklärt.

4.1.6 Schlussfolgerung für die klinische Praxis

Campbell Witt verglich bereits 2009 in seinem Review diverse Studien, welche den Einfluss der NK-Zell-Alloreaktivität und den Einfluss des KIR-Rezeptorstatus auf Überleben, Rezidivrate und GvHD-Rate untersuchten. Er kam zu dem Ergebnis, dass keine einheitliche Aussage für den Nutzen der NK-Zell-Alloreaktivität und des KIR-Rezeptorstatus getroffen werden könne, der Effekt hänge vielmehr stark vom angewandten Transplantationsprotokoll, der Menge an Donor-T-Zellen im Graft sowie der zugrundeliegenden Erkrankung ab (Witt, 2009).

Hinsichtlich der Relevanz des KIR-Rezeptorstatus bei Kindern mit soliden Tumoren, insbesondere Neuroblastomen, kann aktuell ebenso keine klare Empfehlung ausgesprochen werden. Wie bereits von Witt (2009) für hämatologische Erkrankungen gefordert, müssten zunächst größere Studien mit einheitlichem Transplantationsprotokoll stattfinden um den Einfluss des KIR-Rezeptorstatus bei Neuroblastompatienten und Kindern mit anderen soliden Tumoren sicher zu benennen.

4.2 FcGR und CH 14.18-Antikörper-Therapie

In der klinischen Praxis nimmt die Therapie verschiedenster maligner Erkrankungen mit Antikörpern einen zunehmend höheren Stellenwert ein, da sie im Vergleich zur klassischen Radio- und Chemotherapie eine wesentlich zielgerichtetere Bekämpfung der aberranten Zellen und somit eine Schonung des gesunden Gewebes ermöglicht.

Eine solche Therapie stellt die Gabe des CH 14.18-Antikörpers dar, der sich gegen ein Oberflächenantigen richtet, welches in großer Menge auf Neuroblastomzellen exprimiert wird. Simon et al. (2011) konnten zeigen, dass eine Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastompatienten mit CH 14.18 im Anschluss an die Erstlinientherapie eine verringerte Rezidivrate erzielt. Als noch vielversprechender erwiesen sich die Ergebnisse von Yu et al. (2010) welche den Antikörper mit IL-2, GM-CSF oder Isotretinoin kombinierten und so ein deutlich verbessertes EFÜ und GÜ erreichten. Zuletzt konnten Seitz et al. (2021) zeigen, dass eine Kombination aus hHSZT und anschließender CH 14.18-Antikörper-

Gabe zur Stärkung des zellulären Immunsystems führt und damit zu einer verbesserten ADCC, insbesondere bei bereits intensiv vorbehandelten Patienten.

4.2.1 Einfluss des FcGR-Genotyps (rs1801274 und rs396991) auf den Erfolg einer CH 14.18-Antikörpertherapie

Die Arbeitsgruppe um Siebert konnte zeigen, dass Patienten, welche im Rahmen ihrer Neuroblastomerkrankung im Anschluss an eine autologe HSZT eine Therapie mit dem Anti-GD2-Antikörper CH 14.18 erhalten hatten, ein längeres EFÜ aufwiesen, wenn sie zur hochaffinen Gruppe gerechnet werden konnten. Die hochaffine Gruppe definiert sich dabei durch das Vorhandensein von je mindestens einem hochaffinen Allel (H bzw. V) für FcGR2A und FcGR3A (Genotyp: H/x und V/x) (Siebert et al., 2016). Cheung et al. (2006) wiederum fanden bei Therapie von Neuroblastompatienten mit einem anderen Anti-GD2-Antikörper (3F8) ein längeres Progressionsfreies Überleben sofern der FcGR2A-RR-Genotyp vorliegt, jedoch bindet 3F8 auch aufgrund seines murinen Ursprungs im Vergleich zum chimären Antikörper CH 14.18 besser an FcGR2A-RR.

Die Ergebnisse von Siebert et al. können in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es zeigt sich weder im EFÜ noch im GÜ ein signifikanter Unterschied zwischen der hoch- und niederaffinen Gruppe. Auch in der getrennten Betrachtung von FcGR2A und 3A kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelen HH/HR und RR bzw. VV/VF und FF hinsichtlich des GÜ und EFÜ beobachtet werden. Der Grund für diese abweichenden Resultate ist nicht klar ersichtlich. Da es sich um eine retrospektive Auswertung der Daten handelt, liegt eine der Hauptursachen möglicherweise in der kleinen Fallzahl. So weisen nur 4 der 33 Patienten den Genotyp FcGR2A RR auf, dies ermöglicht keine verlässliche Aussage und Auswertung dieser Patientengruppe. Darüber hinaus variierte die Anzahl der Antikörperzyklen zwischen 1 und 17 Zyklen, wodurch die kumulative Dosis des Antikörpers und somit der potentielle therapeutische Effekt ebenfalls stark variiert.

Membrive Jiménez et al. fassten in ihrem Review 2021 die Ergebnisse verschiedener Studien zusammen, welche u. a. den Einfluss der o. g. Genotypen

von FcGR2A und FcGR3A auf den Therapieerfolg von TNF-Blockern bei Psoriasis untersuchten. Auch sie stellten fest, dass die Ergebnisse zwischen den von ihnen betrachteten Studien deutlich differierten und von den angewandten Therapieprotokollen abhängig zu sein schienen. Während einige Arbeitsgruppen einen eindeutigen Vorteil für die Genotypen HH bzw. VV hinsichtlich des Therapieerfolges fanden, konnten andere keinen signifikanten oder sogar keinen Vorteil für die genannten Genotypen finden. Dennoch sahen sie die Polymorphismen als prädiktive Marker für das Therapieansprechen bei Psoriasis, forderten allerdings weitere Daten zur Validierung der bisherigen Studienergebnisse (Membrive Jiménez et al., 2021). Auch Dahal et al. befassten sich mit der therapeutischen Relevanz der unterschiedlichen FcGR-Genotypen. Nach Betrachtung mehrerer Studien stellten sie fest, dass eine Übertragbarkeit der Studienergebnisse nicht zwingend gegeben ist, da der Effekt der gleichen FcGR-Genotypen bei unterschiedlichen Erkrankungen und unterschiedlichen mAbs differiert; beispielweise ein besseres Ansprechen auf therapeutische mAbs bei follikulärem Lymphom gegenüber gleichem Ansprechen bei CLL (Dahal et al., 2015).

Während Siebert et al. also die hochaffinen FcGR-Genotypen als prognostisch günstig für eine Therapie mit CH 14.18 sehen, können diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, doch ähnlich wie bei Membrive Jiménez scheint auch hier die Datenlage noch nicht ausreichend und die Therapieprotokolle zu uneinheitlich um eine sichere Aussage hinsichtlich der Relevanz der Genotypen treffen zu können. Zudem muss aufgrund der differierenden Bindungsaffinität jeweils die optimale Kombination aus verwendetem monoklonalen Antikörper und passendem FcGR-Polymorphismus gefunden werden. Mutmaßlich dürfen darüber hinaus zusätzlich auch andere Rezeptoren, die zeitgleich mit den FcGR an ADCC und CDC beteiligt sind, nicht außer Acht gelassen werden (Cheung et al., 2006).

4.2.2 *Klinische Relevanz des Remissionsstatus vor Beginn einer Antikörpertherapie mit CH 14.18*

Die untersuchten Patienten befanden sich zu Beginn der Antikörpertherapie mit CH 14.18 in unterschiedlichen Remissionsstadien (CR, PR, Progress). Befindet sich ein Patient vor Therapiebeginn bereits in CR, so lässt dies, aufgrund der geringeren Tumorlast im Vergleich zu Patienten in PR, auf ein besseres EFÜ und GÜ hoffen. Yu et al. konnten in ihrer Studie einen größeren Effekt der Antikörpertherapie bei Neuroblastompatienten mit CR vor autologer HSCT und Antikörpertherapie finden als bei Patienten in PR (Yu et al., 2010). Diese Annahme legen auch die hier erhobenen Daten nahe, jedoch zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten in CR und PR. Es ist anzunehmen, dass dies in den geringen Patientenzahlen begründet liegt, sodass unklar bleibt, ob der Remissionsstatus vor Therapiebeginn einen potentiell positiven Effekt der unterschiedlichen FcGR2A und FcGR3A Genotypen möglicherweise verschleiert. Cheung et al. (2012) konnten einen ungünstigen prognostischen Effekt zeigen, wenn bei Patienten nach 2 Zyklen einer Antikörpertherapie mit 3F8, einem weiteren GD2-Antikörper, noch eine minimal verbliebene Tumorlast (MRD) vorliegt. Mutmaßlich lässt sich dieses Erkenntnis auch auf CH 14.18 übertragen. Dies legt nahe, dass auch eine PR oder MRD vor der Antikörpertherapie die Erfolgchancen der Therapie mindert.

4.2.3 *Einfluss der Anzahl an erhaltenen Antikörperzyklen auf die Prognose der Neuroblastompatienten*

Die angestrebte Therapiedauer mit dem CH 14.18- Antikörper betrug zunächst 6 Zyklen im Abstand von 4 Wochen. Da es sich bei den Patienten jedoch durchweg um Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Neuroblastomerkrankung handelt, die allermeisten bereits mit einem oder mehrfachem Rezidiv, sind Fortsetzung oder Abbruch der Therapie auch immer Einzelfallentscheidungen. Dies hat dazu geführt, dass die Anzahl der durchgeführten Antikörperzyklen in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv stark variiert (1-17 Zyklen). Zum Teil kann darüberhinaus ein Effekt des Antikörpers auch erst nach repetitiver Gabe erzielt werden (Handgretinger et al., 1995). Es zeigt sich in dieser Arbeit ein

signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der erhaltenen Antikörperzyklen und dem EFÜ und GÜ zugunsten der Patienten die 6 oder mehr Zyklen erhalten haben. Unklar bleibt jedoch die klinische Relevanz dieser Beobachtung, da aufgrund des retrospektiven Studiendesigns nicht erruierbar ist, ob die Therapie aufgrund mangelnden Therapieerfolgs oder eines Rezidivs bzw. NRM vorzeitig beendet wurde oder im umgekehrten Fall die Therapie aufgrund guten Therapieansprechens über mehr als 6 Zyklen fortgesetzt wurde. Zur Klärung dieses Sachverhalts müsste eine prospektive Studie mit einheitlicher Anzahl an Antikörpergaben durchgeführt werden. Eine einheitliche Therapiedauer ist jedoch schwierig festzulegen, da nicht alle Patienten, die mit CH 14.18 behandelt werden, von Anfang an ein Therapieansprechen zeigen.

4.2.4 Relevanz einer n-myc-Amplifikation für das Outcome der Neuroblastompatienten

Neuroblastompatienten mit einer n-myc-Amplifikation haben eine höhere Wahrscheinlichkeit für Rezidive und einen schwereren Verlauf der Erkrankung, als solche ohne Amplifikation des Onkogens (Brodeur et al., 1984, Zhou et al., 2018), da es durch die Amplifikation zu einer höheren Konzentration des Transkriptionsfaktors und dadurch zu einer unkontrollierten Zellvermehrung kommen kann (Brodeur, 2003, Huang and Weiss, 2013). Dass die hier vorliegenden Ergebnisse einen tendenziell besseren Krankheitsverlauf bei Patienten mit n-myc - Amplifikation zeigen, ist vermutlich der kleinen Patientenkohorte, mit lediglich 7 Patienten in der Gruppe mit n-myc - Amplifikation geschuldet und somit aufgrund fehlender statistischer Signifikanz nicht hinreichend verwertbar. Ein anderer Grund für diese Abweichung der hier erzielten Ergebnisse im Vergleich zu den bisherigen Studienergebnissen ist nicht erkennbar. Im Gegenteil zeigten Kaczówka et al. 2018 bei 140 pädiatrischen Neuroblastompatienten erneut den negativen Einfluss von MYCN und n-myc auf die Immunreaktion gegen Neuroblastomzellen und eine damit einhergehende schlechtere Prognose bei n-myc positiven Neuroblastompatienten (Kaczówka et al., 2018).

4.2.5 Schlussfolgerung für die klinische Praxis

Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu FcGR2A und FcGR3A lässt sich keine Handlungsempfehlung hinsichtlich der Bevorzugung des einen oder anderen Genotyps aussprechen. Auch der von Siebert et al. (2016) beschriebene prognostisch günstige Effekt durch Kombination der Genotypen FcGR2A-HH oder -HR mit FcGR3A-VV oder -VF zu einer „hochaffinen Gruppe“ kann nicht bestätigt werden. Relevanter für ein möglichst langes GÜ und EFÜ als der FcGR-Genotyp scheinen eine höhere Anzahl an Zyklen mit dem CH 14.18-Antikörper (>6 Zyklen) sowie das Fehlen einer n-myc-Amplifikation (Kaczówka et al., 2018) zu sein. Jedoch muss an dieser Stelle noch einmal auf das retrospektive Studiendesign, sowie die teilweise geringe Kohortengröße in einigen Untergruppen hingewiesen werden, welche die Aussagekraft der erzielten Ergebnisse einschränken. Eine prospektive Studie mit ausreichender Kohortengröße auch in den FcGR2A RR und FcGR3A FF-Untergruppen erscheint nötig um eine verlässlichere Aussage hinsichtlich des Einflusses der FcGR-Genotypen auf GÜ und EFÜ bei Neuroblastompatienten zu treffen.

4.3 SUFU

4.3.1 Einfluss des SUFU SNPs rs17114808 auf die Entwicklung einer GvHD nach HSZT

Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte in Anlehnung an Bari und seine Kollegen, welche 2015 in einer Untersuchung von 168 pädiatrischen Patienten eine Assoziation zwischen dem SNP rs17114808 im SUFU Gen und dem Auftreten einer aGvHD nach allogener HSZT beschrieben. Bari et al. fanden sowohl in ihrer „discovery cohort“ (n=68) als auch in ihrer „validation cohort“ (n=100) eine höhere Inzidenz für GvHD, wenn die Patienten hinsichtlich des SNP homozygot für Allel C waren, im Vergleich zu Patienten die heterozygot (CT) oder homozygot für Allel T sind. Zusätzlich führten sie funktionelle Studien durch, welche eine geringere Expression des SUFU-Proteins in dendritischen Zellen von CC-homozygoten gesunden Spendern zeigten, welche wiederum zu erhöhter HLA- DR Expression führen. Das dadurch erhöhte Potential für eine

alloreaktive T-Zell-Antwort stützt die Ergebnisse der genetischen Analyse, welche eine erhöhte Inzidenz von aGvHD bei CC homozygoten Patienten zeigte. (Bari et al., 2015)

Die Analyse der hier vorliegenden Daten von 137 pädiatrischen und 733 erwachsenen Patienten nach HSZT kann eine erhöhte Inzidenz von aGvHD bei CC homozygoten Patienten nicht bestätigen. Es zeigt sich weder bei den pädiatrischen noch bei den erwachsenen Patienten ein positiver Effekt des T-Allels hinsichtlich des Vermeidens einer aGvHD nach HSZT.

Da es sich um eine retrospektive Studie handelt, war die Behandlung der Patienten, die in dieser Arbeit betrachtet wurden, nicht vollständig analog zur Behandlung der Patienten bei Bari et al. So waren in deren Untersuchung 44 % der Patienten HLA-Mismatch transplantiert, bei den hiesigen Tübinger Patienten waren es nur 26 % der Erwachsenen und weniger als 2 % der Kinder. Stattdessen erhielten 45 % der Kinder und 8% der Erwachsenen eine haploidente Stammzelltransplantation. Darüber hinaus wurden PBSC als Stammzellquelle bevorzugt (96 % der Erwachsenen, 56 % der Kinder im Vergleich zu 34 % bei Bari et al.).

Auch hinsichtlich der Konditionierung wurde in Tübingen anders verfahren. Deutlich weniger Patienten erhielten eine Radiotherapie vor der HSZT (Erwachsene 43 %, Kinder 27 % gegenüber 74 % bei Bari et al.), während 100 % der Kinder, aber nur 42 % der Erwachsenen (Bari et al.: 82 %) eine myeloablative Chemotherapie erhielten. Die GvHD-Prophylaxe erfolgte mit Calcineurininhibitoren (CNI), Methotrexat (MTX) und Mycophenolat mofetil (MMF) in unterschiedlichen Regimes bei Kindern und Erwachsenen, sowie mit Antithymozytenglobulin / Muromonab-CD3 (ATG/OKT3) bei 61 % der Erwachsenen.

Die untersuchten Patientenkollektive dieser Arbeit und der Arbeit von Bari et al. unterscheiden sich zwar in Behandlungsschemata und Art der Stammzelltransplantation (HLA-identisch, haploidentisch, 1-3 HLA-Mismatches), was eine Erklärung für die differierenden Untersuchungsergebnisse darstellen könnte, jedoch zeigt sich bei näherer Betrachtung eine vergleichbare Inzidenz von aGvHD bei unseren pädiatrischen und adulten Patienten (54 %, bzw. 49 %)

und den beiden Kohorten von Bari et al. (discovery cohort: 57 %, validation cohort 43 %). Auch die Verteilung der Schweregrade °I-IV der aGvHD war in den Kohorten vergleichbar. Dies legt die Annahme nahe, dass die Patientenkollektive von Bari et al. und uns ausreichend vergleichbar sind, sodass die von Bari et al. postulierte Assoziation zwischen SUFU-Genotyp und dem Auftreten einer aGvHD nach HSZT auch in unserem Studienkollektiv zu beobachten sein müsste. Dies ist jedoch nicht der Fall, in der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation zwischen dem SUFU-Genotyp CC und dem Auftreten einer aGvHD nach HSZT gezeigt werden.

Ein weiterer Einflussfaktor, der bei der Interpretation der vorliegenden Daten beachtet werden muss, ist die Bandbreite der Diagnosen aufgrund derer die untersuchten Patienten transplantiert wurden. Die Patientenkollektive umfassen eine Vielzahl von malignen und nicht-malignen Erkrankungen, welche unterschiedlich vorbehandelt waren, ein Einfluss der zugrundeliegenden Erkrankung sowie der Therapie vor HSZT auf das Auftreten einer aGVHD, kann daher nicht ausgeschlossen werden. Darüberhinaus wurde als Endpunkt der Untersuchung lediglich das Stadium einer aufgetretenen aGvHD definiert, eine differenzierte Auswertung nach betroffenen Organen erfolgte nicht. Kim et al. (2014) konnten jedoch für andere SNPs zeigen, dass der Einfluss eines SNPs auf das Risiko einer GvHD zwischen den unterschiedlichen Organen differiert. Eine solche Abhängigkeit der Inzidenz und des Schweregrades einer GvHD vom betrachteten Organ ist auch für SUFU denkbar.

4.3.2 Klinische Relevanz des SUFU-Genotyps bei AML- und ALL-Patienten

Neben den Faktoren Behandlungsschema und Art der Stammzelltransplantation ist denkbar, dass ein Einfluss des SUFU-Genotyps auf die Inzidenz der aGvHD nach HSZT nur bei einzelnen Erkrankungen vorhanden ist.

Daher wurden die Daten der größten Patientengruppen (AML und ALL-Patienten) zusätzlich in homogeneren Untergruppen mit ähnlichen Patientencharakteristika erneut ausgewertet. Doch zeigt sich, trotz einheitlichen Diagnosen und vergleichbarer Behandlung der Patienten hinsichtlich Art des Transplantats und

Konditionierung der Patienten vor HSZT, kein signifikanter Unterschied in der Inzidenz einer aGvHD zwischen den Patienten mit SUFU-Genotyp CC und jenen mit SUFU-Genotyp CT/TT. Somit kann nach den Ergebnissen dieser Dissertationsarbeit davon ausgegangen werden, dass der SUFU-Genotyp, zumindest bei den AML- und ALL-Patienten, keinen relevanten Einflussfaktor auf die Entwicklung einer aGvHD nach HSZT darstellt.

4.3.3 Einfluss von Konditionierungstherapie und Ganzkörperbestrahlung auf die Entwicklung einer aGvHD

Bei den adulten Patienten mit Genotyp CC, welche vor Transplantation im Rahmen der Konditionierungstherapie eine Ganzkörperbestrahlung erhielten, tritt signifikant häufiger eine aGvHD auf, verglichen mit den Patienten dieser Subgruppe welche eine Konditionierungstherapie ohne Ganzkörperbestrahlung erhielten. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits durch Solh et al. (2021) im nicht-ablativen Setting beobachtet, insgesamt gibt es allerdings noch wenige Untersuchungen zum Einfluss der Ganzkörperbestrahlung auf das Risiko einer GvHD nach HSZT.

Erhielten die Patienten eine Ganzkörperbestrahlung zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen den SUFU-Genotypen CC und CT/TT, auch im Schweregrad der aGvHD kann kein Unterschied gefunden werden.

Patienten mit RIC statt MAC entwickelten in der vorliegenden Kohorte signifikant weniger häufig eine aGvHD. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen vorausgegangener Untersuchungen an Patienten mit RIC oder nicht-ablativer Konditionierungstherapie. Ursächlich hierfür könnte u. a. ein geringerer Gewebeschaden und eine damit verringerte Freisetzung inflammatorischer Zytokine sein, wobei von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen werden muss, bei dem auch das meist höhere Alter der Patienten und die differierende immunsuppressive Therapie im Vergleich zu Patienten mit MAC eine Rolle spielt (Abdul Wahid et al., 2014, Jagasia et al., 2012, Mielcarek et al., 2003, Sorrow et al., 2004). Ein Einfluss des SUFU-Genotyps kann in diesem Zusammenhang jedoch nicht gezeigt werden. Andere Studien wiederum konnten keine Assoziation zwischen Intensität der Konditionierungstherapie und Risiko

einer aGvHD zeigen (Kröger et al., 2017, Sharma et al., 2021). Die Bedeutung der RIC bleibt im Kontext der Entwicklung einer aGvHD somit noch unklar.

4.3.4 Einfluss des SUFU-Genotyps auf die Überlebenszeit nach HSZT

In der vorliegenden Arbeit kann weder für die pädiatrischen noch für die adulten Patienten ein Einfluss des SUFU-Genotyps auf das Überleben nach HSZT gefunden werden. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen von Bari et al. (2015). Interessant wäre an dieser Stelle sicherlich eine darüberhinausgehende Betrachtung hinsichtlich eines Einflusses des SUFU-Genotyps auf das EFÜ nach HSZT, hierzu lagen in der Kohorte jedoch nicht alle erforderlichen Daten vor.

4.3.5 Schlussfolgerung für die klinische Praxis

Ein Vorteil eines bestimmten SUFU-Genotyps bezüglich des Auftretens einer aGvHD oder des Überlebens nach HSZT kann hier nicht konstatiert werden, somit erscheint eine generelle Bestimmung des SUFU-Genotyps zur Therapieplanung und Auswahl der GvHD-Prophylaxe nicht zielführend. Möglicherweise könnte ein solcher Benefit für die Patienten bei bestimmten Konstellationen hinsichtlich Erkrankung, Art der Transplantation und Vor-Therapie bestehen. Um hierzu eine valide Aussage treffen zu können, müssten jedoch zunächst weitere zielgerichtete Untersuchungen, beispielsweise eine prospektive Studie mit weniger Störvariablen, durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit hat sich, in Anlehnung an vorausgegangene Arbeiten von Michaelis (2015), Siebert et al. (2016) und Bari et al. (2015) anhand neuer Patientenkollektive mit dem Einfluss genetischer Varianten im KIR-Rezeptor-Status, FcGR2A - und FcGR3A - Status (rs1801274 und rs396991) sowie dem SUFU SNP rs17114808 auf das Outcome und das Risiko einer GvHD nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation, bzw. CH 14.18-Antikörpertherapie, befasst.

Bei den 73 pädiatrischen Patienten nach hHSZT, darunter 50 Neuroblastompatienten konnte kein Einfluss des KIR Haplotyps auf Rezidivrate, Ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben gezeigt werden. Die Patienten mit KIR Haplotyp A und B unterschieden sich für keinen der genannten Parameter signifikant. Auch bei der Auswertung nach dem KIR Ligand-Modell nach Ruggeri et al. (2002) und dem B-content Score nach Cooley et al. (2010) konnte kein relevanter Unterschied festgestellt werden, ebenso bei der zusätzlich getrennt erfolgten Auswertung der Neuroblastompatienten.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde für 33 Neuroblastompatienten, die nach zuvor erfolgter hHSZT den CH 14.18-Antikörper erhielten, der Einfluss des FcGR2A- und FcGR3A-Genotyps auf Ereignisfreies Überleben, Rezidivrate und Gesamtüberleben untersucht. Es konnte weder bei der separaten Betrachtung von Genotyp FcGR2A RR gegenüber HR/HH und FcGR3A FF gegenüber VF/VV, noch für die kombinierte Auswertung von FcGR2A und FcGR3A in hoch- und niederaffiner Gruppe nach Siebert et al. (2016) ein signifikanter Unterschied für das Outcome der Patienten festgestellt werden.

Im dritten Teil wurde der Einfluss des SUFU-Genotyps auf das Risiko eine aGvHD zu entwickeln untersucht. Für die 733 adulten und 137 pädiatrischen Patienten nach HSZT konnte kein Zusammenhang zwischen SUFU-Genotyp und der Wahrscheinlichkeit eine aGvHD zu entwickeln gefunden werden. Ebenso zeigte sich zwischen den Genotypen kein Unterschied in der Überlebenszeit nach HSZT.

Abschließend ist festzuhalten, dass die Aussagekraft dieser Arbeit für die klinische Anwendung an einigen Stellen aufgrund der niedrigen Patientenzahl

eingeschränkt ist, da nicht immer entschieden werden kann ob aufgrund der Sachlage oder aufgrund der geringen Anzahl der Patienten in den jeweiligen Untergruppen kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden kann.

Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei haploidenter Stammzelltransplantation und CH 14.18-Antikörpertherapie immer noch um Therapieverfahren handelt, die nur an wenigen Zentren durchgeführt werden und es sich somit in Relation zur Anzahl der jährlich durchgeführten Behandlungen um keine kleinen Kohorten handelt.

Trotzdem, oder gerade aufgrund dieser Einschränkungen, sollte an eben diesen Zentren weiterhin eine genaue Erhebung und Beobachtung der untersuchten Parameter erfolgen, um in Zukunft Subgruppen mit ausreichender Aussagekraft bilden und vergleichen zu können. Idealerweise sollte dies in Form eines prospektiven Studienprotokolls erfolgen, um von Anfang an Störvariablen zu reduzieren wo möglich.

6. Literaturverzeichnis

- ABDUL WAHID, S. F., ISMAIL, N. A., MOHD-IDRIS, M. R., JAMALUDDIN, F. W., TUMIAN, N., SZE-WEI, E. Y., MUHAMMAD, N. & NAI, M. L. 2014. Comparison of reduced-intensity and myeloablative conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Stem Cells Dev*, 23, 2535-52.
- ALVES, L. G., RAJALINGAM, R. & CANAVEZ, F. 2009. A novel real-time PCR method for KIR genotyping. *Tissue Antigens*, 73, 188-91.
- BAKKER, A. B., WU, J., PHILLIPS, J. H. & LANIER, L. L. 2000. NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Human immunology*, 61, 18-27.
- BARAKAT, M. T., HUMKE, E. W. & SCOTT, M. P. 2010. Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends Mol Med*, 16, 337-48.
- BARI, R., HARTFORD, C., CHAN, W. K., VONG, Q., LI, Y., GAN, K., ZHOU, Y., CHENG, C., KANG, G., SHURTLEFF, S., TURNER, V., PUI, C. H., DOWNING, J. R. & LEUNG, W. 2015. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis revealed SUFU suppression of acute graft-versus-host disease through downregulation of HLA-DR expression in recipient dendritic cells. *Sci Rep*, 5, 11098.
- BARKER, E. & REISFELD, R. A. 1993. A mechanism for neutrophil-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res*, 53, 362-7.
- BASHIROVA, A. A., MARTIN, M. P., MCVICAR, D. W. & CARRINGTON, M. 2006. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 7, 277-300.
- BRODEUR, G. M. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 3, 203-16.
- BRODEUR, G. M., SEEGER, R. C., SCHWAB, M., VARMUS, H. E. & BISHOP, J. M. 1984. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, 224, 1121-4.
- CHEN, M.-H., WILSON, C. W., LI, Y.-J., LAW, K. K. L., LU, C.-S., GACAYAN, R., ZHANG, X., HUI, C.-C. & CHUANG, P.-T. 2009. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes & Development*, 23, 1910-1928.
- CHENG, S. Y. & YUE, S. 2008. Role and regulation of human tumor suppressor SUFU in Hedgehog signaling. *Adv Cancer Res*, 101, 29-43.
- CHERRY, A. L., FINTA, C., KARLSTROM, M., JIN, Q., SCHWEND, T., ASTORGA-WELLS, J., ZUBAREV, R. A., DEL CAMPO, M., CRISWELL, A. R., DE SANCTIS, D., JOVINE, L. & TOFTGARD, R. 2013. Structural basis of SUFU-GLI interaction in human Hedgehog signalling regulation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69, 2563-79.
- CHEUNG, N. K., CHEUNG, I. Y., KUSHNER, B. H., OSTROVNAYA, I., CHAMBERLAIN, E., KRAMER, K. & MODAK, S. 2012. Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol*, 30, 3264-70.
- CHEUNG, N. K., SOWERS, R., VICKERS, A. J., CHEUNG, I. Y., KUSHNER, B. H. & GORLICK, R. 2006. FCGR2A polymorphism is correlated with clinical outcome after immunotherapy of neuroblastoma with anti-GD2 antibody and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol*, 24, 2885-90.

- COLON, N. C. & CHUNG, D. H. 2011. Neuroblastoma. *Advances in pediatrics*, 58, 297-311.
- COOLEY, S., TRACHTENBERG, E., BERGEMANN, T. L., SAETEURN, K., KLEIN, J., LE, C. T., MARSH, S. G., GUETHLEIN, L. A., PARHAM, P., MILLER, J. S. & WEISDORF, D. J. 2009. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 113, 726-32.
- COOLEY, S., WEISDORF, D. J., GUETHLEIN, L. A., KLEIN, J. P., WANG, T., LE, C. T., MARSH, S. G., GERAGHTY, D., SPELLMAN, S., HAAGENSON, M. D., LADNER, M., TRACHTENBERG, E., PARHAM, P. & MILLER, J. S. 2010. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 116, 2411-9.
- CRUZ-MUNOZ, M. E., VALENZUELA-VAZQUEZ, L., SANCHEZ-HERRERA, J. & SANTA-OLALLA TAPIA, J. 2019. From the "missing self" hypothesis to adaptive NK cells: Insights of NK cell-mediated effector functions in immune surveillance. *J Leukoc Biol*, 105, 955-971.
- DAHAL, L. N., ROGHANIAN, A., BEERS, S. A. & CRAGG, M. S. 2015. FcγR requirements leading to successful immunotherapy. *Immunol Rev*, 268, 104-22.
- DALL'OZZO, S., ANDRES, C., BARDOS, P., WATIER, H. & THIBAUT, G. 2003. Rapid single-step FCGR3A genotyping based on SYBR Green I fluorescence in real-time multiplex allele-specific PCR. *J Immunol Methods*, 277, 185-92.
- DAVIES, S. M., RUGGIERI, L., DEFOR, T., WAGNER, J. E., WEISDORF, D. J., MILLER, J. S., VELARDI, A. & BLAZAR, B. R. 2002. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*, 100, 3825-7.
- DGTI, DGHO, GPOH,. 2016. „Präklinischer und Klinischer Überblick zum Nachweis der Funktionalität und Risiken der Stammzellzubereitungen". Gemeinsame Stellungnahme der Fachgesellschaften DGTI, DGHO und GPOH zu Genehmigungsverfahren von Stammzellzubereitungen, 21.04.2016 2016. Offenbach (Main).
- DUNAEVA, M., MICHELSON, P., KOGERMAN, P. & TOFTGARD, R. 2003. Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins. *J Biol Chem*, 278, 5116-22.
- FERRARA, J. L., LEVINE, J. E., REDDY, P. & HOLLER, E. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet*, 373, 1550-61.
- GESSNER, J. E., HEIKEN, H., TAMM, A. & SCHMIDT, R. E. 1998. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol*, 76, 231-48.
- GIEBEL, S., LOCATELLI, F., LAMPARELLI, T., VELARDI, A., DAVIES, S., FRUMENTO, G., MACCARIO, R., BONETTI, F., WOJNAR, J., MARTINETTI, M., FRASSONI, F., GIORGIANI, G., BACIGALUPO, A. & HOLOWIECKI, J. 2003. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*, 102, 814-9.
- GRAS NAVARRO, A., BJORKLUND, A. T. & CHEKENYA, M. 2015. Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. *Front Immunol*, 6, 202.
- HANDGRETINGER, R., ANDERSON, K., LANG, P., DOPFER, R., KLINGEBIEL, T., SCHRAPPE, M., REULAND, P., GILLIES, S. D., REISFELD, R. A. & NIETHAMMER, D. 1995. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, 31, 261-267.
- HANSON, Q. M. & BARB, A. W. 2015. A perspective on the structure and receptor binding properties of immunoglobulin G Fc. *Biochemistry*, 54, 2931-42.

- HAREL-BELLAN, A., QUILLET, A., MARCHIOL, C., DEMARS, R., TURSZ, T. & FRADELIZI, D. 1986. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 5688-92.
- HEATLEY, S. L., MULLIGHAN, C. G., DOHERTY, K., DANNER, S., O'CONNOR, G. M., HAHN, U., SZER, J., SCHWARER, A., BRADSTOCK, K., SULLIVAN, L. C., BARDY, P. G. & BROOKS, A. G. 2018. Activating KIR Haplotype Influences Clinical Outcome Following HLA-Matched Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Hla*.
- HENAO-MARTINEZ, A. F., AGLER, A. H., LAFLAMME, D., SCHWARTZ, D. A. & YANG, I. V. 2013. Polymorphisms in the SUFU gene are associated with organ injury protection and sepsis severity in patients with Enterobacteriaceae bacteremia. *Infect Genet Evol*, 16, 386-91.
- HODI, F. S., O'DAY, S. J., MCDERMOTT, D. F., WEBER, R. W., SOSMAN, J. A., HAANEN, J. B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J. C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A. J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J. M., LINETTE, G. P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C. H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J. I., WOLCHOK, J. D., WEBER, J. S., TIAN, J., YELLIN, M. J., NICHOL, G. M., HOOS, A. & URBA, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.
- HSU, K. C., CHIDA, S., GERAGHTY, D. E. & DUPONT, B. 2002. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*, 190, 40-52.
- HUANG, M. & WEISS, W. A. 2013. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3, a014415.
- HUANG, X. J., ZHAO, X. Y., LIU, D. H., LIU, K. Y. & XU, L. P. 2007. Deleterious effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion. *Leukemia*, 21, 848-51.
- INGHAM, P. W., NAKANO, Y. & SEGER, C. 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet*, 12, 393-406.
- ISHOLA, T. A. & CHUNG, D. H. 2007. Neuroblastoma. *Surg Oncol*, 16, 149-56.
- JAGASIA, M., ARORA, M., FLOWERS, M. E., CHAO, N. J., MCCARTHY, P. L., CUTLER, C. S., URBANO-ISPIZUA, A., PAVLETIC, S. Z., HAAGENSON, M. D., ZHANG, M. J., ANTIN, J. H., BOLWELL, B. J., BREDESON, C., CAHN, J. Y., CAIRO, M., GALE, R. P., GUPTA, V., LEE, S. J., LITZOW, M., WEISDORF, D. J., HOROWITZ, M. M. & HAHN, T. 2012. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 119, 296-307.
- JAGASIA, M. H., GREINIX, H. T., ARORA, M., WILLIAMS, K. M., WOLFF, D., COWEN, E. W., PALMER, J., WEISDORF, D., TREISTER, N. S., CHENG, G.-S., KERR, H., STRATTON, P., DUARTE, R. F., MCDONALD, G. B., INAMOTO, Y., VIGORITO, A., ARAI, S., DATILES, M. B., JACOBSON, D., HELLER, T., KITKO, C. L., MITCHELL, S. A., MARTIN, P. J., SHULMAN, H., WU, R. S., CUTLER, C. S., VOGELSANG, G. B., LEE, S. J., PAVLETIC, S. Z. & FLOWERS, M. E. D. 2015. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 21, 389-401.e1.
- JIANG, J. & HUI, C. C. 2008. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*, 15, 801-12.

- JIANG, X. M., AREPALLY, G., PONCZ, M. & MCKENZIE, S. E. 1996. Rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods*, 199, 55-9.
- KACZÓWKA, P., WIECZOREK, A., CZOGAŁA, M., KSIĄŻEK, T., SZEWCZYK, K. & BALWIERZ, W. 2018. The role of N-Myc gene amplification in neuroblastoma childhood tumour - single-centre experience. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, 22, 223-228.
- KATZ, M. C., MICHAELIS, S., SIEGMUND, D. M., KOCH, R., BETHGE, W., HANDGRETINGER, R. & MEZGER, M. 2018. Association analysis between SUFU polymorphism rs17114808 and acute graft versus host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 53, 377-382.
- KIM, D., WON, H. H., SU, S., CHENG, L., XU, W., HAMAD, N., UHM, J., GUPTA, V., KURUVILLA, J., MESSNER, H. A. & LIPTON, J. H. 2014. Risk stratification of organ-specific GVHD can be improved by single-nucleotide polymorphism-based risk models. *Bone Marrow Transplant*, 49, 649-56.
- KOEHN, T. A., TRIMBLE, L. L., ALDERSON, K. L., ERBE, A. K., MCDOWELL, K. A., GRZYWACZ, B., HANK, J. A. & SONDEL, P. M. 2012. Increasing the clinical efficacy of NK and antibody-mediated cancer immunotherapy: potential predictors of successful clinical outcome based on observations in high-risk neuroblastoma. *Front Pharmacol*, 3, 91.
- KOENE, H. R., KLEIJER, M., ALGRA, J., ROOS, D., VON DEM BORNE, A. E. & DE HAAS, M. 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*, 90, 1109-14.
- KOGERMAN, P., GRIMM, T., KOGERMAN, L., KRAUSE, D., UNDEN, A. B., SANDSTEDT, B., TOFTGARD, R. & ZAPHIROPOULOS, P. G. 1999. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol*, 1, 312-9.
- KRÖGER, N., IACOBELLI, S., FRANKE, G. N., PLATZBECKER, U., UDDIN, R., HÜBEL, K., SCHEID, C., WEBER, T., ROBIN, M., STELLJES, M., AFANASYEV, B., HEIM, D., DELILIERS, G. L., ONIDA, F., DREGER, P., PINI, M., GUIDI, S., VOLIN, L., GÜNTHER, A., BETHGE, W., POIRÉ, X., KOBBE, G., VAN OS, M., BRAND, R. & DE WITTE, T. 2017. Dose-Reduced Versus Standard Conditioning Followed by Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Patients With Myelodysplastic Syndrome: A Prospective Randomized Phase III Study of the EBMT (RICMAC Trial). *J Clin Oncol*, 35, 2157-2164.
- KROGER, N., ZABELINA, T., BERGER, J., DUSKE, H., KLYUCHNIKOV, E., BINDER, T., STUBIG, T., HILDE-BRANDT, Y., ATANACKOVIC, D., ALCHALBY, H., AYUK, F., ZANDER, A. R., BACHER, U. & EIERMANN, T. 2011. Donor KIR haplotype B improves progression-free and overall survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia*, 25, 1657-61.
- KUSHNER, B. H. 2004. Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *J Nucl Med*, 45, 1172-88.
- LANIER, L. L. 1998. NK CELL RECEPTORS. *Annual Review of Immunology*, 16, 359-393.
- LANIER, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, 225-74.
- LEE, S. J., VOGELSANG, G. & FLOWERS, M. E. 2003. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 9, 215-33.
- LEUNG, W., CAMPANA, D., YANG, J., PEI, D., COUSTAN-SMITH, E., GAN, K., RUBNITZ, J. E., SANDLUND, J. T., RIBEIRO, R. C., SRINIVASAN, A., HARTFORD, C., TRIPLETT, B. M., DALLAS, M., PILLAI, A., HANDGRETINGER, R., LAVER, J. H. & PUI, C. H. 2011. High success rate of

- hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood*, 118, 223-30.
- LITTERA, R., ORRÙ, N., VACCA, A., BERTAINA, A., CAOCCI, G., MULARGIA, M., GIARDINI, C., PIRAS, E., MASTRONUZZI, A., VINTI, L., ORRÙ, S., LOCATELLI, F., CARCASSI, C. & LA NASA, G. 2010. The role of killer immunoglobulin-like receptor haplotypes on the outcome of unrelated donor haematopoietic SCT for thalassaemia. *Bone Marrow Transplant*, 45, 1618-24.
- LJUNGGREN, H. G. & KARRE, K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11, 237-44.
- MARSH, S. G., PARHAM, P., DUPONT, B., GERAGHTY, D. E., TROWSDALE, J., MIDDLETON, D., VILCHES, C., CARRINGTON, M., WITT, C., GUETHLEIN, L. A., SHILLING, H., GARCIA, C. A., HSU, K. C. & WAIN, H. 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol*, 64, 648-54.
- MARTIN, P. J., SCHOCH, G., FISHER, L., BYERS, V., ANASETTI, C., APPELBAUM, F. R., BEATTY, P. G., DONEY, K., MCDONALD, G. B., SANDERS, J. E. & ET AL. 1990. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood*, 76, 1464-72.
- MEHTA, R. S. & REZVANI, K. 2016. Can we make a better match or mismatch with KIR genotyping? *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2016, 106-118.
- MELLOR, J. D., BROWN, M. P., IRVING, H. R., ZALCBERG, J. R. & DOBROVIC, A. 2013. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J Hematol Oncol*, 6, 1.
- MEMBRIVE JIMÉNEZ, C., PÉREZ RAMÍREZ, C., SÁNCHEZ MARTÍN, A., VIEIRA MAROUN, S., ARIAS SANTIAGO, S. A., RAMÍREZ TORTOSA, M. D. C. & JIMÉNEZ MORALES, A. 2021. Influence of Genetic Polymorphisms on Response to Biologics in Moderate-to-Severe Psoriasis. *J Pers Med*, 11.
- MERCHANT, M., VAJDOS, F. F., ULTSCH, M., MAUN, H. R., WENDT, U., CANNON, J., DESMARAIS, W., LAZARUS, R. A., DE VOS, A. M. & DE SAUVAGE, F. J. 2004. Suppressor of Fused Regulates Gli Activity through a Dual Binding Mechanism. *Mol Cell Biol*, 24, 8627-41.
- MICHAELIS, S. 2015. *Die klinische Relevanz der KIR Rezeptoren bei haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation*.
- MICHAELIS, S. U., MEZGER, M., BORNHÄUSER, M., TRENSCHEL, R., STUHLER, G., FEDERMANN, B., OEVERMANN, L., KANZ, L., HANDGRETINGER, R. & BETHGE, W. A. 2014. KIR haplotype B donors but not KIR-ligand mismatch result in a reduced incidence of relapse after haploidentical transplantation using reduced intensity conditioning and CD3/CD19-depleted grafts. *Annals of Hematology*, 93, 1579-1586.
- MIELCAREK, M., MARTIN, P. J., LEISENRING, W., FLOWERS, M. E., MALONEY, D. G., SANDMAIER, B. M., MARIS, M. B. & STORB, R. 2003. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 102, 756-62.
- MODAK, S. & CHEUNG, N. K. 2007. Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Invest*, 25, 67-77.
- MORETTA, A., BOTTINO, C., VITALE, M., PENDE, D., CANTONI, C., MINGARI, M. C., BIASSONI, R. & MORETTA, L. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 19, 197-223.
- MUJOO, K., CHERESH, D. A., YANG, H. M. & REISFELD, R. A. 1987. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for

- monoclonal antibody-mediated cytolysis and suppression of tumor growth. *Cancer Res*, 47, 1098-104.
- NAYYAR, G., CHU, Y. & CAIRO, M. S. 2019. Overcoming Resistance to Natural Killer Cell Based Immunotherapies for Solid Tumors. *Front Oncol*, 9, 51.
- NCBI. *Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs396991* [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs396991 [Accessed 12.08.2022].
- NCBI. *Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1801274* [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs1801274 [Accessed 15.08.2022].
- NCBI. *Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs17114808* [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs17114808 [Accessed 12.08.2022].
- NIEUWENHUIS, E. & HUI, C. C. 2005. Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin Genet*, 67, 193-208.
- NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V. 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 8, 34-47.
- OEVERMANN, L., MICHAELIS, S. U., MEZGER, M., LANG, P., TOPORSKI, J., BERTAINA, A., ZECCA, M., MORETTA, L., LOCATELLI, F. & HANDGRETINGER, R. 2014. KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. *Blood*, 124, 2744-7.
- OLCESE, L., CAMBIAGGI, A., SEMENZATO, G., BOTTINO, C., MORETTA, A. & VIVIER, E. 1997. Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol*, 158, 5083-6.
- PARK, J. R., EGGERT, A. & CARON, H. 2010. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am*, 24, 65-86.
- PEGGS, K. S., QUEZADA, S. A., KORMAN, A. J. & ALLISON, J. P. 2006. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 18, 206-13.
- RAULET, D. H., VANCE, R. E. & MCMAHON, C. W. 2001. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*, 19, 291-330.
- RAVETCH, J. V. & PERUSSIA, B. 1989. Alternative membrane forms of Fc γ RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med*, 170, 481-97.
- RUGGERI, L., CAPANNI, M., URBANI, E., PERRUCCIO, K., SHLOMCHIK, W. D., TOSTI, A., POSATI, S., ROGAIA, D., FRASSONI, F., AVERSA, F., MARTELLI, M. F. & VELARDI, A. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 295, 2097-100.
- RUGGERI, L., MANCUSI, A., CAPANNI, M., URBANI, E., CAROTTI, A., ALOISI, T., STERN, M., PENDE, D., PERRUCCIO, K., BURCHIELLI, E., TOPINI, F., BIANCHI, E., AVERSA, F., MARTELLI, M. F. & VELARDI, A. 2007. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*, 110, 433-40.
- SANDERS, J. E., IM, H. J., HOFFMEISTER, P. A., GOOLEY, T. A., WOOLFREY, A. E., CARPENTER, P. A., ANDREWS, R. G., BRYANT, E. M. & APPELBAUM, F. R. 2005. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for infants with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 105, 3749-56.

- SAWICKI, M. W., DIMASI, N., NATARAJAN, K., WANG, J., MARGULIES, D. H. & MARIUZZA, R. A. 2001. Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors. *Immunol Rev*, 181, 52-65.
- SEITZ, C. M., FLAADT, T., MEZGER, M., LANG, A.-M., MICHAELIS, S., KATZ, M., SYRING, D., JOECHNER, A., RABSTEYN, A., SIEBERT, N., TROSCHKE-MEURER, S., ZUMPE, M., LODE, H. N., YANG, S. F., ATAR, D., MAST, A.-S., SCHEUERMANN, S., HEUBACH, F., HANDGRETINGER, R., LANG, P. & SCHLEGEL, P. 2021. Immunomonitoring of Stage IV Relapsed Neuroblastoma Patients Undergoing Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Subsequent GD2 (ch14.18/CHO) Antibody Treatment. *Frontiers in Immunology*, 12.
- SHARMA, S. K., CHOUDHARY, D., DOVAL, D., KHANDELWAL, V., PATEL, A., SETIA, R., DADU, T. & HANDOO, A. 2021. Myeloablative Versus Reduced Intensity Conditioning Regimens for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome: A Retrospective Analysis. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 37, 472-478.
- SIEBERT, N., JENSEN, C., TROSCHKE-MEURER, S., ZUMPE, M., JUTTNER, M., EHLERT, K., KIETZ, S., MULLER, I. & LODE, H. N. 2016. Neuroblastoma patients with high-affinity FCGR2A, -3A and stimulatory KIR 2DS2 treated by long-term infusion of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO show higher ADCC levels and improved event-free survival. *Oncoimmunology*, 5, e1235108.
- SIMON, T., HERO, B., FALDUM, A., HANDGRETINGER, R., SCHRAPPE, M., KLINGEBIEL, T. & BERTHOLD, F. 2011. Long term outcome of high-risk neuroblastoma patients after immunotherapy with antibody ch14.18 or oral metronomic chemotherapy. *BMC Cancer*, 11, 21.
- SMITH, V. & FOSTER, J. 2018. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children (Basel, Switzerland)*, 5, 114.
- SOLH, M. M., HINOJOSA, G., LAPORTE, J., SOLOMON, S. R., MORRIS, L. E., ZHANG, X., HOLLAND, H. K. & BASHEY, A. 2021. A Phase II Trial of Melphalan Based Reduced-Intensity Conditioning for Transplantation of T-Replete HLA-Haploidentical Peripheral Blood Stem Cells with Posttransplant Cyclophosphamide in Patients with Hematologic Malignancies. *Advances in hematology*, 2021, 8868142-8868142.
- SORROR, M. L., MARIS, M. B., STORER, B., SANDMAIER, B. M., DIACONESCU, R., FLOWERS, C., MALONEY, D. G. & STORB, R. 2004. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood*, 104, 961-8.
- TAKANAMI, I., TAKEUCHI, K. & GIGA, M. 2001. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 121, 1058-1063.
- TAYLOR, M. D., LIU, L., RAFFEL, C., HUI, C. C., MAINPRIZE, T. G., ZHANG, X., AGATEP, R., CHIAPPA, S., GAO, L., LOWRANCE, A., HAO, A., GOLDSTEIN, A. M., STAVROU, T., SCHERER, S. W., DURA, W. T., WAINWRIGHT, B., SQUIRE, J. A., RUTKA, J. T. & HOGG, D. 2002. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*, 31, 306-10.
- TEGLUND, S. & TOFTGARD, R. 2010. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 1805, 181-208.
- UHRBERG, M., VALIANTE, N. M., SHUM, B. P., SHILLING, H. G., LIENERT-WEIDENBACH, K., CORLISS, B., TYAN, D., LANIER, L. L. & PARHAM, P. 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, 7, 753-63.

- UHRBERG, M., VALIANTE, N. M., YOUNG, N. T., LANIER, L. L., PHILLIPS, J. H. & PARHAM, P. 2001. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol*, 166, 3923-32.
- UREÑA-BAILÉN, G., LAMSFUS-CALLE, A., DANIEL-MORENO, A., RAJU, J., SCHLEGEL, P., SEITZ, C., ATAR, D., ANTONY, J. S., HANDGRETINGER, R. & MEZGER, M. 2019. CRISPR/Cas9 technology: towards a new generation of improved CAR-T cells for anticancer therapies. *Briefings in Functional Genomics*, 19, 191-200.
- VAN DUIN, D., AVERY, R. K., HEMACHANDRA, S., YEN-LIEBERMAN, B., ZHANG, A., JAIN, A., BUTLER, R. S., BARNARD, J., SCHOLD, J. D., FUNG, J. & ASKAR, M. 2014. KIR and HLA interactions are associated with control of primary CMV infection in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 14, 156-62.
- VARJOSALO, M. & TAIPALE, J. 2008. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*, 22, 2454-72.
- VELARDI, A., RUGGERI, L., ALESSANDRO, MORETTA & MORETTA, L. 2002. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol*, 23, 438-44.
- VENSTROM, J. M., GOOLEY, T. A., SPELLMAN, S., PRING, J., MALKKI, M., DUPONT, B., PETERSDORF, E. & HSU, K. C. 2010. Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 115, 3162-5.
- VERNERIS, M. R., MILLER, J. S., HSU, K. C., WANG, T., SEES, J. A., PACZESNY, S., RANGARAJAN, H., LEE, D. A., SPELLMAN, S. R. & LEE, S. J. 2020. Investigation of donor KIR content and matching in children undergoing hematopoietic cell transplantation for acute leukemia. *Blood Adv*, 4, 1350-1356.
- VILCHES, C., CASTANO, J., GOMEZ-LOZANO, N. & ESTEFANIA, E. 2007. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens*, 70, 415-22.
- VILCHES, C. & PARHAM, P. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 20, 217-51.
- VITALE, M., CANTONI, C., PIETRA, G., MINGARI, M. C. & MORETTA, L. 2014. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*, 44, 1582-92.
- VOGELSANG, G. B., LEE, L. & BENSON-KENNEDY, D. M. 2003. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*, 54, 29-52.
- WANG, W., ERBE, A. K., HANK, J. A., MORRIS, Z. S. & SONDEL, P. M. 2015. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 6, 368.
- WARMERDAM, P. A., VAN DE WINKEL, J. G., VLUG, A., WESTERDAAL, N. A. & CAPEL, P. J. 1991. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol*, 147, 1338-43.
- WELNIAK, L. A., BLAZAR, B. R. & MURPHY, W. J. 2007. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*, 25, 139-70.
- WITT, C. S. 2009. The influence of NK alloreactivity on matched unrelated donor and HLA identical sibling haematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol*, 21, 531-7.
- WU, J., EDBERG, J. C., REDECHA, P. B., BANSAL, V., GUYRE, P. M., COLEMAN, K., SALMON, J. E. & KIMBERLY, R. P. 1997. A novel polymorphism of

- FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*, 100, 1059-70.
- YU, A. L., GILMAN, A. L., OZKAYNAK, M. F., LONDON, W. B., KREISSMAN, S. G., CHEN, H. X., SMITH, M., ANDERSON, B., VILLABLANCA, J. G., MATTHAY, K. K., SHIMADA, H., GRUPP, S. A., SEEGER, R., REYNOLDS, C. P., BUXTON, A., REISFELD, R. A., GILLIES, S. D., COHN, S. L., MARIS, J. M., SONDEL, P. M. & CHILDREN'S ONCOLOGY, G. 2010. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *The New England journal of medicine*, 363, 1324-1334.
- ZHANG, H., DAI, Z., WU, W., WANG, Z., ZHANG, N., ZHANG, L., ZENG, W. J., LIU, Z. & CHENG, Q. 2021. Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 40, 184.
- ZHOU, K., LI, X. L., PAN, J., XU, J. Z. & WANG, J. 2018. Analysis of the risk factor for the poor prognosis of localized neuroblastoma after the surgical. *Medicine (Baltimore)*, 97, e12718.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) unter Betreuung von Prof. Dr. med. R. Handgretinger, Dr. med. Dr. rer. nat. M. Mezger und Dr. med. S. Michaelis durchgeführt. Die Konzeption der Studien erfolgte durch Dr. med. Dr. rer. nat. M. Mezger und Dr. med. S. Michaelis.

Die DNA-Proben wurden mir zur Verfügung gestellt von der Abteilung I der Kinderklinik des UKT, zu dieser Zeit unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Handgretinger. Die Methode zur KIR-Typisierung wurde in der Kinderklinik durch Dr. med. Dr. rer. nat. M. Mezger und Dr. med. S. Michaelis eingeführt, die PCR-Protokolle zur FcGR- und SUFU-Typisierung ebenfalls von ihnen bereitgestellt. Die KIR-, FcGR- und SUFU-Typisierung der jeweiligen Proben sowie die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde von mir eigenständig durchgeführt.

Die klinischen Daten der adulten Patienten für die SUFU-Typisierung wurden von der Studienzentrale der Medizinischen Klinik Abteilung II des UKT unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Bethge zur Verfügung gestellt und von mir aus den im UKT dokumentierten Patientendaten ergänzt.

Die klinischen Daten der pädiatrischen Patienten wurden von mir selbst aus den in der Kinderklinik des UKT dokumentierten Patientendaten erhoben, fehlende Daten konnten aus den Erhebungen der Studienzentrale der Kinderklinik unter Leitung von Prof. Dr. med. R. Handgretinger vervollständigt werden.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

8. Veröffentlichungen

Katz, M. C., Michaelis, S., Siegmund, D. M., Koch, R., Bethge, W., Handgretinger, R. & Mezger, M. 2018. Association analysis between SUFU polymorphism rs17114808 and acute graft versus host disease after hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant, 53, 377-382.

Diese Publikation umfasst die Ergebnisse des SUFU-Teils der vorliegenden Arbeit. Die Datenerhebung, Versuchsdurchführung und Auswertung, incl. Tabellen und Grafiken erfolgte durch mich.

Seitz, C. M., Flaadt, T., Mezger, M., Lang, A.-M., Michaelis, S., Katz, M., Syring, D., Joechner, A., Rabsteyn, A., Siebert, N., Troschke-Meurer, S., Zumpe, M., Lode, H. N., Yang, S. F., Atar, D., Mast, A.-S., Scheuermann, S., Heubach, F., Handgretinger, R., Lang, P. & Schlegel, P. 2021. Immunomonitoring of Stage IV Relapsed Neuroblastoma Patients Undergoing Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Subsequent GD2 (ch14.18/CHO) Antibody Treatment. Frontiers in Immunology, 12.

Diese Publikation beinhaltet Ergebnisse aus dem FcGR und CH 14.18-Antikörpertherapie Teil der vorliegenden Arbeit. Die hierfür zugrundeliegende Datenerhebung, Versuchsdurchführung und Auswertung erfolgte durch mich.

9. Anhang

Tabelle 32: Nomenklatur der KIR-Rezeptoren. Modifiziert nach Marsh et al. (2003)

Gen	CD-Klassifikation	Beschreibung des Aufbaus
KIR3DL1	CD158e1	3 Domänen, langer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 1
KIR3DL2	CD158k	3 Domänen, langer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 2
KIR3DL3	CD158z	3 Domänen, langer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 3
KIR2DL1	CD158a	2 Domänen, langer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 1
KIR2DL2	CD158b1	2 Domänen, langer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 2
KIR2DL3	CD158b2	2 Domänen, langer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 3
KIR2DL4	CD158d	2 Domänen, langer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 4
KIR2DL5	CD158f	2 Domänen, langer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 5
KIR3DS1	CD158e2	3 Domänen, kurzer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 1
KIR2DS1	CD158h	2 Domänen, kurzer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 1
KIR2DS2	CD158j	2 Domänen, kurzer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 2
KIR2DS3	keine CD-Bezeichnung	2 Domänen, kurzer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 3
KIR2DS4	CD158i	2 Domänen, kurzer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 4
KIR2DS5	CD158g	2 Domänen, kurzer zytoplasmatischer Schwanz, Nummer 5
KIR3DP1	CD158c	3 Domänen, Pseudogen, Nummer 1
KIR2DP1	keine CD-Bezeichnung	2 Domänen, Pseudogen, Nummer 1

Tabelle 33: Überblick über die bisher bekannten KIR Liganden. Modifiziert nach Michaelis (2015) und van Duin et al. (2014)

	KIR Rezeptor				
	2DL1 und 2DS1	2DL2/3 und 2DS2	3DL1 und 3DS1	3DL2	2DL4
HLA-Ligand	HLA-C Gruppe 2 C*02 C*04 C*05 C*06	HLA-C Gruppe 1 C*01 C*03 C*07 C*08	HLA- Bw4 B*08 B*13 B*27 B*44 B*51 B*52 B*53 B*57 B*58	HLA-A A*03 A*11	HLA-G

Tabelle 34: Übersicht der zentromerischen (Cen) und telomerischen (Tel) Genmotive. Modifiziert nach Cooley et al. (2010)

Zentromerisch (2DS2, 2DL2, 2DL3)		Telomerisch (3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4)	
Cen-A/A	nur 2DL3	Tel-A/A	nur 3DL1 und 2DS4
Cen-A/B	2DL3 mit 2DL2 und/oder 2DS2	Tel-A/B	3DL1 und 2DS4 mit 3DS1 und/oder 2DS1
Cen-B/B	kein 2DL3, 2DL2 und/oder 2DS2	Tel-B/B	3DL1 und/oder 2DS4 fehlen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich noch ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger, der es mir ermöglicht hat diese Dissertation in seiner Abteilung durchzuführen.

Bei Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Mezger und Dr. med. Sebastian Michaelis möchte ich mich besonders bedanken, für die Betreuung bei dieser Arbeit, für die fachliche und praktische Unterstützung und die Möglichkeit jederzeit meine Fragen los zu werden.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Laborkolleginnen Renate Koch und Darina Siegmund bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich beim Erlernen der notwendigen praktischen Fertigkeiten zur Durchführung dieser Arbeit angeleitet haben. Ebenso danke ich den Damen aus dem Chimärismuslabor der Kinderklinik, welche es mir im laufenden Routinebetrieb immer wieder ermöglicht haben ihre Geräte mit zu nutzen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. Wolfgang Bethge und Prof. Dr. med. Peter Lang für die zur Verfügungstellung der klinischen Daten sowie bei Dr. med. Tim Flaadt für die Beantwortung meiner Fragen zur Phase II-CH 14.18-Studie.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern und meinem Mann möchte ich herzlich danken für ihr aufrichtiges Interesse und die liebevolle Unterstützung und Motivation während des Erstellens dieser Arbeit und meines gesamten Studiums. Meinem Ehemann Simon darüberhinaus für den fachlichen Austausch und das Rücken freihalten Zuhause.