

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
(Direktor: Prof. Dr. Martin Schrappe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG GENETISCHER VARIATION IN DEN
GENEN *NLRP1*, *NLRP2*, *NLRP3* FÜR DAS THERAPIEERGEBNIS DER
ALLOGENEN HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLTRANSPLANTATION BEI AKUTER
LYMPHOBLASTISCHER LEUKÄMIE IM KINDES- UND JUGENDALTER

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
IDA SIUTS
aus Jever

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stanulla

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gramatzki

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2013

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 13.11.2013

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi

Gewidmet den Patienten, die sich hinter den Daten verbergen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Rolle der NOD-ähnlichen-Rezeptoren in der angeborenen Immunabwehr	1
1.2	Struktur und Lokalisation der NOD-ähnlichen-Rezeptoren	2
1.3	Aktivierung des Inflammasoms	3
1.4	Mutationen in <i>NLRP</i> -Genen und assoziierte Krankheitsbilder	4
1.5	Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter	5
1.6	Ätiologie der akuten lymphoblastischen Leukämie	6
1.7	Klassifikation der akuten lymphoblastischen Leukämie	6
1.7.1	Klassifikation anhand der Morphologie	6
1.7.2	Klassifikation anhand der Immunphänotypisierung	7
1.7.3	Klassifikation anhand zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen	7
1.8	Erfassung der minimalen Resterkrankung	9
1.9	Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie	9
1.10	Stammzelltransplantation bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie	11
1.10.1	Indikationen zur Stammzelltransplantation	11
1.10.2	Eigenschaften von Stammzellen	12
1.10.3	Prognose nach Stammzelltransplantation	12
1.10.4	Bedeutung des HLA-Systems	13
1.10.5	Toxizität der Stammzelltransplantation	14
1.10.6	Einzelnukleotidpolymorphismen und ihr Einfluss auf das Therapieergebnis	15
1.11	Akute Graft-versus-Host-Reaktion	15
1.11.1	Bedeutung der Minor-Histokompatibilitäts-Antigene	17
1.11.2	Risikofaktoren für das Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion	18
1.11.3	Die chronische Graft-versus-Host-Reaktion	18
1.12	Das Engraftment	19
1.13	Rezidivdiagnostik	19
1.14	Einzelnukleotidpolymorphismen in <i>NLRP</i> -Genen	20
1.15	Fragestellung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Patientendaten und Therapieschemata	23
2.1.1	Patientendaten	23
2.1.2	Struktur der ALL-BFM 2000-Studie	23
2.1.3	Diagnosestellung nach ALL-BFM Kriterien	24

2.1.4	Stratifizierung in Risikogruppen, Kriterien für die Hochrisikogruppe	24
2.1.5	ALL-SCT-BFM 2003-Studie und Behandlung der Hochrisikogruppe	25
2.2	Patientenauswahl	26
2.3	Analyse der Einzelnukleotidpolymorphismen	27
2.3.1	Isolierung der DNA	27
2.3.2	Genotypisierung der Einzelnukleotidpolymorphismen	28
2.4	Statistische Auswertung	34
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	36
3.2	Stammzelltransplantationassoziierte Charakteristika des Patientenkollektivs	39
3.3	Anwendung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium	43
3.4	Genotypen der <i>NLRP</i> -Gene von Empfänger und Spender	44
3.5	Genotypen des Empfängers und Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion	44
3.6	Genotypen des Empfängers und Auftreten eines Rezidivs	47
3.7	Genotypen des Spenders und Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion	47
3.8	Genotypen des Spenders und Auftreten eines Rezidivs	47
3.9	Diskordante <i>NLRP</i> -Genotypen und Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion	51
3.10	Diskordante <i>NLRP</i> -Genotypen und Auftreten eines Rezidivs	51
4	DISKUSSION	54
4.1	Bedeutung der Studie im Kontext mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten	54
4.2	Einzelnukleotidpolymorphismen und Auftreten eines Rezidivs	56
4.3	Einzelnukleotidpolymorphismen und Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion	57
4.4	Studiendesign und Fehleranalyse	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	62
6	LITERATURVERZEICHNIS	63
7	ANHANG	75
7.1	Lebenslauf	75
7.2	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	76
7.3	Erklärung	76
7.4	Danksagung	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
ASC	<i>Apoptosis associated speck like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B-ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie der B-Zelllinie
BCR-ABL1	<i>Breakpoint cluster region-abelson murine leukemia viral oncogene 1</i>
BFM-Protokolle	Berlin-Frankfurt-München-Protokolle
BIR	<i>Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain</i>
BLP	Bakterienlipoprotein
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CARD	Caspase-Rekrutierungsregion
CCT	craniale Computertomographie
CD	Leukozytendifferenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CGP	<i>Cytokine gene polymorphism</i>
CLR	C-type-Lektin-Rezeptor
CoALL	Studie Cooperative Study Group for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia
CR	komplette Remission
CRP	C-reaktives-Protein
CTL	zytotoxische T-Zelle
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
d.h.	das heißt
EBV	Ebstein-Barr Virus
EGIL	European Group for the Immunological Classification of Leukemia
Er α	Östrogenrezeptor- α
FAB-Klassifikation	<i>French-American-British-Klassifikation</i>
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FasL	Fas-Ligand
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
g/l	Gramm/Liter
GvHD	Graft-versus-Host-Reaktion
GvL	Graft-versus-leukemia
Gy	Gray
h	Stunde
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICE	<i>IL1β converting enzyme</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Nitritoxidase
kDa	Kilo Dalton
KIKK(-Studie)	Kinderkrebs in der Umgebung von Kernkraftwerken(-Studie)
KM	Knochenmark
95% -KI	95% -Konfidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich-repeat</i>
LTA	Lipoteichonsäure

MBL	Mannose-bindendes-Lektin
MDP	Muramyl-dipeptid
mHAg	Minor-Histokompatibilitäts Antigen
MHC	Major-Histokompatibilitäts Antigen
ml	Milliliter
MLL-AF4	<i>Mixed Lineage Leukemia - ALL-1 fused gene on chromosome 4</i>
MMR	Mannose-Rezeptor
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
MSR	Makrophagen-Scavenger-Rezeptor
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NBD	Nukleotid-Bindungs-Domäne (<i>nucleotide-binding domain</i>)
ng	Nanogramm
NLR	NOD-like-Rezeptor
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NOD	<i>Nucleotide oligomerization domain</i>
OR	Odds Ratio
PAMP	<i>Pathogen associated pattern</i>
PAS-Färbung	Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (<i>periodic acid-Schiff stain</i>)
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBSC	Stammzellen aus peripherem Blut (<i>peripher blood stem cells</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGN	Peptidoglykan
PGR	<i>Prednison good responder</i>
Ph	Philadelphia-Chromosom
PPR	<i>Prednison poor responder</i>
PR	<i>Prednison response</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PYD	Pyrimidin
Q	Quencher (fluoreszenzlöschende Verbindung der Realtime-PCR)
R	Reporter (Fluoreszenzfarbstoff der Realtime-PCR)
SAE	<i>Serious Adverse Event</i>
SAP	Serum-Amyloid-Protein
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (<i>single nucleotid polymorphism</i>)
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SZT	humane Stammzelltransplantation
Tab	Tabelle
T-ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie der T-Zelllinie
TEL/AML1	<i>Translocation ETS-like Leukemia/Acute Myeloid Leukemia-1</i>
TH1-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like-Rezeptor
u.a.	unter anderem
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
z.b.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tab 1: Prognostische Faktoren und Häufigkeit ihres Auftretens	11
Tab 2: Indikationen für eine SZT in den Studien ALL-BFM-2000 und CoALL	13
Tab 3: Einteilung der Stadien und Grade der aGvHD	17
Tab 4: Kriterien für ein ALL-Rezidiv	19
Tab 5: In der Literatur beschriebene <i>NLRP</i> -Genotypen	21
Tab 6: Initiale Charakteristika des Patientenkollektivs	37
Tab 7: Stammzelltransplantationassoziierte Charakteristika	40
Tab 8: Genetische Konstitution und Allelfrequenzen	43
Tab 9: <i>NLRP</i> -Genotypen von Spender und Empfänger	45
Tab 10: Assoziation der <i>NLRP</i> -Genotypen des Empfängers mit einer Graft-versus-Host-Reaktion	46
Tab 11: Assoziation der <i>NLRP</i> -Genotypen des Empfängers mit einem Rezidiv	48
Tab 12: Assoziation der <i>NLRP</i> -Genotypen des Spenders mit einer Graft-versus-Host-Reaktion	49
Tab 13: Assoziation der <i>NLRP</i> -Genotypen des Spenders mit einem Rezidiv	50
Tab 14: Assoziation der diskordanten <i>NLRP</i> -Genotypen mit einer Graft-versus-Host-Reaktion	52
Tab 15: Assoziation der diskordanten <i>NLRP</i> -Genotypen mit einem Rezidiv	53

Abbildungsverzeichnis

Abb 1: Struktur der NOD-ähnlichen-Rezeptoren	2
Abb 2: Prinzip der Detektion mit einer TaqMan-Sonde	30
Abb 3: Alleltypisierung von rs 10925027, DNA-Proben vor Stammzelltransplantation	32
Abb 4: Alleltypisierung von rs 10925027, DNA-Proben nach Stammzelltransplantation	33
Abb 5: Hardy-Weinberg-Äquilibrium	35

Definitionen

<i>Ereignisfreies Überleben (EFS)</i>	Das EFS (<i>event free survival</i>) beginnt mit dem Datum der Diagnosestellung und endet mit der letzten Nachsorgeuntersuchung oder dem Eintritt eines Ereignisses. Als Ereignis gelten: Tod vor Therapiebeginn, therapiebedingter Tod, Non-Response, Rezidiv, Tod in vollständiger Remission, Auftreten eines Zweitmalignoms.
<i>Erkrankungsfreies Überleben (DFS)</i>	Die Definition des DFS (<i>disease free survival</i>) entspricht der des EFS, es gehen jedoch nur Non-Response und Rezidiv als Ereignis in die Überlebensanalyse mit ein.
<i>Gesamtüberleben (OS)</i>	Das OS (<i>overall survival</i>) bezeichnet die Zeitdauer vom Therapiebeginn bis zum Tod jedweder Ursache.
<i>therapiebedingte Mortalität (NRM)</i>	Die NRM (<i>non relapse mortality</i>) ist eine Todesursache, die auf die Therapie und nicht auf ein Rezidiv der Leukämie zurückzuführen ist.
<i>Non-Response</i>	Das <i>Non-Response</i> beschreibt das Ausbleiben einer vollständigen Remission im Verlauf der Therapie.
<i>vollständige Remission</i>	Unter einer vollständigen Remission im Knochenmark versteht man das Erreichen eines M1 Knochenmarks, d.h. weniger als 5% leukämische Blasten im Knochenmark.
<i>Rezidiv</i>	Ein isoliertes Knochenmarksrezidiv besteht bei Vorliegen von mehr als 25% Lymphoblasten im Knochenmark nach zuvor erreichter vollständiger Remission.
<i>Zweitmalignom</i>	Eine maligne Erkrankung, die während oder nach der Therapie auftritt und sich vom ursprünglichen Tumorleiden unterscheidet.

1 EINLEITUNG

1.1 Rolle der NOD-ähnlichen-Rezeptoren in der angeborenen Immunabwehr

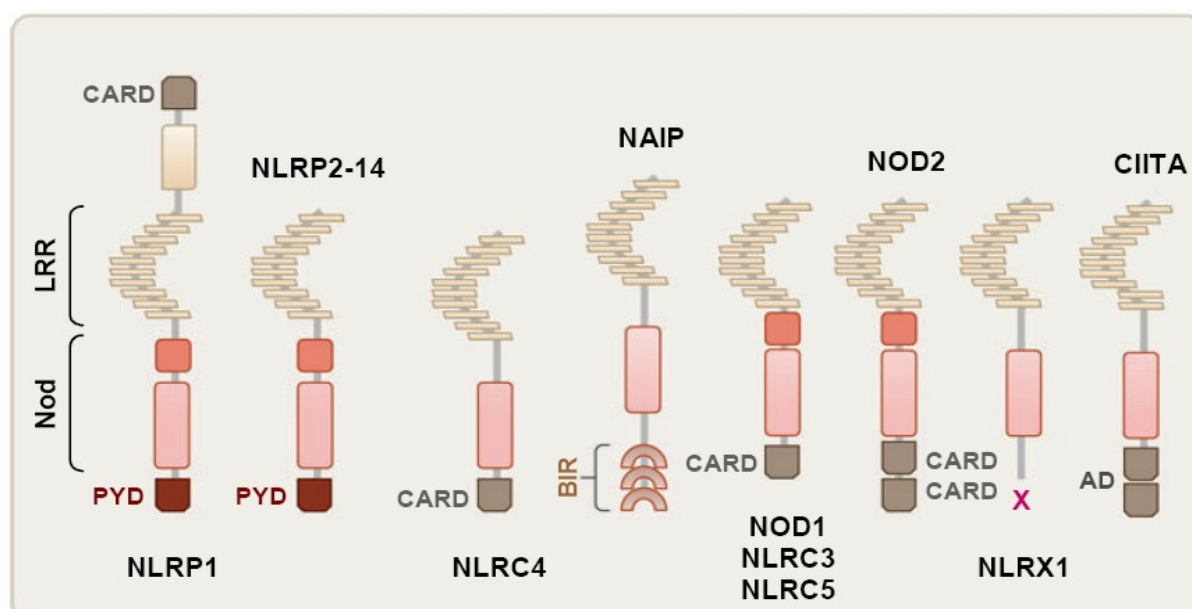
Die angeborene Immunantwort dient der Erkennung von eindringenden Infektionserregern und der Aktivierung der erworbenen Immunabwehr. Keimbahnkodierte Rezeptoren (*pattern-recognition-receptors*, PRRs) erkennen Pathogene oder deren Toxine, die die Epithelbarriere eines Organismus überwunden haben. Die PRRs reagieren auf molekulare Muster unterschiedlicher Pathogene (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Dazu gehören Viren-, Bakterien- und Pilzbestandteile. Zu den PRRs gehören die löslichen Rezeptoren wie das Mannose-bindende-Lektin (MBL), das C-reaktive-Protein (CRP) und das Serum-Amyloid-Protein (SAP). Sie haben die Opsonierung und eine Verstärkung der Aktivierung des Komplementsystems zur Aufgabe. Auf Makrophagen werden der Mannose-Rezeptor (MMR) und der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor (MSR) ausgebildet, diese induzieren die Phagozytose von Mikroorganismen. Die Funktion der membranständigen Rezeptoren, wie der C-Type-lectin-Rezeptoren (CLRs) und der Toll-like-Rezeptoren (TLRs), ist in Antwort auf pathogene Stimuli die Aktivierung verschiedener Signalwege sowie die Induktion der Expression von Transkriptionsfaktoren. Daraus resultiert die Produktion von antimikrobiellen Peptiden, inflammatorischen Chemo- und Zytokinen und eine Hochregulation der Major-Histokompatibilitäts-Antigene (MHCs) (Janeway et al. 2002).

Zytoplasmatisch sind Helikasen (*RiG-like helicases*, RLRs) die virale Nukleinsäuren erkennen und die NOD-like-Rezeptoren (*nucleotid-binding oligomerization domain receptors*, NLRs) lokalisiert. Diese spielen eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunantwort. Einige NLRs bilden einen Caspase1 aktivierenden zytosolischen Multiproteinkomplex von einer Größe von mehr als 700 kDa, das Inflammasom. Dieser Multiproteinkomplex löst eine Immunreaktion durch die Erkennung von endogenen Signalen wie Adenosintriphosphat (ATP), Urat, Calcium-Pyrophosphat Kristallen sowie von äußeren pathogenen Produkten wie bakterielle RNA und Toxine aus (Yoneyama and Fujita, 2009; Martinon et al. 2009).

1.2 Struktur und Lokalisation der NOD-ähnlichen-Rezeptoren

NLRs bestehen aus einer C-terminalen leucinreichen Domäne (*leucine-rich-repeat*, LRR), die der Ligandenerkennung und Autoregulation dient, einer zentralen Nukleotid-Domäne (NOD-Domäne, NACHT-Domäne), die eine Oligomerisierung auslöst sowie einer N-terminalen Effektor-domäne, die eine Signaltransduktion induziert. Diese Effektor-domäne ist variabel und definiert so fünf Untergruppen: NLR-A, NLR-B, NLR-C, NLR-P und NLR-X, siehe Abbildung 1 (Abb 1).

Abb 1: Struktur der NOD-ähnlichen-Rezeptoren*



*nach Martinon et al. 2009. PYD=Pyrimindomäne; LRR=Leucin-reiche-Domäne; CARD=Caspase-Rekrutierungsregion; CIITA=MHCII Transaktivator, BIR=baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain; AD=Aktivierungsdomäne

Es sind 22 intrazelluläre Proteine der NLR-Familie bekannt. Sie lässt sich in fünf Subfamilien unterteilen (Martinon et al. 2009).

1. Die 14 NALPs (*NLRP*-Gen-kodiert), die eine Pyrin-Domäne (PYD) enthalten. Diese werden zur CATERPILLAR-Gruppe (*caspase recruitment domain (CARD), transcription enhancer, R-(purine) binding, Pyrin, lots of LRR*) gezählt. NALP1 besitzt eine zusätzliche Domäne zur Caspaseaktivierung, diese wird auch Cardinaldomäne genannt (*CARD-containing protein*). Sie besteht aus FIIND, einer Interaktionsdomäne zur Inflammasomformation, und CARD, diese Domäne fehlt NALP2 und NALP3 (Tschopp et al. 2003).
2. Die fünf NODs, die jeweils eine CARD-Domäne (*NLRC*-Gen kodiert) besitzen.
3. CIITA (MHC *class II transactivator*) (*NLRA*-Gen kodiert).

4. IPAF (ICE (*interleukin-1-beta converting enzyme*)-*protease activating factor*).
5. Sowie NAIP (*NLRB*-Gen-kodiert), das die BIR-Domäne (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*) enthält.

Insgesamt verteilen sich die Gene der Proteine auf acht Chromosomen, wobei jedoch die NALP-Proteine Gencluster bilden. NALP6, NALP10, NALP14 sind auf Chromosom 11p15 lokalisiert. NALP2, NALP4, NALP5, NALP7, NALP8, NALP9, NALP11, NALP12, NALP13 sind auf Chromosom 19q13 angeordnet, nur NALP1 befindet sich auf Chromosom 17p13 und NALP 3 auf Chromosom 1q44. Das Effektorprotein von NALP1, NALP2, NALP3 ist jeweils Caspase1 (entspricht ICE). NALP1 besitzt zusätzlich als Effektorprotein Caspase5. NALP3 wird auch als Cryopyrin bezeichnet (Martinon et al. 2005).

1.3 Aktivierung des Inflammasoms

Das Inflammasom wird durch die Erkennung von PAMPs durch PRRs aktiviert. Als PRRs fungieren die LRR-Domänen der NALP-Proteine. PAMPs sind virale RNA und bakterielle Zellwandbestandteile, dazu gehören Lipopolysaccharide (LPS), Bakterienlipoproteine (BLP), Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglykane (PGN) und intrazelluläre Proteine, wie Cytosin-phosphatidyl-Guanin-DNA (CpG-DNA), die häufig im Genom von Bakterien und Viren, jedoch nicht bei Wirbeltieren vorkommt (Martinon et al. 2005). Es wurde nachgewiesen, dass das bakterielle PGN sowohl als Aktivator der NODs (Girardin et al. 2003) als auch von NALP3 wirkt (Martinon et al. 2005). Dabei wird das PGN, das Bestandteil der Bakterienzellwand ist, phagozytiert und hydrolysiert. Die dabei entstehenden Spaltprodukte, die Muropeptide, verfügen über eine hohe immunologische Aktivität. Das kleinste Hydrolyseprodukt, das Muramyldipeptid (MDP), aktiviert das NALP3. Damit erfolgt die Aktivierung unabhängig von den TLRs, die das Lipopolysaccharid (LPS) von Bakterien erkennen (Martinon et al. 2004, Petrilli et al. 2005). Wird das NALP1-Inflammasom aktiviert, lagert sich das Zentralprotein NALP1 mit dem ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) Molekül, einem Adaptermolekül, welches aus CARD und PYD besteht und die PYD des NLRs mit der CARD von Caspase1 verbindet, sowie Caspase1 und Caspase5 zum Inflammasomkomplex zusammen. Für die Bildung des NALP2/3-Inflammasoms ist die Interaktion von NALP2 und NALP3, ASC, Caspase1 und eines zusätzlichen Cardinalproteins notwendig. Für NALP3 ist das ASC essentiell (Agostini et al. 2004). Durch die so erfolgte Aktivierung der proteolytischen Caspase1 spaltet diese inaktive Vorstufen der Zytokine Interleukin-1 β (IL1 β) und Interleukin-18 (IL18) in

ihre aktive Form und induziert die Pyroptose. Dies ist eine Caspase1 abhängige Sonderform des programmierten Zelltodes zwischen Apoptose und Nekrose, der die Ausbreitung von Mikroben eindämmt (Bryant et al. 2009). Nach Schmitz et al. (2005) wird IL33 ebenfalls über Caspase1 aktiviert.

Zytokine sind Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren für Immunzellen. Nach ihrer Struktur und Wirkung werden sie in Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Typ I- und Typ II-Interferone (IFN), transformierende Wachstumsfaktoren (TGF) und koloniestimulierende Faktoren (CSF) unterteilt (Janeway et al. 2002). So fördert IL1 β , das initial als inaktive Vorstufe (pro-IL1 β) ins Zytoplasma sezerniert wird, im aktiven Zustand die Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen sowie die Reifung und Proliferation von B-Zellen. Außerdem induziert IL1 β die Expression von pro-inflammatorischen Genen wie die der induzierbaren Nitritoxidase (iNOS), anderen Chemo- und Zytokinen und erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen, die die Infiltration von Leukozyten aus den Blutgefäßen in das Gewebe hervorrufen. IL18 gehört ebenfalls der IL1-Zytokinfamilie an und wird durch Caspase1 prozessiert. Es wird allerdings in manchen Zellen, wie dendritischen Zellen (DCs) konstitutiv exprimiert. IL18 induziert synergistisch mit IL12 die Bildung des Typ II-Interferons IFN- γ durch T- und NK-Zellen. Dies wiederum aktiviert Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen und Lymphozyten (Dinarello 2009).

1.4 Mutationen in *NLRP*-Genen und assoziierte Krankheitsbilder

Krankheiten, die auf eine Veränderung in den *NLRP*-Genen zurückzuführen sind, haben in ihrer klinischen Ausprägung Ähnlichkeit mit dem Bild von Autoimmunerkrankungen. Dies ist auf die Schlüsselrolle von IL1 β in Entzündungsreaktionen zurückzuführen. Das *NLRP1*-Gen wurde als Risikogen für eine Vitiligo identifiziert. Bei Patienten mit Vitiligo-assoziierten Autoimmunerscheinungen ließen sich gehäuft Mutationen im *NLRP1*-Gen zwischen der PYD und Nukleotid-Bindungs-Domäne (*nucleotide-binding domain*, NBD) nachweisen. Missense-Mutationen in der NBD des *NLRP3*-Gens oder auch Cryopyrin-Gens verursachen die sogenannten Cryopyrinopathien. Dazu gehören die familiäre Kälteuricaria (FCAS), eine neonatal beginnende Systemerkrankung (CINCA) und das Muckle-Wells-Syndrom (MWS). Diese Erkrankungen sind alle durch wiederkehrende Episoden von Fieber und serösen Entzündungen gekennzeichnet. Eine Behandlung mit dem IL1-Antagonisten Anakinra hat häufig eine Verbesserung der Klinik zur Folge. Durch eine *Gain-of-function*-Mutation wird die Inhibition des *NLRP3*-Inflammasoms gestört, es kommt zu einer Hyperaktivität mit einer spontanen

NALP3-Aktivierung und Oligomerisierung ohne Anwesenheit eines Liganden. Die spontane IL1 β -Sekretion geht mit einer Progression der Krankheit einher. Des Weiteren sind Mutationen im *NLRP3*-Gen und *NLRC2*-Gen (NOD2) mit Morbus Crohn assoziiert und genetische Variationen im *NLRC1*-Gen (NOD1) werden mit einer erhöhten Allergieanfälligkeit in Verbindung gebracht. Da das NALP3-Inflammasom auch von Natriumuratkristallen und β -Amyloid als Liganden aktiviert wird und damit die IL1 β -vermittelten Entzündung auslöst, wird es in Zusammenhang mit der Entstehung von Gicht und Morbus Alzheimer gebracht (Rodrigue-Gervais et al. 2010; Aksentijevich et al. 2007).

1.5 Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters, der Erkrankungsgipfel liegt zwischen zwei und fünf Jahren. Durch fehlregulierte Differenzierung und Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen kommt es zu einer Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark (KM) mit den klinischen Symptomen einer Knochenmarksinsuffizienz wie Anämie, Thrombozytopenie und Leukopenie. Die nicht mehr den normalen Regulationsmechanismen unterliegende transformierte leukämische Zelle hat die Eigenschaft verloren, sich in ein reifes Endprodukt zu differenzieren. Die Teilungsfähigkeit der transformierten Zelle bleibt jedoch erhalten, sodass jede Tochterzelle die gleichen genetischen Veränderungen wie diese aufweist. Durch eine Organinfiltration der ausgeschwemmten leukämischen Zellen aus dem KM über den Blutstrom kommt es u.a. zu Lymphknoten-, Leber-, und Milzvergrößerung. Eine akute Leukämie liegt nach Definition vor, wenn die Blastenpopulation mehr als 25% der Gesamtzellzahl des KM ausmacht. Die Lumbalpunktion dient dem Ausschluss eines Befalls des zentralen Nervensystems (ZNS) mit Blasten, der sich bei Diagnosestellung bei etwa drei Prozent der Kinder und Jugendlichen findet. Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen gehören rheumatische Erkrankungen, Infektionen z.B mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) oder anderen Erregern, nichtmaligne hämatopoetische Erkrankungen oder Knochenmarkinfiltrationen durch andere maligne Erkrankungen wie dem Neuroblastom oder das Non-Hodgkin-Lymphom (Koletzko 2007, Pui et al. 2008).

1.6 Ätiologie der akuten lymphoblastischen Leukämie

Die genaue Pathogenese, die zur Entstehung einer ALL führt, ist bis heute nicht geklärt. Die

Beteiligung genetischer Faktoren gilt als gesichert, so sind primär genetische Syndrome wie das Down-Syndrom, Bloom's-Syndrom, Ataxia-teleangiectasia und das Nijmegen-breakage-Syndrom mit einem höheren Erkrankungsrisiko einer Leukämie assoziiert. Des Weiteren wird eine familiäre Häufung der Leukämien beobachtet, die auf eine zugrundeliegende Keimbahnmutation schließen lässt. Zwischen eineiigen Zwillingen besteht eine hohe Konkordanzrate der Leukämie (Macmahon et al. 1964). Henze et al. (2004) führen dies jedoch auf einen intrauterinen Blutaustausch und damit auf eine Verteilung der Blasten zwischen den beiden Zwillingen zurück. Als exogene Faktoren für eine erworbene Genmutation ist neben der chronischen Exposition kanzerogener Chemikalien die ionisierende Strahlung hervorzuheben. So haben Kaatsch et al. (2008) in der Veröffentlichung der KiKK-Studie zwar keine generelle Verbindung zwischen alltäglicher ionisierender Strahlenbelastung von Kindern und einem erhöhten Leukämierisiko gefunden, konnten jedoch nachweisen, dass innerhalb eines fünf Kilometerradius um ein Kernkraftwerk bei unter fünfjährigen Patienten mit einer signifikant erhöhten Odds Ratio (OR) von 2,19 gegenüber der Restregion eine höhere Erkrankungsrate an Leukämie bestand. Beobachtungen des Erkrankungsgipfels zwischen zwei und fünf Jahren und die ansteigende Prävalenz der ALL im Zusammenhang mit der Industrialisierung und der modernen Überflussgesellschaft haben zwei parallele Hypothesen zur Rolle der Infektion hervorgebracht. Kinlens Populations-Mischungs-Hypothese geht davon aus, dass durch eine Migrationsbewegung von der Stadt aufs Land die Kinder in ländlichen Regionen einen höheren Kontakt zu Infektionserregern haben. Greaves verspätete Infektionshypothese betrachtet die Leukämie als überschießende Reaktion des Immunsystems auf einen Infektionserreger, durch eine Isolation im Säuglingsalter, die zu einer nicht ausreichenden Differenzierung des Immunsystems geführt hat (Kinlen 1997; Greaves 2006).

1.7 Klassifikation der akuten lymphoblastischen Leukämie

1.7.1 Klassifikation anhand der Morphologie

Nach der FAB (*French-American-British*)-Klassifikation von 1976 werden drei Formen der ALL anhand der Morphologie unterschieden (Bennett et al. 1976; Lilleyman et al. 1986).

L1- Morphologie: kleine Zellen, homogenes Bild, schmaler Zytoplasmasaum, regelmäßiger Kern, meist ohne Nukleoli

- L2- Morphologie: große Zellen, heterogenes Bild, mittelbreiter Zytoplasmasaum, unregelmäßiger, häufig gespaltener Kern mit großen Nukleoli
- L3- Morphologie: große Zellen, homogenes Bild, stark basophiles Zytoplasma mit Vakuolen, regelmäßige ovale Kerne mit deutlichen Nukleoli; entspricht der reifen B-ALL (Burkitt-Leukämie)

1.7.2 Klassifikation anhand der Immunphänotypisierung

Eine leukämische Transformation und klonale Expansion kann in den verschiedenen Reifestadien der Lymphozytendifferenzierung stattfinden. Die immunphänotypische Klassifizierung wird dadurch ermöglicht, dass die leukämische Zelle in jedem Stadium der normalen Reifungssequenz entsprechend bestimmte Oberflächenantigene exprimiert. Da nur wenige der Antigene der Lymphozytendifferenzierung zelllinienspezifisch sind, erfolgt die Immunphänotypisierung anhand eines bestimmten Verteilungsmusters von zellreihenassoziierten und reifungsspezifischen Antigenen, die mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern in einer Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Pui et al. 1993). Es leiten sich etwa 87% aller lymphoblastischen Leukämien aus B-Vorläufer-Zellen oder reifen B-Zellen ab, ca. 13% sind der T-Zellreihe zuzuordnen. Die Unterscheidung zwischen akuten lymphoblastischen und nicht lymphoblastischen Leukämien und die Einteilung zur zugehörigen Zellreihe ist für die eindeutige Zuordnung einer Leukämie und Wahl der Therapie notwendig und damit entscheidend wichtig für die Prognose (Bene et al. 1995). Die EGIL (*European Group for the Immunological Characterisation of Leukemias*)-Klassifikation ordnet dabei die ALL-Subtypen verschiedenen Stadien der normalen lymphozytären Reifung zu.

1.7.3 Klassifikation anhand zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen

Durch eine ständige Weiterentwicklung molekulargenetischer Untersuchungsmethoden, z.B. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Southern-Blot Analyse, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können heute genetische Veränderungen sehr viel spezifischer und sensitiver aufgedeckt werden, als durch eine zytogenetische Analyse, die grobe strukturelle Veränderungen wie Deletionen, Translokationen und Insertionen detektiert (Teitell et al. 2009). Die Identifizierung und Analyse von Gensequenzen, deren Proteinprodukte an der malignen Transformation und Proliferation beteiligt sind und eine Veränderung der Genregulation, Genfunktion

und Genexpression zur Folge haben, sowie die Beschreibung und Analyse von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die in die Leukämogenese involviert sind, hat wesentlich zum Verständnis der Pathogenese und zur Verbesserung der Therapiestrategien beigetragen (Rabbitts 1994, Sawyers 1997). Klonale Chromosomenanomalien werden in einem Großteil der kindlichen ALL nachgewiesen, etwa die Hälfte dieser Anomalien sind Translokationen, die mit der Entstehung von Fusionsgenen und der Produktion pathologischer Proteine einhergehen. Oft kodieren diese Gene für Transkriptionsfaktoren (Pui et al. 2001). Bei ca. einem Viertel aller ALLs liegt eine Hyperdiploidie mit mehr als 50 Chromosomen vor, diese Gruppe besitzt eine gute Heilungsrate. Die am häufigsten auftretende Translokation ist mit etwa 20% $t(12;21)$, das Fusionsgen *ETV6/RUNX1* kodiert für einen veränderten Transkriptionsfaktor (Pui et al. 2011). Es wird vermutet, dass der Verlust der normalen Funktion mit der Pathogenese der Leukämie zusammenhängt. Studien haben gezeigt, dass dieses Rearrangement bereits in utero besteht. Es wird angenommen, dass die Leukämie durch weitere Mutationen in der frühen Kindheit in den rearrangierten Zellen entsteht (Loh et al. 2002). 11q23 Translokationen und *MLL*-Genarrangements werden in bis zu fünf Prozent der Fälle nachgewiesen. Diese Genrearrangements betreffen das *MLL*-Gen, das für ein DNA-bindendes-Protein kodiert, welches eine regulatorische Wirkung in Zelldifferenzierungsprozessen hat. Die häufigsten 11q23 Anomalien der kindlichen ALL sind die $t(4;11)(q21;q23)$ und die $t(11;19)(q23;p13.3)$. Die Inzidenz für die *MLL/AF4* beträgt im Säuglingsalter etwa 50%. Sie geht mit einer Hyperleukozytose, häufigen extramedullären Manifestationen, einer L1- oder L2-Morphologie, einer CD10-Negativität und einer Koexpression myeloischer Marker einher. Daher wird sie auch als „*mixed lineage leukemia*“ bezeichnet. Insgesamt ist die Prognose dieser Patienten schlechter, daher dient das Vorliegen dieser Translokation in Studien als Stratifizierungsparameter. Die Translokation $t(1;19)$, die zu einem *E2A/PBX1*-Genrearrangement führt, hat eine Gesamtinzidenz von ca. 5%. *E2A* und *PBX1* kodieren für Transkriptionsfaktoren von verschiedenen Genen, durch die Mutation kommt es zu einer transkriptionellen Dysregulation. Das sogenannte Philadelphia-Chromosom (Ph) entsteht durch die Translokation $t(9;22)(q34;q11)$. Die Fusion des *BCR*-Gens mit der von *ABL1* kodierten Tyrosinkinase bewirkt eine Aktivierung letzterer, sie geht mit einer deutlich schlechteren Prognose einher. Imatinib ist ein spezifischer Hemmstoff der *ABL1*-Tyrosinkinase und stoppt so die Vermehrung der mutierten Zellen und wird in der Ph-positiven Leukämiebehandlung angewendet. Patienten, bei denen eine Hyperdiploidie mit mehr als 50 Chromosomen vorliegt, zeigen seltener strukturelle zytogenetische Anomalien und sind meist mit günstigen Prognosefaktoren vergesellschaftet. Ein Vorliegen von weniger als 46 Chromosomen ist mit einer deutlich ungünstigeren Prognose verbunden (Henze 2004, Vrooman et al. 2009).

1.8 Erfassung der minimalen Resterkrankung

Die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) hat zunehmend an Bedeutung für die risikoadaptierte Therapie der ALL im Rahmen von klinischen Studien gewonnen. Unter der MRD versteht man submikroskopisch persistierende Zellen, die auch nach morphologischer Komplettremission noch vorhanden sind. Durch Durchflusszytometrie und bestimmte PCR-Techniken können submikroskopische Level von bis zu 10^{-6} Tumorzellen/untersuchte Zellen identifiziert werden. Dies ermöglicht zum einen eine verbesserte Beurteilung der Therapieeffizienz und eine frühe Diagnose eines drohenden Rezidivs, zum anderen hat die MRD eine prognostische Signifikanz (van Dongen et al. 1998). Die Höhe der MRD vor einer Stammzelltransplantation (SZT) ist limitierend für deren Erfolg (Bader et al. 2002).

1.9 Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie

In Deutschland erfolgt die Behandlung der ALL in einer von zwei multizentrischen Therapiestudien, der ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster)-Studie und der CoALL-Studie (*Cooperative Study Group for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*). Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten wurden alle nach den Therapieprotokollen der ALL-BFM Studie behandelt. Die Behandlung der ALL erfolgt durch eine Risikostratifizierung der Therapie anhand der Wahrscheinlichkeit für den Patienten einen Rückfall zu erleiden. Zu den Risikofaktoren, die bei der Diagnosestellung bekannt sind, zählen Alter, Leukozytenzahl sowie spezifische Chromosomenveränderungen. Ebenso stellt das initiale Ansprechen auf die Therapie, das mittels MRD-Diagnostik bestimmt wird, einen der wichtigsten prognostischen Faktoren dar. In einer retrospektiven Analyse von Gaynon et al. (1997) von 15 Therapiestudien mit 10.000 Patienten erwies sich das initiale Therapieansprechen als wichtigster unabhängiger Prognosefaktor, als Marker diente hier die *Prednison-Response* (PR). Ein schlechtes Ansprechen geht mit einer ungünstigen Langzeitprognose einher (siehe Tabelle 1(Tab 1)) (Reiter et al. 1994). Seit 1970 haben die ALL-BFM Studien zu einer kontinuierlichen Verbesserung der Prognose geführt und werden heute in modifizierter Form in vielen Ländern eingesetzt. Bei einer hohen Zahl von Leukämiezellen liegen häufig Subklone vor, die sich durch eine geringe Therapiesensitivität und Vielfachresistenz auszeichnen. Diese wenigen Zellen beginnen dann erneut zu proliferieren und sind für das Auftreten eines Rezidives verantwortlich. Daher ist ein Ziel der Therapie auch diese Subklone durch intensive Behandlung zu eliminieren und

zu verhindern, dass sie durch ungenügend wirksame Therapie entstehen. Die T-ALL weist aufgrund einer schlechteren Therapiesensitivität eine ungünstigere Prognose auf. Die Behandlungsergebnisse sind für Jungen schlechter als für Mädchen. Begründet werden könnte dies unter anderem damit, dass testikuläre Rezidive nach KM- und ZNS-Rezidiven an dritter Stelle stehen und ovarielle Rezidive dagegen sehr selten sind (Henze 2004). Durch die intensivierte Behandlung liegt die Heilungsrate der ALL im Kindesalter mittlerweile bei über 80%. Die zweijährige Chemotherapie ist in verschiedene Phasen unterteilt.

- Induktionstherapie: Ziel ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR) mit Suppression der Blastenpopulation komplett unter die mikroskopische Nachweisgrenze im KM und Abwesenheit eines Lokalbefalls sowie Wiederherstellung der normalen Hämatopoese. 95% der Patienten erreichen so eine CR (Henze et al. 1994). Die Therapie soll nicht zu toxisch für die normalen Knochenmarkstammzellen sein, um die Gefahr einer Blutung und Infektion möglichst gering zu halten. Nach ALL-BFM Protokollen ist eine siebentägige Monotherapie mit Prednison sowie eine intrathekale Dosis Methotrexat am ersten Behandlungstag vorgesehen.
- Konsolidierungs- oder Intensivierungstherapie: Es soll eine weitere Reduktion der leukämischen Blasten besonders in Extrakompartimenten wie Hoden und ZNS erreicht werden. Zum einen wird dafür die Induktionstherapie mit geringen Modifikationen durchgeführt (Reinduktion) zum anderen werden intermittierende Zyklen synergistischer, nicht kreuzresistenter Zytostatikakombinationen angewendet, um der Entwicklung von Resistenzen vorzubeugen.
- ZNS-gerichtete Therapie: Behandlung von Leukämiezellen im ZNS. Ohne Mitbehandlung des ZNS würden laut Studien 50% der Patienten ein Rezidiv erleiden (Pui 2006, Pui et al. 2008*) Therapieansätze sind hierbei zum einen die Schädelbestrahlung, zum anderen die intrathekale Chemotherapie (Pui et al. 2008).
- Reintensivierungstherapie: Zu einem späteren Zeitpunkt wird die Induktionstherapie auf ähnliche Weise wiederholt.
- Dauer- oder Erhaltungstherapie: Da meistens nach diesen vorhergegangenen Behandlungsprotokollen noch Leukämiezellen vorhanden sind, die zu Rezidiven führen können, schließt sich eine langandauernde remissionserhaltende Dauertherapie an. Die Dosis wird dabei der Leukozytenzahl angepasst (Schrappe et al. 2000).

Tab 1: Prognostische Faktoren und Häufigkeit ihres Auftretens*

Faktor	günstige prognostische Faktoren und Häufigkeit (%)	ungünstige prognostische Faktoren und Häufigkeit (%)
Alter bei Diagnose (Jahre)	≥1 und <10 (77%)	<1 (3%) oder ≥10 (20%)
Geschlecht	weiblich (45%)	männlich (55%)
Leukozytenzahl bei Diagnose	<50000/μL Blut (80%)	≥50000/μL Blut (20%)
Immunphänotyp	CD10-positive Vorläufer-B-Zell-ALL (83%)	CD10-negative Vorläufer-B-Zell-ALL (4%) Vorläufer-T-Zell-ALL (13%)
Genetische Merkmale ^a	Hyperdiploidie (20%) <i>ETV6/RUNX1</i> -Positivität (20%)	Hypodiploidie (1%) <i>BCR/ABL1</i> -Positivität (2%) <i>MLL/AF4</i> -Positivität (2%)
PR ^b	<1000 Blasten/μL Blut (90%)	≥1000 Blasten/μL Blut (10%)
MRD ^c	<10 ⁻⁴ Blasten im KM nach ca. fünf Wochen Induktionstherapie (40%)	≥10 ⁻³ Blasten im KM nach ca. 12 Wochen Induktions- und Konsolidierungstherapie (10%)

*nach Stanulla und Bourquin 2012; ^aHyperdiploidie=Vorliegen von mehr als 50 Chromosomen oder DNA-Index=1,16 (Verhältnis DNA-Gehalt leukämischer G0/G1-Zellen gegenüber normalen diploiden Lymphozyten), Hypodiploidie=<45 Chromosomen; ^bPR=*prednisone response*, nach sieben Tagen Induktionstherapie mit täglichen Prednisongaben und einer einzelnen intrathekalen Methotrexatgabe am ersten Behandlungstag; ^cMRD=*minimal residual disease*, analysiert mittels molekulargenetischer Techniken und Durchflusszytometrie, Marker benötigen mindestens Sensitivität von 10⁻⁴.

1.10 Stammzelltransplantation bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie

1.10.1 Indikationen zur Stammzelltransplantation

Unter der allogenen SZT versteht man die Übertragung des Organs KM mit hämatopoetischen Stammzellen zwischen zwei genetisch unterschiedlichen Individuen. Es erfolgt darauf die Wiederbesiedlung des KM durch alle drei myeloischen Zelllinien und die Ausbildung eines funktionstüchtigen Immunsystems. Bei der autologen SZT, bei der das Material vom Empfänger selbst stammt, dient die Stammzellgabe dem Wiederaufbau des Knochenmarks

nach einer hochdosierten Chemotherapie. Für ca. 10% der Patienten mit einer ALL in erster kompletter Remission (CR1) kommt nach ALL-BFM Studienprotokollen eine SZT in Frage. Bei dieser Subgruppe der Patienten mit hohem Risiko (HR-Gruppe) liegt eine Prognose für ein EFS (ereignisfreies Überleben, *event free survival*) <50% vor, wie es z.B. bei entsprechenden MRD-Befunden der Fall ist. Für diese Patienten sind eine HLA (humanes Leukozytenantigen)-idente Geschwisterspender-SZT (MSD) und eine HLA-idente (Fremd)-spender-SZT (MD) vorgesehen. Bei Patienten mit einer sehr schlechten Prognose (EFS 20-30%) ist auch die haploidente Transplantation (MMD) indiziert (siehe auch Tab 2). Für Kinder, die ein sehr frühes isoliertes oder kombiniertes Knochenmarkrezidiv erleiden oder mit Knochenmarkrezidiven einer T-ALL, stellt die SZT die Therapieoption mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für ein Ausbleiben eines Folgerezidivs dar (Henze et al. 1989).

1.10.2 Eigenschaften von Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die über eine unbefristete Periode teilungsfähig sind. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können eine Vermehrung von hochspezialisierten Zellen generieren, die grundlegend verschiedene proliferative Eigenschaften haben und in den verschiedensten Geweben Funktionen ausüben. Diese hohe Plastizität der hämatopoetischen Stammzellen ermöglicht den Wiederaufbau eines funktionsfähigen Knochenmarks. Die Differenzierung der Stammzelle wird über Adhäsionsmoleküle und Liganden, über Chemo- und Zytokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren und über Umgebungsbedingungen und genetische Programmierung gesteuert und beeinflusst (Apperley et al. 2004). Als Stammzellquellen können KM, peripheres Blut nach Gabe eines Wachstumsfaktors, der die Ausschüttung von Stammzellen aus dem Knochenmark und die Regeneration von myeloischen Zellen beschleunigt sowie Stammzellen aus Nabelschnurblut, das dem Plazentarestblut entspricht, dienen (Ljungman et al. 2006). Der Begriff SZT wird im Folgenden zusammengefasst für die Transplantation von KM, Stammzellen aus peripherem Blut oder Plazentarestblut verwendet. Nach der Transplantation trägt der Empfänger die genetischen Merkmale des Spenders. Man spricht von einem chimären Organismus, d.h. ein vollständiger Chimärismus besteht dann, wenn die Hämatopoese komplett durch Spenderzellen übernommen wurde. Die Chimärismusanalyse dient dazu, eine Aussage über die Funktionsfähigkeit des Knochenmarks zu treffen und Rezidive frühzeitig zu erkennen.

1.10.3 Prognose nach Stammzelltransplantation

Das EFS nach vier Jahren bei Patienten mit Vorliegen des Ph-Chromosoms der ALL-BFM 90 und 95 -Studie betrug 77% in der MD-SZT-Gruppe und 24% in der Patienten-Gruppe, die ohne eine SZT behandelt wurde. In der Untergruppe mit einer T-ALL und schlechtem Prednison-Ansprechen (*prednisone poor response*, PPR) ergab sich ein signifikanter Vorteil für Patienten mit einer MD-SZT (Schrappe et al. 2008). Kinder mit einem frühem KM-Rezidiv hatten mit der konventionellen Chemotherapie eine schlechtere Prognose. 90% erreichten eine komplette zweite Remission (CR2), entwickelten dann aber häufig pharmakologische Resistenzen, die zu einer Progression der Krankheit führten. Die MD-SZT heilte mehr als 50% der Patienten nach einem Versagen der ersten Chemotherapie. Das EFS von Patienten mit einer MD-SZT, die auf ein frühes Knochenmarkrezidiv folgte, war signifikant höher im Vergleich zu Patienten, die eine Chemotherapie erhielten (33% zu 16%) (Uderzo et al. 1995 AIEOP). 2005 führten die BFM- und AIEOP (Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica) -Studiengruppen zusammen eine randomisierte Studie an Kindern der HR-Gruppe durch und verglichen das Therapieergebnis nach Chemotherapie mit einer MD-SZT in CR1. Die Transplantation verbesserte das Ergebnis in allen Subgruppen, einschließlich der Patienten mit Versagen der Induktionstherapie (Erkrankungsfreies Überleben, DFS) in fünf Jahren (56,0% zu 26,5%) und bei Patienten mit PPR und T-Zell-Phänotyp und/oder einer Hyperleukozytose (62,4% zu 54,3%) (Balduzzi et al. 2005; Bhojwani et al. 2009).

1.10.4 Bedeutung des HLA-Systems

Das HLA-System dient der Erkennung von körpereigenen und -fremden Antigenen durch die Präsentation von Peptiden durch T-Lymphozyten. Es hat damit eine Schlüsselrolle in der T-Zell-vermittelten erworbenen Immunabwehr inne (Klein et al. 2002). Das *HLA*-Gencluster ist auf dem kurzen Arm von Chromosom sechs lokalisiert. Es lässt sich in Klasse-I-Gene: (A, B, C) und Klasse-II-Gene (DR, DQ, DP) unterteilen. Das HLA-System besitzt die höchste Polymorphie des menschlichen Genoms, momentan sind über 2.500 Allele bekannt. Diese Zahl wächst stetig an (Marsh et al. 2011). Nur eineiige Zwillinge und Klone sind in ihren HLA-Merkmalen identisch. Die Unterschiede zwischen den HLAs von Spender und Empfänger beeinflussen das Versagen und Überleben des Transplantats (Petersdorf 1998, Morishima 2002). So korreliert die Anzahl der Abweichungen der HLA-Genorte von Spender und Empfänger einer SZT mit dem Auftreten einer aGvHD (Petersdorf 2003).

Tab 2: Indikationen für eine SZT in den Studien ALL-BFM-2000 und CoALL

Indikationen		MD/MSD	MMD
NR Tag 33		+	+
PPR	+ T-ALL + pro-B-ALL + Leukozyten ≥ 100000 ($10^3/\mu\text{l}$) + t(9;22) + t(4;11)	(+) + + + +	+ +
PGR	+ t(9;22) + t(4;11)	+ +	
HR	+ M3-Mark an Tag 15	+	
MRD-Niveau	an Tag 1 von Protokoll M = 10^{-3} an Tag 1 von Protokoll M > Tag 33 Protokoll I und Tag 1 Protokoll M $\geq 10^{-3}$ an Tag 1 von Protokoll M > 10^{-3}	+ + +	+ +

MD=matched (related) donor: HLA-identer (verwandter) freiwilliger Spender, über die Suche im zentralen Knochenmarkstransplantationsregister. Über solche länderspezifische Dateien wird für 75% der Patienten innerhalb von drei Monaten ein passender Spender gefunden (www.dkms.de). MSD=matched sibling donor: HLA-identer Geschwisterspender; MMD=mismatched donor, weicht in HLA Genotypen ab. NR=non-response, PPR=prednisone poor responder, PGR=prednisone good responder, HR=high risk, M3-Mark= $\geq 25\%$ Blasten im KM, MRD=minimal residual disease.

1.10.5 Toxizität der Stammzelltransplantation

Vor Durchführung der Transplantation wird eine Konditionierungsbehandlung vorgenommen, um die Hämatopoese des Transplantatempfängers zu zerstören, eine Knochenmarksaplasie herbeizuführen und um eine Immunsuppression des Empfängers zu erreichen. Die Toxizität dieser Behandlung ist dosislimitierend. Die hochdosierte Chemo- und Radiotherapie betrifft alle Gewebe und Organe, dies hat Früh- und Späteffekte und Komplikationen für den Patienten zur Folge. Komplikationen nach SZT sind häufig Infektionen, bedingt durch die starke Immunsuppression in den ersten Monaten nach der Transplantation. In der Aplasie und Regenerationsphase besteht die Infektionsgefahr besonders durch Bakterien und Pilze, diese Gefahr nimmt mit Erholung der Myelopoese ab. Dagegen treten auch in dem Zeitraum danach für den Patienten gefährliche Virusinfektionen auf, daher ist eine regelmäßige engmaschige PCR-Diagnostik notwendig, um diese frühzeitig zu erkennen und eine antivirale Therapie einzuleiten, da besonders persistierende Viren, wie das Cytomegalievirus (CMV) den Transplantationserfolg gefährden (Einsele et al. 2001). Außerdem treten als klinische Symptome Erbrechen, Krämpfe, Schmerzen und eine Schleimhautbeteiligung in Form einer Mukositis auf.

Spätfolgen einer Stammzelltransplantation betreffen sowohl das endokrine System als auch andere Organsysteme, die durch eine chronische *graft-versus-host-disease* (cGvHD) befallen sind (Ratanatharatom et al. 2001)(siehe auch 1.11.3). Durch die Konditionierungsbehandlung kann es durch die Bestrahlung der Linse zu der Ausbildung eines Katarakts und durch die Behandlung mit Busulfan zu Infertilität kommen. Außerdem besteht die Gefahr des Auftretens einer malignen Zweiterkrankung (Bhatia et al. 1987). In der vorliegenden Arbeit wurden das Auftreten einer GvHD und eines Rezidives als Endpunkte und Parameter für die Risikoabschätzung gewählt, daher wird im Folgenden nur näher auf diese Punkte eingegangen.

1.10.6 Einzelnukleotidpolymorphismen und ihr Einfluss auf das Therapieergebnis

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms hat unzählige Einzelnukleotidpolymorphismen (*Single-nucleotide-polymorphisms*, SNPs) zu Tage gebracht. Sie legen einen individuellen Phänotyp fest. Das Erbgut von Spender und Empfänger einer SZT hat einen großen Einfluss auf das Therapieergebnis (Dickinson et al. 2001). So sind zum Beispiel Zytokin-Gen-Polymorphismen (CGPs) zu nennen. Dies sind Polymorphismen, die in den 5´oder 3´regulatorischen Sequenzen von Genen, die für Zytokine kodieren auftreten. Sie können die Struktur von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der Promotorregion verändern und beeinflussen so die Menge der Zytokinproduktion, die auf allogenetische Stimulation oder Infektionen folgt (Cullup et al. 2005). Genetische Variation der Östrogen- und Vitamin-D-Rezeptoren (VDR), die zur Steroidhormonrezeptor-Genfamilie gehören, wurden mit Autoimmunerkrankungen und Immunsyffunktionen assoziiert. Polymorphismen in der VDR-Intron-8-Region (Middelton 2002) und Intron-1-Region des Östrogenrezeptors- α (ER- α) sind mit dem Auftreten einer GvHD, Infektionen post Transplantation und der Überlebenswahrscheinlichkeit nach einer allogenen SZT assoziiert worden (Middelton 2003). Die Genotypen des Spenders und Empfängers in Genen, die für die Wirtsantwort auf Mikroorganismen kodieren, wie Myeloperoxidase, MBL oder dem Fc γ -Rezeptor sind assoziiert worden mit Infektionen nach SZT (Apperly et al. 2004). Die Rolle der SNPs in der Beeinflussung des Therapieergebnisses nach allogener SZT ist Gegenstand intensiver Forschung und auch Inhalt der hier vorliegenden Arbeit.

1.11 Akute Graft-versus-Host-Reaktion

Die akute Graft-versus-Host-Reaktion (aGvHD) tritt in 30-80% der Fälle in Abhängigkeit von Risikofaktoren in den ersten 100 Tagen nach einer allogenen SZT auf. Sie kann bei bis zu 50% der Patienten einen fatalen Verlauf annehmen. Die aGvHD wird durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (IL1, IL6, IL8, TNF α) induziert. Die aGvHD kann auch bei einer perfekten HLA-identen Geschwistertransplantation auftreten. Sie entsteht durch Interaktionen zwischen Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers und heranreifenden T-Zellen des Spenders, die entweder im Transplantat enthalten waren oder sich von Spenderstammzellen ableiten (Hill et al. 2000). Reddy et al. (2003) beschreiben den Verlauf der aGvHD in drei Phasen. Bei der ersten Phase handelt es sich um den Effekt der Konditionierungstherapie. Es werden Spender-T-Zellen in einen Organismus infundiert, der durch die Leukämie, Infektion und eine Hochdosistherapie vorgeschädigt ist. So ist durch die Konditionierung vor allem die Darmmukosa geschädigt und es gelangen unter anderem LPS der Bakterien aus dem Darmlumen in den Blutkreislauf. Dadurch wird die Sekretion der inflammatorischen Zytokinen TNF α und IL1 aus Makrophagen des Transplantatempfängers stimuliert. Diese Zytokine erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen und MHC-Antigenen auf dem Empfängerewebe, dies wiederum verstärkt die Erkennung der MHC- und Minor-Histokompatibilitäts-Antigene (mHAgs) durch die reifen Spender-T-Zellen. Darauf erfolgt die Spender-T-Zell-Aktivierung in Phase zwei. Sie ist durch die Proliferation von T-Helferzellen (TH1-Zellen) in Anwesenheit von IL12 und die Sekretion von IL2 und IFN γ bestimmt. In der zellulären und inflammatorischen Effektorphase kommt es durch die weitere Induktion der T-Zell-Expansion durch IL2 und IFN γ und die Verstärkung der zytotoxischen T-Zell- (CTL) und NK-Zell-Antworten zu einer vermehrten Rekrutierung von Effektorzellen in die Zielorgane. Es werden monokläre Phagozyten aktiviert, die CTL- und NK-Zellen schädigen das Gewebe durch die Freisetzung von Perforin/Granzym, Fas-Ligand (FasL) und TNF α . Dieser in Phase drei ablaufende „Zytokinsturm“ führt zur Gewebszerstörung durch Zielzellapoptose im Transplantatempfänger (Hill et al. 2000).

Die aGvHD wird in Grad I-IV nach Schwere der Ausbreitung auf Haut, Darm oder Leber eingeteilt (siehe Tab 3). Durch die Kombination der einzelnen Stadien und Schweregrade erhält man den Grad der Gesamt-GvHD. Grad I geht mit einer günstigen, Grad IV mit einer lebensbedrohlichen Prognose einher. Der wichtigste Prognosefaktor der aGvHD ist das Ansprechen auf eine Steroidbehandlung. Die Einteilung erfolgt nach dem Meeting Report der Consensus Conference on aGvHD Grading 1994 (Przepiorka et al.1994). Diese Einteilung berücksichtigt jedoch nicht die Krankheitskinetik.

Tab 3: Einteilung der Stadien und Grade der aGvHD^a

Stadium	Haut	Leber	Darm
1	Makulopapulöses Exanthem (<25% KÖF)	Bilirubin 2-3 mg/dl	Diarrhöen 500-1000 ml/d
2	Makulopapulöses Exanthem (>25% KÖF)	Bilirubin 3-6 mg/dl	Diarrhöen 1000-1500 ml/d
3	Erythrodermie	Bilirubin 6-15mg/dl	Diarrhöen ≥1500ml/d
4	toxische Epidermolyse	Bilirubin ≥15mg/dl	Schmerzen oder Ileus
Grad	Haut	Leber	Darm
I	Stadium 1-2	0-1	0-1
II	Stadium 1-3	1-2	1-2
III	Stadium 2-3	2-3	2-3
IV	Stadium 2-4	2-4	2-4

^anach Glucksberg et al. 2004; Rowings et al. 1997; Thomas et al. 1975. aGvHD=akute Graft-versus-Host-Reaktion, KÖF=Körperoberfläche

1.11.1 Bedeutung der Minor-Histokompatibilitäts-Antigene

Eine GvHD, die nach einer MD-SZT auftritt, wird durch T-Zellen initiiert, die mHAGs erkennen. Hierbei handelt es sich um Peptide, die von polymorphen zellulären Proteinen abstammen. Sie werden über HLA-I oder HLA-II Moleküle präsentiert. Es besteht eine niedrige Polymorphie, für jeden Phänotyp sind meist nur zwei Allele bekannt (Goulmy et al. 1996). Die mHAGs werden durch alloreaktive T-Zellen erkannt und verursachen eine GvH- oder eine GvL-(*graft-versus-leukemia*) Reaktion. Einige mHAGs sind spezifisch für das hämatopoetische System, wobei andere ubiquitär in Geweben exprimiert werden. So löst dieses definierte Expressionsprofil bestimmter mHAGs in Zellen der Haut, Leber und des Darms eine GvHD aus. Durch die Expression auf hämatopoetischen Zellen dagegen eine GvL, da so auch maligne Zellen des Empfängers erkannt und zerstört werden. Durch eine Spenderlymphozytentransfusion nach einer SZT mit Lymphozyten, die zuvor durch Transkriptionsprodukte von mHAG-prozessierten Peptiden stimuliert wurden, könnte eine GvL Reaktion ohne die Ausbildung einer GvHD erreicht werden. Durch die Schaffung einer tumorspezifischen Immunantwort könnte die Spezifität und Effektivität der zellulären Immuntherapie verbessert werden (Marijt et al. 2003, Klein et al. 2002). Männliche Patienten mit einem Transplantat von einer weiblichen Spenderin haben ein niedrigeres Risiko für ein Rezidiv, da einige mHAGs nur vom Y-Chromosom kodiert werden. Mit einem Mismatch zwischen Spender- und Empfänger-mHAGs steigt jedoch die Inzidenz einer GvHD klinisch signifikant an (Falkenburg et al. 2003).

1.11.2 Risikofaktoren für das Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion

Risikofaktoren, die für das Auftreten einer GvHD prädisponieren, sind auf Empfängerseite das Alter, die Art und Toxizität der Konditionierung, die medikamentöse Prophylaxe der GvHD, der CMV-Status und die Gefahr einer Infektion sowie die genetische Prädisposition, z.B. Genpolymorphismen für Zytokine. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen in Genen, die an der Entstehung einer GvHD beteiligt sind (z.B. IL10, TNF α) mit einem veränderten Risiko für eine GvHD einhergehen könnten (Cavet et al. 1999, Lin et al. 2003, Cullup et al. 2005). Genauso können Polymorphismen in Genen von Enzymen, Transportern und in anderen Molekülen, die an der Verstoffwechslung von Medikamenten beteiligt sind, die zur Prophylaxe oder Behandlung gegeben werden, die Auftretenswahrscheinlichkeit einer GvHD beeinflussen (Rocha et al. 2009, Gruhn et al. 2009). Des Weiteren ist die HLA-Kompatibilität und die geschlechtergleiche Transplantation entscheidend. Auch die Quelle der Stammzellen ist von Bedeutung. So ist die Inzidenz einer aGvHD bei der Gabe von Stammzellen aus peripherem Blut geringer, bei der Gabe von Stammzellen, die aus Knochenmark oder Nabelschnurblut gewonnen wurden, dagegen höher. Auch das Engraftment der Stammzellen aus peripherem Blut erfolgt schneller, eine Erklärung hierfür ist noch nicht gefunden (Apperly et al. 2004). Bei einem HLA-Mismatch kann die Spender-gegen-Empfänger NK-Zell-Aktivität den Patienten vor einer GvHD schützen und den GvL-Effekt verstärken. In diesem Fall spricht man von einem "perfect mismatch". Dieses wird beobachtet, wenn keine Übereinstimmung zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Oberflächenrezeptoren der NK-Zellen (KIR) der Spender NK-Zellen und der KIR-Liganden besteht. Hauptsächlich sind KIR-Liganden HLA-Moleküle der hämatopoetischen Zellen des Empfängers, einschließlich Leukozyten, Antigen-präsentierende-Zellen (APCs) und T-Zellen (Ruggeri et al. 2002). Wenn keine KIR-HLA-Interaktion zustande kommt, d.h. die Zellen des Empfängers nicht in der Lage sind, die passenden KIR-Liganden zu bilden, werden diese Zellen als körperfremd identifiziert und die daraus resultierende NK-Zell-Aktivität führt zum Zelluntergang (Farag et al. 2002).

1.11.3 Die chronische Graft-versus-Host-Reaktion

Der größte Risikofaktor für das Auftreten einer cGvHD, die nach der Definition später als 100 Tage nach der Transplantation auftritt, ist eine vorrausgegangene aGvHD. Eine cGvHD ist ein wichtiger Faktor für das Langzeittherapieergebnis. Es wird eine Ähnlichkeit zwischen den Merkmalen einer cGvHD und schweren Autoimmunerkrankungen beobachtet. In 80% der

Fälle ist die Haut befallen, in 70% liegt eine Beteiligung der Schleimhäute vor. Die cGvHD wurde 1980 von Shulman et al. in eine begrenzte und eine ausgedehnte Form eingeteilt. Diese Einteilung entspricht jedoch nicht mehr den aktuellen Erscheinungsbildern, dies resultiert aus der Möglichkeit einer früheren Diagnose und einer effektiveren Therapie durch eine Immunsuppression.

1.12 Das Engraftment

Als Engraftment oder Ansiedlung des KM-Transplantats, wird der Zeitpunkt beschrieben, ab dem die Spenderstammzellen eine funktionierende Hämatopoese aufgebaut haben und ausreichend Zellen (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) gebildet werden, sodass der Patient ohne die Gabe von Zellkonzentraten auskommt. Normalerweise ist dies 14-28 Tagen nach Transplantation der Fall. Diese Zeitspanne lässt sich durch die Gabe von *Granulocyte-colony-stimulating-factor* (G-CSF), *Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor* (GM-CSF) und Erythropoetin (Epo) verkürzen. Ein funktionsfähiges Knochenmark besteht ab einer Konzentration von >500 Leukozyten/ μ l Blut und >20.000 Thrombozyten/ μ l Blut und wenn die letzte Substitution länger als drei Tage zurückliegt. Stammzellen aus peripherem Blut verfügen über ein schnelleres Engraftment als Knochenmarksstammzellen. Die Mechanismen, die zur Mobilisation und Zielsuche der Stammzellen führen, sind noch nicht komplett verstanden (Apperly 2004).

1.13 Rezidivdiagnostik

Zur Bestätigung eines Rezidives wird nach Möglichkeit eine MRD-Diagnostik durchgeführt, um zu überprüfen, ob die initial ermittelten klonspezifischen Marker oder Fusionsgene wieder vorhanden sind und ob eine klonale Expansion vorliegt. Im Vordergrund steht jedoch die zytomorphologische Rezidivdefinition, ein negativer MRD-Befund schließt ein Rezidiv nicht aus (siehe Tab 4).

Tab 4: Kriterien für ein ALL-Rezidiv^a

Isoliertes KM-Rezidiv	≥ 25% Lymphoblasten im KM
Isoliertes ZNS-Rezidiv	> 5/μl Zellen im Liquor + morphologisch eindeutig indentifizierbare Lymphoblasten bei intrakranieller Raumforderung im CCT/NMR ohne Blasten im Liquor, Blut oder KM ist zur Diagnose eine bioptische Sicherung erforderlich
Isoliertes Hodenrezidiv	uni- oder bilaterale schmerzlose Hodenschwellung zur Diagnose ist die bioptische Sicherung erforderlich
Isolierte Infiltrate anderer Lokalisation	bioptische Sicherung erforderlich
Kombinierte Rezidive	simultaner Befall von zwei oder mehr Lokalisationen KM gilt als mitbefallen, wenn es mehr als >5% Lymphoblasten aufweist

^anach ALL-BFM Kriterien, CCT=craniale Computertomographie, NMR=nuclear magnetic resonance

1.14 Einzelnukleotidpolymorphismen in *NLRP*-Genen

IL1β besitzt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer GvHD nach einer HLA-identen-SZT und nimmt daher entscheidend Einfluss auf das klinische Therapieergebnis. Genetische Variation in Genen, die für das Inflammasom und damit für die Aktivierung der IL1β-Signalkaskade kodieren, könnte damit für die Entstehung von Komplikationen nach Transplantation prädisponieren, bzw. einen Schutzfaktor darstellen (Dickinson 2007).

Granel et al. haben 2008 in einer Studie die Beziehung zwischen interindividueller Variation in Spender- und Empfänger-Genen, die für das Inflammasom kodieren, und dem Therapieergebnis nach allogener SZT untersucht. Dafür wurden 14 SNPs bei 133 Spender-Empfänger Pärchen analysiert. Die SNPs wurden nach folgenden Kriterien anhand der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* ausgewählt:

- Lokalisation in der Promotor Region
- oder Lokalisation in einer Genregion die zu einem Aminosäureaustausch führt
- eine Allelhäufigkeit des weniger frequenten Allels von mehr als 10% in der weißen Bevölkerung

Es wurde eine starke Assoziation zwischen folgenden Genvarianten und verschiedenen transplantationsassoziierten Endpunkten nachgewiesen:

Spender-Genotypen der SNPs rs1043673 und rs1043684 (Allel G/G) im *NLRP2*-Gen waren mit therapiebedingter Mortalität (*non relapse mortality*, NRM) und dem Gesamtüberleben

(*overall survival*, OS) assoziiert. Spender-Genotypen von SNPs rs10925027 (Allel T/T) und rs10754558 im *NLRP3*-Gen mit einem Krankheitsrezidiv. Der Empfänger-Genotyp A/A des in der 3' untranslatierten Region (UTR) des *NLRP1*-Gens lokalisierten SNPs rs5862 konnte mit NRM als auch OS assoziiert werden. In der univariaten Analyse der gewonnenen Daten wurde detektiert, dass Varianten im *NLRP2*-Gen die Entstehung einer schweren aGVHD begünstigen. Die vorliegende Studie analysiert eine Auswahl vorbeschriebener SNPs innerhalb eines Patientenkollektivs von Kindern mit ALL, die sich im Rahmen der Behandlung ihrer Grunderkrankung einer SZT unterzogen haben (siehe Tab 5).

Tab 5: In der Literatur beschriebene *NLRP*-Genotypen*

Gene	NCBI Code	Nukleotide	Lokalisation	AS-Austausch
NLRP1	rs925598	C/T	UTR5'	-
	rs1156989	C/T	UTR5'	-
	rs12150220	A/T	Exon 3	His-155-Leu
	rs2301582	A/G	Exon 11	Met-1029-Val
	rs5862 ^a	A/G	UTR3'	-
NLRP2	rs1043673 ^a	A/C	Exon 13	Glu-1052-Ala
	rs1043684 ^a	A/G	UTR3'	-
NLRP3	rs10925027 ^a	C/T	UTR5'	-
	rs10754558 ^a	C/G	UTR3'	-
	rs10802501	A/T	UTR3'	-
CARD8	rs11665831	C/T	UTR5'	-
	rs4802445	C/T	UTR3'	-
CASP5	rs477163	C/T	UTR5'	-
	rs523104	C/G	Exon 6	Leu-318-Val

*Granell et al. 2008. ^ain der hier vorliegenden Studie analysiert, UTR=untranslated Region, AS=Aminosäuren

1.15 Fragestellung

Allgemeines Ziel dieser Dissertation war es, zu untersuchen, in wie weit in der Literatur als transplantationsrelevant vorbeschriebene SNPs der Gene *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* einen Einfluss auf klinische Endpunkte - hier GvHD und Rezidiv - besitzen. Spezifische Aufgabenstellungen bzw. Fragen waren:

- Zusammenstellung und Charakterisierung einer Patientenkohorte von Kindern mit einer ALL, die sich einer SZT unterzogen, mit Verfügbarkeit von klinischen Daten und DNA-Material von Spender und Empfänger der SZT, sowie die Genotypisierung dieser Kohorte für vormalig in der Literatur beschriebene Gene mit Einfluss auf das klinische Therapieergebnis.
- Sind die als im Rahmen einer SZT klinisch relevant vorbeschriebenen Genotypen der Gene *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* des Transplantatempfängers assoziiert mit dem Auftreten einer GvHD und/oder eines Rezidivs bei pädiatrischen ALL-Patienten, die unter Einschluss einer allogenen SZT behandelt wurden.
- Sind die als im Rahmen einer SZT klinisch relevant vorbeschriebenen Genotypen der Gene *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* des Transplantatspenders assoziiert mit dem Auftreten einer GvHD und/oder eines Rezidivs bei pädiatrischen ALL-Patienten, die unter Einschluss einer allogenen SZT behandelt wurden.
- Analyse der Bedeutung von Empfänger-Spender-Diskordanzen der als im Rahmen einer SZT klinisch relevant vorbeschriebenen Genotypen der Gene *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* für im Rahmen einer SZT bei pädiatrischen ALL-Patienten aufgetretenen GvHD und/oder Rezidiven.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientendaten und Therapieschemata

2.1.1 Patientendaten

Die in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen Patienten nahmen alle an der multizentrischen ALL-SCT-BFM 2003-Studie teil und wurden zwischen Januar 2004 und Dezember 2009 stammzelltransplantiert. Vor der Aufnahme in das Studienprogramm wurden alle Patienten bzw. deren Sorgeberechtigten sorgfältig über das Therapieprogramm und die Studienmodalitäten und darüber, dass verbleibendes Untersuchungsmaterial im Rahmen der Studie für weitergehende Forschung mit dem Ziel der Verbesserung der Heilungsaussichten verwendet wird, aufgeklärt und gaben hierzu ihre schriftliche Einverständniserklärung.

2.1.2 Struktur der ALL-BFM 2000-Studie

Die Studienzentrale der Therapieoptimierungsstudie ALL-BFM 2000 befindet sich in der Abteilung Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Dorthin werden KM und periphere Blutausstriche von jeder neu diagnostizierten ALL und Verlaufskontrollen aus allen teilnehmenden Kliniken der Studie gesendet. Aufgenommen in die Studie ALL-BFM 2000 werden alle Patienten mit ALL (Ausnahme B-ALL), die die folgenden Kriterien erfüllen:

- Lebensalter bei Diagnosestellung bis einschließlich 18 Jahre, d.h. vor dem 19. Geburtstag. Säuglinge werden in der Dateninfrastruktur der Studie mitgeführt, aber nach einem gesonderten Therapieprotokoll INTERFANT 06 behandelt.
- Beginn der Induktionstherapie innerhalb der Laufzeit der Studie.
- Die Diagnose ALL ist gesichert.
- Der Aufnahme des Patienten in die Studie wird von den Sorgeberechtigten und, falls zutreffend, dem einsichtsfähigen Patienten (ab 16. Lebensjahr) zugestimmt.

- Die Aufnahme und Diagnose erfolgte in einer an der Studie teilnehmenden Klinik.
- Eine Schwangerschaft ist ausgeschlossen und Mütter haben abgestillt.

2.1.3 Diagnosestellung nach ALL-BFM Kriterien

Bei dem Vorhandensein von mehr als 25% Blasten anteilig an allen kernhaltigen Zellen im KM oder dem Auftreten von Blasten im peripheren Blut oder Liquor wurde die Diagnose ALL gestellt. Dafür wurden die KM- und Blutaussstriche, bzw. die Liquor-Zytospins mit einer modifizierten Wright-Färbemethode und zytochemischen Reaktionen (PAS-Reaktion, saure Phosphatase, Myeloperoxidase, α -Naphthyl-Acetat-Esterase) angefärbt. Die maßgebliche morphologische Diagnosestellung erfolgte im Referenzlabor der ALL-BFM Studienzentrale in Kiel. Die immunologische Referenzdiagnostik wurde im Labor des Helios-Klinikums Berlin-Buch anhand der Expression der Oberflächenantigene durchgeführt. Die Einteilung in die Subgruppen erfolgte anhand der EGIL-Kriterien (siehe 1.7.2). Wenn mindestens 20% der Leukämiezellen das Oberflächenantigen mit einer Fluoreszenzintensität von über 98% gegenüber den Negativkontrollen exprimierten, wurde der Nachweis als positiv angesehen. Bei den zytoplasmatischen Markern (TdT, zytoplasmatisches IgM und CD3) war eine Expression auf über 10% der leukämischen Zellen für einen positiven Nachweis notwendig. Die zytogenetischen und molekularbiologischen Analysen erfolgten in den entsprechenden Referenzlaboratorien der ALL-BFM Studie (Prof. Siebert, Kiel; Prof. Schlegelberger, Hannover; Prof. Harbott, Gießen; Prof. Haferlach, München).

2.1.4 Stratifizierung in Risikogruppen, Kriterien für die Hochrisikogruppe

Die Definitionen der Risikogruppen sind international nicht einheitlich, da in den verschiedenen Studiengruppen die Prognosefaktoren auf den mit der jeweiligen Therapie erzielten Ergebnissen ermittelt wurden. Daher ist es schwierig, Therapieergebnisse unterschiedlicher Studien zu vergleichen. Die Kontrollen und Nachsorgeuntersuchungen wurden von den behandelnden Kliniken der ALL-BFM Studien durchgeführt und der jeweilige Patientenstatus von der Studienzentrale abgefragt. Kriterien für die Aufnahme in die HR-Gruppe in der ALL-BFM 2000-Studie sind:

- inadäquates Ansprechen auf die 7-tägige Prednison-Vorphase und MTX i.th. an Tag 1 (PPR): ≥ 1000 Leukämiezellen pro μl Blut an Tag 8;
- zytomorphologisch keine komplette Remission an Tag 33 (M2- oder M3-Mark), also Non-Response an Protokolltag 33 (NR d33);

- Nachweis der Translokation t(9;22) bzw. des Fusionsgenes BCR/ABL1;
- Nachweis der Translokation t(4;11) bzw. des Fusionsgenes MLL/AF4;
- MRD an Zeitpunkt 2 (vor Prot. M) positiv $\geq 10^{-3}$ (hohes Niveau an Resterkrankung).

Zusätzlich zu den obligaten Entnahmezeitpunkten vor jedem HR-Block, vor jedem Protokoll II und III und bei Durchführung der SZT sollten Knochenmarkspunktionen bei Patienten der HR-Gruppe zur MRD-Diagnostik neben der üblichen Chimärismusprüfung zu folgenden Zeitpunkten erfolgen:

- vor der Transplantation (bei der Remissionsbeurteilung vor SZT), zusätzlich 5 ml heparinisiertes KM und 5 ml EDTA-Blut vom Spender.
- Tag +30, +60, +100 bzw. nach Beendigung der Immunsuppression.
- 6 Monate und 1 Jahr nach SZT.

2.1.5 ALL-SCT-BFM 2003-Studie und Behandlung der Hochrisikogruppe

2003 initiierten die ALL-BFM und ALL-REZ-BFM Studiengruppen eine multizentrische Behandlungsstudie für Patienten, die für eine Stammzelltransplantation vorgesehen sind, die ALL-SCT-BFM 2003-Studie. Ziel war es, eine Standardisierung der Stammzelltransplantation in teilnehmenden Studienkliniken in Deutschland, Österreich und der Schweiz zu erreichen. Hierzu wurden strikte Regeln aufgestellt um eine Therapieoptimierung anhand einer einheitlichen Behandlung zu ermöglichen. So wurden die HLA-Typisierung, die Spenderauswahl, die Konditionierungstherapie, die GvHD Prophylaxe und Therapie sowie die Standards zur supportiven Behandlung von therapieabhängigen Erkrankungen und der Etablierung eines frühen GvL-Effektes nach definierten Richtlinien durchgeführt. Es soll mithilfe der gewonnenen Daten eine Klärung erfolgen, ob eine MSD- und MD-SZT sich äquivalent auf das Therapieergebnis auswirken und eine Beurteilung der Effektivität der MMD-SZT im Vergleich zur MD/MSD-SZT erfolgen. Des Weiteren soll Aufschluss über die Inzidenzen von aGvHD und cGvHD gefunden werden. Die Therapiemortalität der allogenen SZT beträgt ca. 10 – 20%. Durch eine Standardisierung der Therapie und der nachfolgenden Behandlungen verspricht man sich ein verbessertes Therapieergebnis. Seit 2007 besteht ein internationaler Zweig, die ALL-SCT-BFMi Studie. Dieser Studie haben sich mehrere Stammzelltransplantationzentren aus verschiedenen Nationen angeschlossen. Die in der hier vorliegenden Studie analysierten Patienten wurden jedoch alle in Deutschland behandelt und transplantiert. Ein MSD wird nur in 10-20% der Fälle gefunden, ein MMD ist nach Definition in weniger als 9/10 der HLA-Allele identisch. Bei der passenden Spenderauswahl soll das Alter, das Geschlecht und der CMV-

Serostatus mitbeachtet werden. Eine T-Zell-Depletion wird nur im Fall einer MMD-SZT durchgeführt. Die Konditionierungstherapie bei einer MD-SZT erfolgt mit einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung von 12 Gy und mit der Gabe von Etoposid. Patienten, die für die Bestrahlung zu jung sind, oder bereits eine Dosis erhalten haben, werden mit Busulfan i.v. substituiert. Die MMD-SZT wird mit einer Ganzkörperbestrahlung oder Busulfan plus Fludarabine und Cytarabin als hoch-lymphozytotoxische Medikamentenkombination konditioniert. Die GvHD-Prophylaxe und Therapie wurde in den bisher analysierten Patientenkohorten uneinheitlich geregelt. Im ALL-SCT-BFM-Protokoll wird eine MSD-SZT mit Cyclosporin A, eine MD-SZT mit Cyclosporin A plus Methotrexat und ATG-F behandelt. Bei der MMD-SZT wird eine CD34⁺-Selektion oder eine CD3⁺/CD19⁺-Depletion und keine pharmakologische Immunsuppression vorgenommen. Als supportive Maßnahme ist ein Monitoring des CMV- und EBV-Serostatus über eine PCR-Analyse solange vorgesehen, bis ein suffizientes Immunsystem aufgebaut ist (T-Lymphozyten $\geq 300/\mu\text{l}$ peripheres Blut). Des Weiteren liegen Empfehlungen für das Vorgehen bei einer ansteigenden Virämie und die Dokumentation und Behandlung bei dem Auftreten eines ungünstigen Ereignisses (*serious adverse event*, SAE) vor.

2.2 Patientenauswahl

Die Auswahl der hier genotypisierten Patienten aus den Studienteilnehmern erfolgte durch die Verfügbarkeit von Knochenmarkpunktionmaterial oder aufbereiteten Zellen, die zur MRD-Diagnostik im Studienlabor in Kiel aufbewahrt wurden. Zur Vermeidung von Genotyp-Missklassifizierungen durch genetische Alterationen im Rahmen maligner Transformation wurde nur Zellmaterial verwendet, das morphologisch frei von Leukämiezellen war. Patienten mit präexistenten malignen oder hämatopoetischen Erkrankungen, konstitutionellen chromosomalen Aberrationen, genetischen Syndromen und immunologischen Störungen wurden nicht in das Kollektiv mit aufgenommen. Des Weiteren wurden Patienten ausgeklammert, bei denen es während der Behandlung zu gravierenden Therapieverstößen kam (Therapie nach falschem Therapieprotokoll, Therapieabbruch und andere signifikante Protokollverletzungen), um eine Vergleichbarkeit vom Einfluss des Genotyps auf das Therapieergebnis zu gewährleisten. Bei den Proben vom Zeitpunkt nach SZT wurde darauf geachtet, eine Zellprobe von einem Zeitpunkt zu verwenden, an dem ein vollständiger Spenderzellen-Chimärismus vorlag, um eindeutig den Genotyp des Spenders zu identifizieren.

2.3 Analyse der Einzelnukleotidpolymorphismen

2.3.1 Isolierung der DNA

Materialien:

QIAamp DNA Blood Midi Kit; Qiagen, (Hilden, Deutschland)

darin enthalten: QIAamp Midi Spin Säulen
 Collection tubes (15 ml)
 AL Puffer
 Waschpuffer AW1 und AW2
 AE Puffer
 QIAGEN Protease

Tris EDTA Puffer pH 8 (TE Puffer); Fluka, (München, Deutschland)

Phosphatpuffer (PBS)

Ethanol; J.T. Baker, (Deventer, Niederlande)

Sarstedt Röhrchen (15 ml)

Eppendorfgefäße zur Lagerung des DNA Eluats

Zentrifugen: Sigma 4K15; Eppendorf Centrifuge 5415D

Durchführung:

Um eine Verschleppung des Patientenmaterials und das Risiko einer Kontamination zu verringern wurde unter einem sterilen Abzug gearbeitet, Latexhandschuhe getragen und häufig gewechselt sowie die Unterlage mit Zellstoff abgedeckt und autoklavierte Pipettenspitzen mit eingebauten Filtern verwendet. Außerdem wurden die DNA-Aufbereitung, die Herstellung des PCR-Ansatzes und die Durchführung der PCR räumlich von einander getrennt vorgenommen. Alle Röhrchen wurden sorgfältig beschriftet und mit den Laborbuchnummern der jeweiligen Probe abgeglichen um ein Vertauschen der Proben zu verhindern. Zur Gewinnung der DNA wurde das QIAamp DNA Blood Midi Kit von Qiagen verwendet und folgende Schritte durchgeführt:

Die in flüssigen Stickstoff (ca. -190°C) eingelagerten Zellen aus Knochenmarkpunktaten wurden langsam bei Raumtemperatur angetaut und in 15ml Sarstedtröhrchen gegeben, die vorher jeweils mit 2,4ml AL Puffer befüllt wurden. Jedes Materialröhrchen wurde mit ca. 1ml Phosphatpuffer nachgespült um alles Zellmaterial daraus zu lösen. Zu jeder Probe wurden dann 200µl Proteinase-K zur Zelllyse dazugegeben und diese anschließend 30 Sekunden

gevoertext. Die Proben wurden danach zur Inkubation und Initiierung des Proteinverdaus für mindestens zehn Minuten ins Wasserbad bei 68-70°C gestellt. Nach Zugabe von 2ml Ethanol erfolgte das Pipettieren der Probe auf das Filtersystem. Durch wiederholtes Zentrifugieren und der Durchführung mehrerer Waschschriffe mit verschiedenen Waschpuffern (AW1 und AW2 Puffer) wurde die DNA in der Filtermatrix der Säule angereichert und vom restlichen zellulären Material befreit. Je nach Zellkonzentration des gelagerten Knochenmarkpunktats wurde eine bestimmte Menge Elutionspuffer hinzugefügt, um die gereinigte DNA aus dem Filter zu lösen. Nach Bestimmung des Volumens wurde das Eluat in Eppendorfgefäßen bei 4°C gelagert. Die Messung der Reinheit und Konzentration der DNA erfolgte photometrisch am NanoDrop ND 1000. Im Anschluss daran wurde jede Probe auf eine einheitliche Arbeitskonzentration von 50ng pro µl in einem Volumen von 100µl verdünnt.

2.3.2 Genotypisierung der Einzelnukleotidpolymorphismen

Zunächst wurde eine Amplifizierung der Genabschnitte der Gene *NLRP1*, *NLRP2*, *NLRP3* mittels PCR vorgenommen, anschließend erfolgte die Genotypisierung.

Materialien:

Type it® Fast SNP Probe PCR, 2x Mastermix; Applied Biosystems, (Foster City, CA.)

darin enthalten: Hot Star Taq® Plus DNA Polymerase (isoliert aus *Thermus aquaticus*, kloniert in *Escherichia coli*)
Type it® Fast SNP PCR Puffer
dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; jeweils 10mM)
ROX als passiver Referenzfarbstoff
Q-Solution, optional für schwierige Loci (*von uns nicht verwendet*)
RNase freies Wasser

Tris-EDTA Puffer pH 8 (TE Puffer); Fluka

TaqMan® SNP Genotyping Assays 40x; Applied Biosystems (Foster City, CA.)

Fast 96-Well Reaction Plate; MicroAmp®

Real-time PCR Instrument ABI 7900 HT; Applied Biosystems (Foster City, CA.)

Software SDS 2.3.

Durchführung:

Der Vorteil der Verwendung des Type it® Fast SNP Probe PCR, 2x Mastermix von Applied Biosystems ist, dass Amplifikation und Nachweis des PCR-Produkts gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Zunächst wurden die Assays von Applied Biosystems

ausgehend von der Lieferkonzentration von 40-fach auf eine Arbeitskonzentration von 20-fach mithilfe von TE-Puffer verdünnt. Anschließend wurde folgender Reaktionsansatz für jeweils eine DNA-Probe hergestellt und auf die Fast 96-Well Reaction Platte von MicroAmp® pipettiert:

Mastermix	5 µl
Assay 20fach	0,5 µl
RNase freies Wasser	2,5 µl
DNA Probe	2 µl

Gesamtvolumen pro Reaktion: 10 µl

Auf jeder Platte wurden jeweils zwei Wells als Kontrollwert (NTC Wert) mit 2µl Wasser statt DNA befüllt. TaqMan Sonden sind sequenzspezifische Oligonukleotide, die am 5'-Ende kovalent mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff verknüpft sind, standardmäßig sind dies FAM und VIC® für die beiden Allele:

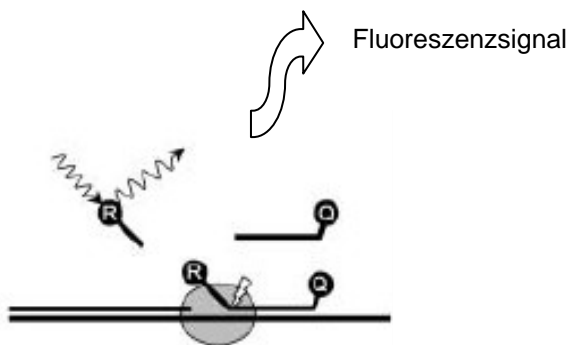
Fluoreszenzsignal	Bedeutung
VIC® Farbstoff	Homozygot für Allel 1
FAM Farbstoff	Homozygot für Allel 2
Fluoreszenzsignale für beide Farbstoffe	Heterozygot für Allel 1 und Allel 2

Am 3'-Ende ist diesem Reporterfarbstoff ein Quencher Farbstoff gegenübergestellt, in unserem Fall NFQ. Zusätzlich ist das 3'-OH Ende der Sonde phosphoryliert, so wird die Extension des 3'-Endes während der PCR blockiert. Ziel der Allel-Typisierung über TaqMan ist es, dass nur die korrekt angelagerte Sonde hydrolysiert wird und die für das andere Allel passende Sonde noch vor Beginn der 5'-3' Exonuklease Aktivität der Taq-DNA-Polymerase verdrängt wird. Bei intakten TaqMan Sonden wird die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) durch den Quencher unterdrückt. Während der PCR lagern sich die PCR-Primer an die Zielsequenz. Die fluorogenen TaqMan-Sonden, jeweils spezifisch für eines der möglichen Allele (z.B. C oder T), binden in dem Bereich zwischen den Primern. In der Extensionsphase verlängert die Taq DNA Polymerase die Primer, wenn das Enzym die TaqMan-Sonde erreicht, führt seine 5'-3' Exonuklease Aktivität dazu, dass die Sonde an ihrem 5'-Ende hydrolysiert wird. Daraus resultiert eine räumliche Trennung von Fluorophore und Quencher und somit ein Fluoreszenzsignal (siehe Abb 2).

Die freie, nicht hybridisierte Sonde wird nicht hydrolysiert. Das vom Real-time PCR-Instrument ABI 7900 HT detektierte Reportersignal steigt mit jedem freien Reportermolekül an, d.h. mit jedem PCR-Amplifikationszyklus. Ist keine passende Zielsequenz zur Anlagerung der

Sonde vorhanden, bleibt diese intakt und es entsteht kein Fluoreszenzsignal (Lee et al. 1993).

Abb 2: Prinzip der Detektion mit einer TaqMan-Sonde*



*Der gekennzeichnete Bereich (grauer Kreis) symbolisiert die hydrolytische Auftrennung der Sonde durch die TaqDNA-Polymerase. Erklärung: R: Reporter; Q: Quencher; nach Wilhelm und Pingoud, 2003.

Als passiven Referenzfarbstoff enthält der Mastermix ROX, dieser kompensiert in der Fluoreszenzmessung Variationen, die nicht durch die PCR bedingt sind. Das Real-time PCR-Instrument ABI 7900 HT von Applied Biosystems wurde folgendermaßen programmiert:

	Temperatur	Zeit
Initiale Aktivierung der HotStarTaq Plus Polymerase	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	15 s
Annealing/Extension	60°C	30 s
Anzahl der Zyklen	40 Zyklen im Standard Mode	

(Quelle: PCR Protokoll nach dem Type it® Fast SNP Probe PCR Handbuch)

Die möglichen Allele der untersuchten SNPs der in dieser Arbeit bearbeiteten Gene sind in folgender Übersicht aufgeführt. Die in der Zeile zuerst aufgeführte Base wurde mit einer VIC®gekoppelten Sonde detektiert und das Allel mit der an zweiter Stelle stehenden Base mit einer FAM gekoppelten Sonde.

NCBI:SNP	Kontextsequenz
rs1043673	GATACTGAGAAACATCATCCCTGGG[A/C]AGAAAGGCCTTCTTCTCATGACTTC
rs10925027	TCTAACTGTAATGAGTGGAAATTTCA[C/T]CTTTGATAGGATAGGAGATTGAAAA
rs1043684	CTGCCTCTGTTTTATACCTGCACAC[A/G]TCCTTATCTTTGTTACATATGAAAT
rs5862	GTCTTAAGATGACAAAATCCCTAGGG[A/G]TCAGGTGGTTTTCCCGCACGAACTC
rs10754558	GACAATGACAGCATCGGGTGTGT[C/G]TCATCACAGCGCCTCAGTTAGAGGA

Nach der Amplifikation der DNA wurden die Platten im Allelic-Discrimination-Modus mithilfe der SDS 2.3.-Software am Real-time-PCR-Instrument ABI 7900 HT ausgelesen. Im Folgen-

den sind exemplarisch zwei Screenshots der Fluoreszenzauswertung (Abb 3 und Abb 4) abgebildet. Jeder Punkt im Diagramm entspricht einer DNA-Probe, an der Y-Achse ist blau das eine, an der X-Achse rot das andere Allel aufgetragen, die heterozygoten Proben befinden sich als grüne Punkte dazwischen. Unten links sind als schwarze Quadrate die beiden Kontrollwerte (NTC Werte) abgebildet. Nicht genotypisierte DNA-Proben sind als schwarze Kreuze dargestellt. Die so vorgenommene Allel-Typisierung der Einzelnukleotidpolymorphismen lässt sich als Excel-Datei exportieren und steht so weiteren Analysen zur Verfügung.

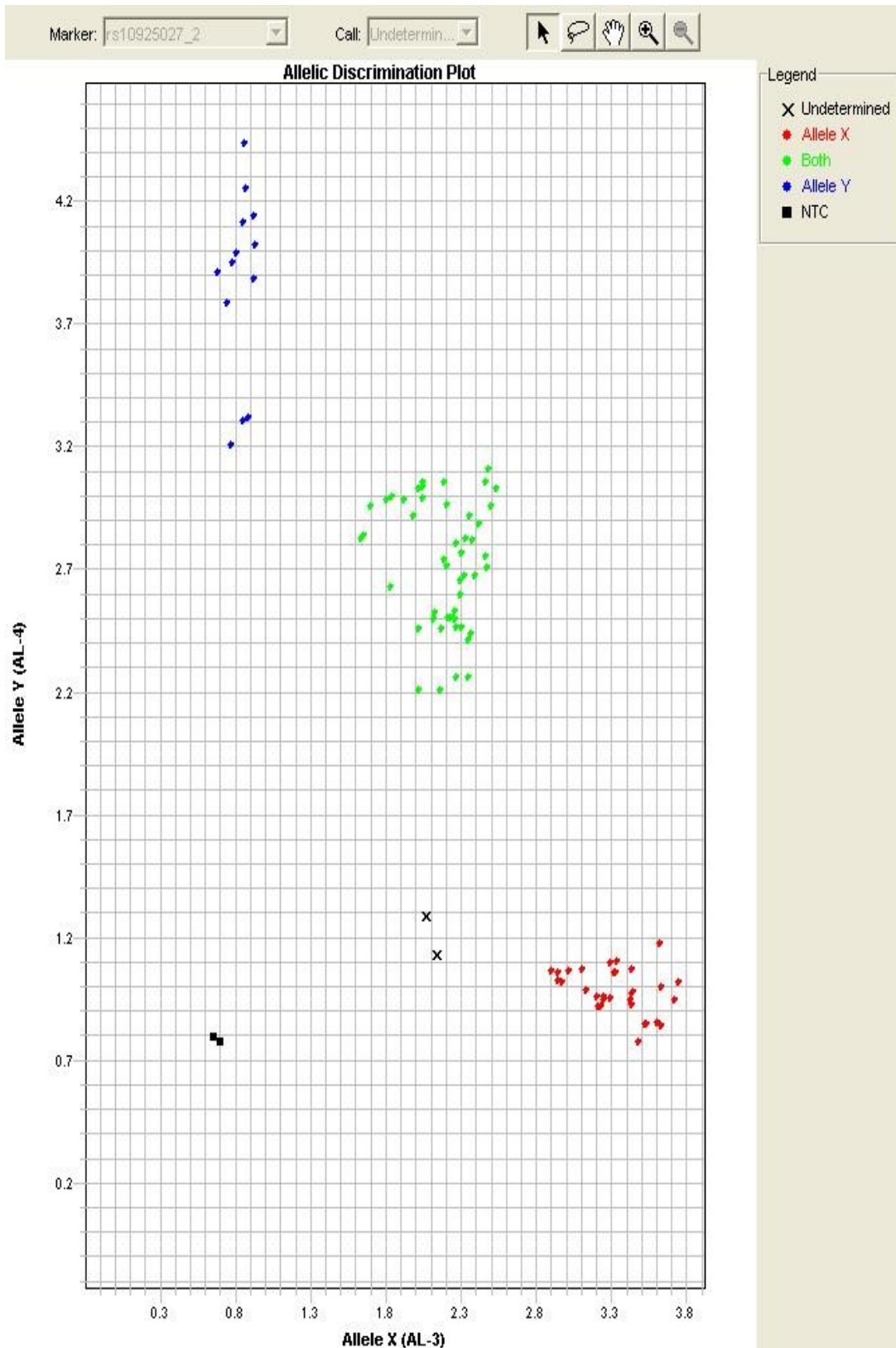


Abb 3: Alleltypisierung von rs 10925027, DNA-Proben vor Stammzelltransplantation

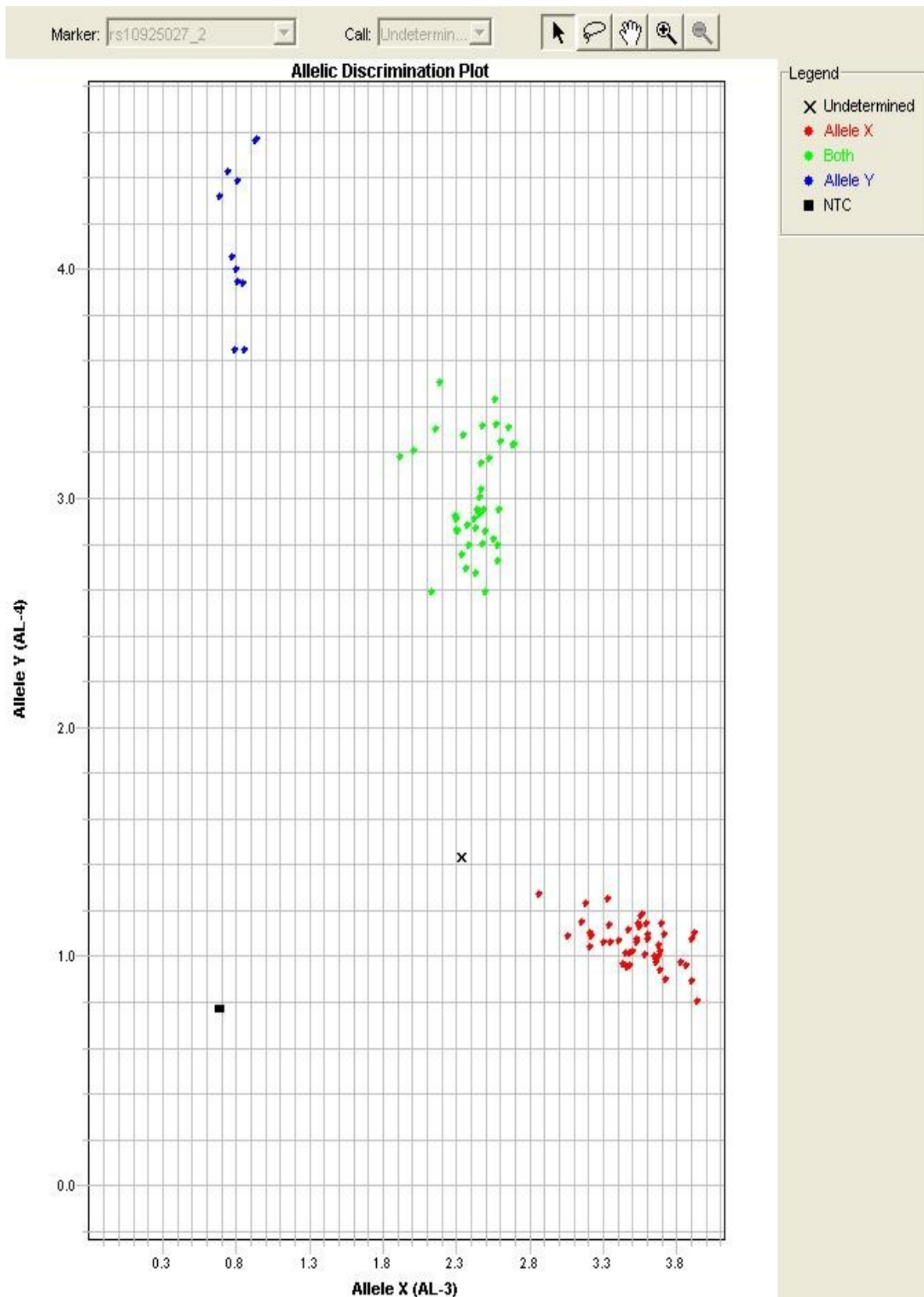


Abb 4: Alleltypisierung von rs 10925027, DNA-Proben nach Stammzelltransplantation

2.4 Statistische Auswertung

Die im Labor erhobenen Ergebnisse der Genotypisierung wurden zur statistischen Auswertung sowohl untereinander als auch mit demographischen und klinischen Parametern korreliert. Verwendete Variablen waren z.B. das Geschlecht, das Alter bei Diagnosestellung, initiale Leukozytenzahl, Immunphänotyp, ZNS-Status, das Vorhandensein von Translokationen, PR, Remission und MRD nach Induktions- sowie nach Konsolidierungstherapie, Zugehörigkeit zur jeweiligen Risikogruppe und das Vorhandensein eines Rezidivs vor SZT. Außerdem wurden die SZT-assoziierten Merkmale der Patienten erfasst. Hierzu gehörten u.a. die geschlechtliche Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger, die Übereinstimmung der HLA-Merkmale, das Vorliegen einer kompletten Remission zum Zeitpunkt der SZT, Anzahl der Rezidive vor SZT, Stammzellquelle, das Vorliegen einer GvHD, der Grad der GvHD, das Vorhandensein eines Transplantatversagens (*graft failure*), die Gründe hierfür sowie die Häufigkeit eines Rezidives nach SZT.

Zur Entscheidung ob ein genetisches Merkmal einen Risikofaktor darstellt wurden übliche statistische Verfahren angewandt. Es wurde untersucht, ob Unterschiede zweier Stichproben durch zufallsbedingte Streuung (Nullhypothese, H_0) erklärbar waren oder ein Effekt (Alternativhypothese, H_1) vorlag. Mit Hilfe des Chi-Quadrattests bzw. des exakten Tests nach Fisher wurde die jeweilige Testgröße aus den Beobachtungsdaten errechnet und der zugehörige p-Wert ermittelt. Der p-Wert gibt die bedingte Wahrscheinlichkeit für das Zustandekommens des beobachteten oder eines noch unwahrscheinlicheren Ergebnisses an, wenn die Nullhypothese wahr ist. Der p-Wert ist also die Wahrscheinlichkeit mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese ablehnt. Ist diese Wahrscheinlichkeit kleiner als das zuvor vereinbarte Signifikanzniveau α , wird die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit ist $\alpha = 0,05$ gesetzt. Zur Testung der Signifikanz auf Unabhängigkeit der untersuchten Variablen in der Kontingenztafel wurde der exakte Test nach Fisher verwendet, dieser hält auch bei wenigen Beobachtungen das Niveau. Zudem wurden OR und Konfidenzintervalle (KI) unter Verwendung der logistischen Regressionsanalysen berechnet. Die OR gibt an, um welchen Faktor das Krankheitsrisiko einer Person steigt, wenn sie einen bestimmten Genotyp trägt. Es stellt also die Krankheits-Odds unter Exponierten die Krankheits-Odds unter Nicht-Exponierten gegenüber. Bei Krankheiten mit niedriger Inzidenzrate wie der ALL, nähert sich die OR dem Relativem Risiko (RR). Die Angabe des KI dient zur Beurteilung der Genauigkeit der OR. Das KI ist der Wertebereich, der mit einer vorgegebenen Vertrauenswahrscheinlichkeit ($1-\alpha$), die OR enthält. Ein großes KI spricht für eine hohe Variabilität der Daten, ist im KI eins eingeschlossen, ist das Ergebnis

nicht signifikant. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% gewählt, daher werden 95% -KI angegeben.

Alle Analysen wurden per Computer unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS-Statistics18 (*Statistical Package for Social Sciences*, Version 18.0.0.7/2009; Chicago, Illinois) durchgeführt. Des Weiteren wurde für jedes Allel das Hardy-Weinberg-Äquilibrium berechnet. Dies beschreibt das Gleichgewicht, das in einer Population entsteht, wenn die durch eine Erkrankung bei Homozygoten (aa) ausscheidenden Allele a durch eine neue Mutation ersetzt werden. Die Allele sind wie in Abb 5 verteilt (Schaaf et al. 2008). Die Anwendung dieser Regel dient dem Ausschluss grober systematische Fehler der Studie.

Abb 5: Hardy-Weinberg-Äquilibrium

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p^2 = Häufigkeit für Homozygote AA

pq = Häufigkeit für Heterozygote Aa

q^2 = Häufigkeit für Homozygote aa

3 ERGEBNISSE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Es konnte eine Patientenkohorte von 143 Kindern mit ALL, die sich einer SZT unterzogen, mit Verfügbarkeit von klinischen Daten zusammengestellt werden. In 80 Fällen war DNA-Material von Empfänger und Spender der SZT verfügbar, in 63 Fällen lag nur DNA-Material vom Zeitpunkt vor SZT, also DNA-Material des Empfängers vor. Für jede Probe wurde die Analyse von fünf in der Literatur als transplantationsrelevant beschriebene SNPs der Gene *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* vorgenommen. Von den insgesamt 1115 DNA-Proben wurden 1102 erfolgreich genotypisiert.
- Es wurde in 143 Fällen DNA-Material des Empfängers in den fünf vorbeschriebenen Genotypen der Gene *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* analysiert und in hinsichtlich eines Auftretens einer GvHD und/oder eines Rezidivs untersucht.
- In 80 Fällen war DNA-Material des Spenders der SZT verfügbar und wurde in den fünf vorbeschriebenen Genotypen der Gene *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* analysiert und auf eine Assoziation mit dem Auftreten einer GvHD und/oder eines Rezidivs untersucht.
- Die Analyse der Bedeutung von Diskordanzen in den vorbeschriebenen Genotypen der Gene *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* von Empfänger und Spender einer SZT für das Auftreten einer GvHD und/oder eines Rezidivs wurde in 80 Fällen, in denen DNA-Material von Spender und Empfänger verfügbar war, durchgeführt.

3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Tab 6 stellt die Verteilung unterschiedlicher Charakteristika des untersuchten Patientenkollektivs von 143 Patienten mit der Diagnose ALL dar, die im Rahmen der ALL SZT-BFM 2003-

Studie stammzelltransplantiert und in dieser vorliegenden Arbeit für Varianten in den Genen *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* genotypisiert wurden. Bei der Geschlechterverteilung zeigte sich eine leichte Knabenwendigkeit (60,8%). Der Großteil des Erkrankungsalters lag oberhalb von zehn Jahren (45,5%). Dies ist dadurch zu erklären, dass diese Patienten häufiger eine schlechte Prognose aufweisen und in die HR-Gruppe stratifiziert und somit auch für eine SZT vorgesehen werden. Bei Diagnosestellung befanden sich 34 Patienten im Kleinkindalter und 37 Patienten im Alter zwischen sechs und zehn Jahren, 4,9% der Betroffenen waren Säuglinge. Ein Nachweis des MLL/AF4-Fusionstranskripts fand sich in elf Fällen (7,7%). Bei 23,1% fand sich das BCR/ABL1-Fusionstranskript, bei keinem Patienten das ETV6/RUNX1-Fusionsprotein, das durch die Translokation t(12;21)(p13;q22) exprimiert wird. Die Leukozytenzahl zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug bei der Mehrheit der Patienten mehr als 20.000/ μ l (29,4% 20.000-100.000/ μ l und 34,4% >100.000/ μ l). Bei 60,8% der Patienten zeigte sich ein ZNS1-Status, dies entspricht einer atraumatischen Punktion ohne Nachweis von leukämischen Blasten nach Zentrifugation. Ein manifester ZNS-Befall mit Nachweis von mehr als fünf Leukozyten/ μ l Liquor und indentifizierbaren Blasten (ZNS3) fand sich bei acht Patienten (5,6%). Bei 21% der Patienten war die Lumbalpunktion traumatisch, etwa bei der Hälfte wurden leukämische Blasten nachgewiesen (9,8%). Der überwiegende Teil der untersuchten Patienten gehörte der HR-Gruppe an (97,2%). 68,5% der Patienten erreichten eine Remission nach der Induktionstherapie, 21,7% jedoch nicht. 4,2% erlitten ein Rezidiv vor SZT. Insgesamt vier Patienten gehörten nicht der HR-Gruppe an, ein Patient war der Standardgruppe und drei der Gruppe mit mittlerem Risiko zugeordnet, sie wurden aufgrund eines schlechten Therapieansprechens stammzelltransplantiert. Charakteristisch für Patienten der HR-Gruppe mit einer ungünstigen Prognose waren der hohe Anteil der Patienten mit inadäquatem Ansprechen auf die Prednisontherapie (46,2% PPR), eine hohe MRD $\geq 10^{-3}$ nach Induktionstherapie in 69,2% der Fälle und eine MRD $\geq 10^{-3}$ nach Konsolidierungstherapie in 62,9% der Fälle.

Tab 6: Initiale Charakteristika des Patientenkollektivs*

	Patienten n (%)
Geschlecht	
männlich	87 (60,8)
weiblich	56 (39,2)

Alter bei Diagnosestellung (Jahre)

<1	7 (4,9)
1-<6	34 (23,8)
6-<10	37 (25,9)
≥10	65 (45,5)
Leukozyten ^a (10 ³ /μl)	
<20	52 (36,4)
20-<100	42 (29,4)
≥100	49 (34,3)
Immunphänotyp	
pro B	16 (11,2)
pre B	83 (58,0)
T	42 (29,4)
nicht bekannt	2 (1,4)
ZNS-Status	
ZNS1	87 (60,8)
ZNS2	5 (3,5)
ZNS3	8 (5,6)
TLP+	14 (9,8)
TLP-	16 (11,2)
nicht bekannt	13 (9,1)
ETV6/RUNX1	
pos.	-
neg.	130 (90,9)
nicht bekannt	13 (9,1)
BCR/ABL1	
pos.	33 (23,1)
neg.	106 (74,1)
nicht bekannt	4 (2,8)
MLL/AF4	
pos.	11 (7,7)
neg.	119 (83,2)
nicht bekannt	13 (9,1)
Prednisone response ^c	
gut	69 (48,3)

schlecht	66 (46,2)
nicht bekannt	8 (5,6)
Remission nach Induktionstherapie	
ja	98 (68,5)
nein	31 (21,7)
nicht bekannt	14 (9,8)
MRD ^d nach Induktionstherapie	
< 10 ⁻³	15 (10,5)
≥ 10 ⁻³	99 (69,2)
nicht bekannt	29 (20,3)
MRD nach Konsolidierungstherapie	
< 10 ⁻³	26 (18,2)
≥ 10 ⁻³	90 (62,9)
nicht bekannt	27 (18,9)
Risikogruppe	
Standard	1 (0,7)
Mittel	3 (2,1)
Hoch	139 (97,2)
Rezidiv vor SZT	
ja	6 (4,2)
nein	137 (95,8)

^a von 143 Patienten mit ALL im Kindesalter, die im Rahmen der ALL SZT-BFM 2003-Studie stammzelltransplantiert wurden und in den Genen *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* genotypisiert wurden. ^aLeukozytenzahl bei Diagnose; ^bZNS-Status bei Diagnosestellung; ZNS-Status wurde wie folgt definiert: ZNS1 (atraumatische Punktion, keine leukämische Blasten im Liquor nach Zentrifugation identifizierbar), ZNS2 (atraumatische Punktion, ≤5 Leukozyten/μL Liquor), ZNS3 (atraumatische Punktion, >5 Leukozyten/μL Liquor, leukämische Blasten identifizierbar), TLP+ (traumatische Lumbalpunktion, leukämische Blasten identifizierbar), und TLP- (TLP, keine leukämischen Blasten identifizierbar). Patienten mit einer zerebralen Raumforderung oder einer Hirnnervenlähmung in Kombination mit identifizierbaren leukämischen Blasten nach Zentrifugation wurden dem ZNS3-Status zugehörig betrachtet (Bürger, B. et al. 2003). ^cgut: <1000/μl leukämische Blasten im Blut an Behandlungstag 8; schlecht: ≥1000/μl leukämische Blasten; ^dMinimale Resterkrankung.

3.2 Stammzelltransplantationassoziierte Charakteristika des Patientenkollektivs

Die Tab 7 bildet mit der SZT assoziierte Charakteristika ab. Es finden sich auch die relevan-

ten Merkmale des Spenderkollektivs. Die Mehrzahl der Spender war männlichen Geschlechts. In 60,8% der Fälle erfolgte die Transplantation zwischen gleichem Geschlecht (*sex-matched*). In 26 Fällen erhielt ein männlicher Empfänger Stammzellen eines weiblichen Spenders und in 28 Fällen ein weiblicher Empfänger Stammzellen eines männlichen Spenders. Am häufigsten wurde eine MD-SZT durchgeführt (61,5%), bei 30,8% der Patienten war ein MSD vorhanden und in elf Fällen wurde eine MMD-SZT vorgenommen (7,7%). Die Häufigkeit der Übereinstimmung von 10/10 in den HLA-Allelen betrug 64,3% und bei einer Übereinstimmung von 9/10 HLA-Allelen 23,8%. Zum Zeitpunkt der Transplantation befanden sich 96,5% der Patienten in kompletter Remission (CR). Sechs Patienten erlitten vor Transplantation ein Rezidiv. In der Mehrzahl der Fälle wurden Stammzellen mit Ursprung aus dem KM transplantiert (68,5%), 29,4% erhielten Stammzellen aus dem peripheren Blut und in drei Fällen (2,1%) wurden Stammzellen aus Nabelschnurblut verwendet. 51,7 % der Patienten erlitten nach Transplantation eine aGvHD, davon 38,5% erst- und zweitgradig und in 4,9% der Fälle dritt- und viertgradig. In zwölf Fällen wurde der Grad der GvHD nicht dokumentiert. In 2,8% der Fälle kam es zu einem kompletten, bei einem Patienten zu einem teilweisen Transplantatversagen. In drei Fällen hiervon fand kein Engraftment statt, in den übrigen zwei Fällen kam es zu einer Abstoßungsreaktion. Diese Fallzahl ist so gering, dass das Engraftment keinen geeigneten Parameter zur Abschätzung des Therapieergebnisses in dieser Untersuchung darstellte und somit nicht mit in die statistische Auswertung einging. Nach Transplantation erlitten 28 der Patienten (19,6%) ein Rezidiv. Das Auftreten einer aGvHD und eines Rezidives wurden in dieser Studie als Endpunkte für das Therapieergebnis gewählt und statistisch mit den beobachteten Genotypen auf einen Zusammenhang getestet. Ein Rezidiv erleiden nach Erreichen der CR bis zu 20% der Kinder mit ALL. Die HR-Gruppe hat mit konventioneller Chemotherapie eine Heilungschance von unter 10%, hierzu gehören u.a. Kinder mit Knochenmarkrezidiv einer T-ALL und mit früheren kombinierten Knochenmarkrezidiven (Pui et al. 1994, Henze et al. 1994).

Tab 7: Stammzelltransplantationassoziierte Charakteristika*

	Patienten n (%)
Geschlecht des Spenders	
männlich	88 (61,5)
weiblich	53 (37,1)
nicht bekannt	2 (1,4)

Empfänger-Spender	
übereinstimmendes Geschlecht	87 (60,8)
männlich/weiblich	26 (18,2)
weiblich/männlich	28 (19,6)
nicht bekannt	2 (1,4)
Spendertyp	
matched sibling donor (MSD)	44 (30,8)
matched donor (MD)	88 (61,5)
mismatched donor (MMD)	11 (7,7)
HLA Übereinstimmung (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) Anzahl von übereinstimmenden Allelen/ Anzahl von geprüften Allelen	
10/10	92 (64,3)
9/10	34 (23,8)
9/9	1 (0,7)
8/10	4 (2,8)
8/8	4 (2,8)
6/10	1 (0,7)
5/10	3 (2,1)
3/8	2 (1,4)
3/6	1 (0,7)
nicht bekannt	1 (0,7)
Komplette Remission bei SZT	
ja	138 (96,5)
nein	4 (2,8)
nicht bekannt	1 (0,7)
Anzahl von Rezidiven vor SZT	
keins	137 (95,8)
1	6 (4,2)
2	-
Stammzellquelle	
Knochenmark	98 (68,5)
peripheres Blut	42(29,4)

Nabelschnurblut	3 (2,1)
GvHD	
keine	69 (48,3)
akute	74 (51,7)
Grad der GvHD	
Grad 0	69 (48,3)
Grad 1	34 (23,8)
Grad 2	21(14,7)
Grad 3	5 (3,5)
Grad 4	2 (1,4)
Ja, aber nicht dokumentiert	12 (8,4)
Transplantatversagen	
nein	138 (96,5)
komplett	4 (2,8)
partiell	1 (0,7)
Gründe für das Transplantatversagen	
kein Engraftment	3 (2,1)
Abstoßungsreaktion	2 (1,4)
Rezidiv nach SZT	
ja	28 (19,6)
nein	115 (80,4)

* von 143 Patienten mit ALL im Kindesalter, die in den Genen *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* genotypisiert wurden. ^aLeukozytenzahl bei Diagnose; ^bZNS-Status bei Diagnosestellung; ZNS-Status wurde wie folgt definiert: ZNS1 (atraumatische Punktion, keine leukämische Blasten im Liquor nach Zentrifugation identifizierbar), ZNS2 (atraumatische Punktion, ≤5 Leukozyten/μL Liquor), ZNS3 (atraumatische Punktion, >5 Leukozyten/μL Liquor, leukämische Blasten identifizierbar), TLP+ (traumatische Lumbalpunktion, leukämische Blasten identifizierbar), und TLP- (TLP, keine leukämischen Blasten identifizierbar). Patienten mit einer zerebralen Raumforderung oder einer Hirnnervenlähmung in Kombination mit identifizierbaren leukämischen Blasten nach Zentrifugation wurden dem ZNS3-Status zugehörig betrachtet (Bürger, B. et al. 2003). ^cgut: <1000/μl leukämische Blasten im Blut an Behandlungstag 8; schlecht: ≥1000/μl leukämische Blasten; ^dMinimale Resterkrankung.

3.3 Anwendung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Die verschiedenen Kollektive zeigten eine Übereinstimmung der Frequenzen der verschiedenen Genotypen mit der Erwartung nach der Hardy-Weinberg-Regel (siehe Abb 5 und Tab 8).

Tab 8: Genetische Konstitution und Allelfrequenzen*

rs5862	Beobachtet			Errechnet		Erwartet nach H.W.	
	AA	AG	GG	p(A)	q(G)	2pq(AG)	q ² (GG)
Empfängerkollektiv	0,254	0,493	0,254	0,504	0,496	0,500	0,246
Spenderkollektiv	0,244	0,547	0,209	0,494	0,506	0,500	0,256
Gesamtkollektiv	0,250	0,513	0,237	0,500	0,500	0,500	0,250

rs1043673	CC	AC	AA	p(C)	q(A)	2pq(AC)	q ² (AA)
Empfängerkollektiv	0,469	0,399	0,133	0,685	0,315	0,432	0,099
Spenderkollektiv	0,360	0,442	0,198	0,600	0,400	0,480	0,160
Gesamtkollektiv	0,428	0,415	0,157	0,654	0,346	0,452	0,120

rs1043684	AA	AG	GG	p(A)	q(G)	2pq(AG)	q ² (GG)
Empfängerkollektiv	0,451	0,423	0,127	0,672	0,328	0,441	0,108
Spenderkollektiv	0,356	0,448	0,195	0,597	0,403	0,481	0,163
Gesamtkollektiv	0,415	0,432	0,153	0,644	0,356	0,458	0,127

rs10925027	CC	CT	TT	p(C)	q(T)	2pq(CT)	q ² (TT)
Empfängerkollektiv	0,329	0,543	0,129	0,574	0,426	0,489	0,182
Spenderkollektiv	0,471	0,402	0,126	0,686	0,314	0,431	0,098
Gesamtkollektiv	0,383	0,489	0,128	0,619	0,381	0,472	0,145

rs10754558	CC	CG	GG	p(C)	q(G)	2pq(CG)	q ² (GG)
Empfängerkollektiv	0,291	0,518	0,191	0,539	0,461	0,497	0,212
Spenderkollektiv	0,216	0,477	0,307	0,465	0,535	0,498	0,286
Gesamtkollektiv	0,262	0,502	0,236	0,512	0,488	0,500	0,238

*Die beobachteten Häufigkeiten der verschiedenen genetischen Konstitutionen sind in den betreffenden Spalten durch das Allel angegeben. Der zunächst errechnete Wert für p(X) ist fett hervorgerufen und diente zur rechnerischen Ermittlung der übrigen Werte (kursiv). Aus der Häufigkeit von homozygoten X-Allel-Individuen (Spalte: X/X) wurde die Allelfrequenz von z.B. C zunächst nach Hardy-Weinberg (siehe Abb 5) berechnet (Spalte: p(X)). Die Allelfrequenz des anderen Allels (Spalte q(X)) wurde dann nach der Formel q=1-p berechnet. Die erwarteten Häufigkeiten der Heterozygoten (Spalte: erwartet 2pq(X/X)) und der Individuen homozygot für das andere Allel (erwartet q²) wurden aus den errechneten Allelfrequenzen ermittelt.

3.4 Genotypen der *NLRP*-Gene von Empfänger und Spender

In Tab 9 ist die Korrelation der in dieser Arbeit untersuchten Genotypen der *NLRP1*-, *NLRP2*- und *NLRP3*-Gene zwischen Spender und Empfänger bei Transplantation dargestellt. So erhielten beispielsweise 23 Patienten, bei denen der Genotyp *A/A* des im Gen *NLRP1* analysierten SNPs rs5862 vorlag, Stammzellen von einem Spender, der in diesem Genort ebenfalls das Allel *A/A* trug. Insgesamt wurde in 40 Fällen in *NLRP1* eine diskordante Transplantation vorgenommen. Die Tabelle zeigt, dass insgesamt eine hohe Variabilität bezüglich Konkordanz und Diskordanz in den Genotypen zwischen Empfänger und Spender zu verzeichnen war. Es fiel auf, dass die beiden in *NLRP2* typisierten SNPs stark miteinander korrelierten. Auf mögliche Fehlerursachen und Erklärungen für diese Auffälligkeit wird in der Diskussion näher eingegangen.

3.5 Genotypen des Empfängers und Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion

Die Tab 10 veranschaulicht Häufigkeiten und Assoziationen zwischen den Genotypen der *NLRP1*-, *NLRP2*- und *NLRP3*-Gene des Empfängers und dem Auftreten einer GvHD nach Transplantation. Hierbei wurde der Wildtyp des jeweiligen Allels als Bezugsgröße verwendet ($OR=1$). Die einzelnen Ergebnisse wurden zusammen mit der OR als Maß für das vom jeweiligen Genotyp bedingte Erkrankungsrisiko dargestellt. Bezüglich der Häufigkeiten in den Kontingenztafeln ließen sich in den Analysen keine signifikant unterschiedlichen Verteilungen zwischen Patienten mit und ohne GvHD feststellen. In den logistischen Regressionsanalysen ergab sich für Patienten mit dem Genotyp *A/G* des *NLRP2*-SNPs rs1043684 ein 2,18-fach erhöhtes Risiko für eine GvHD (95% -KI = 1,07-4,49) gegenüber der Referenzkategorie *A/A*. Patienten mit dem *G/G*-Genotyp zeigten jedoch keine Assoziation mit dem Auftreten einer GvHD. Weitere signifikante Beziehungen zwischen den analysierten Genotypen und dem Auftreten einer GvHD konnten in den Regressionsanalysen nicht errechnet werden. Wie auch bereits oben erwähnt fiel in dieser und den folgenden Tabellen auf, dass die Häufigkeitsverteilung der zwei SNPs rs1043684 und rs1043673 im Gen *NLRP2* meistens übereinstimmt, bzw. nur gering von einander abweicht.

Tab 9: *NLRP*-Genotypen von Spender und Empfänger

Genotyp Spender n		Genotyp Empfänger n														
		<i>NLRP1</i> rs5862			<i>NLRP2</i> rs1043673			<i>NLRP2</i> rs1043684			<i>NLRP3</i> rs10754558			<i>NLRP3</i> rs10925027		
		AA	AG	GG	CC	CA	AA	AA	AG	GG	CC	CG	GG	CC	CT	TT
<i>NLRP1</i> rs5862	AA	23	9	12	16	10	10	16	10	10	9	3	5	18	8	12
	AG	5	8	6	15	6	8	15	5	8	14	12	12	13	7	11
	GG	7	1	8	4	2	8	4	3	8	12	3	9	4	3	3
<i>NLRP2</i> rs1043673	CC	20	20	5	15	18	3	14	19	3	9	6	3	14	21	4
	CA	7	11	1	9	17	3	10	17	2	13	22	3	12	16	3
	AA	3	10	3	6	6	3	6	5	4	8	13	3	4	4	2
<i>NLRP2</i> rs1043684	AA	21	19	4	14	18	3	15	18	3	7	8	2	14	19	5
	AG	7	10	2	10	16	3	9	16	3	14	21	3	12	16	3
	GG	2	11	3	6	6	3	6	6	3	9	11	4	4	5	1
<i>NLRP3</i> rs10754558	CC	14	24	7	13	17	6	12	18	6	6	8	4	14	17	7
	CG	6	8	5	7	16	6	9	14	6	13	18	6	7	19	5
	GG	5	7	3	5	6	3	4	7	3	6	13	5	4	3	3
<i>NLRP3</i> rs10925027	CC	13	27	3	12	19	5	12	19	5	5	9	2	15	19	4
	CT	8	7	4	8	17	3	8	16	3	10	20	7	4	21	4
	TT	3	9	3	4	7	2	4	8	2	9	14	1	5	3	2

Tab 10: Assoziation der *NLRP*-Genotypen des Empfängers mit einer Graft-versus-Host-Reaktion

Genotyp Empfänger		Graft-versus-Host-Reaktion				
		ja n(%)	Nein n(%)	P ^a	OR ^b	95% -KI ^c
<i>NLRP1</i> rs5862	AA	33 (44,6)	38 (55,1)	0,355	1	0,80 – 4,01
	AG	22 (29,7)	14 (20,3)		1,81	
	GG	19 (25,7)	17 (24,6)		1,29	
<i>NLRP2</i> rs1043673	CC	25 (33,8)	32 (46,4)	0,306	1	0,82 – 3,42
	CA	38 (51,4)	29 (42,0)		1,68	
	AA	11 (14,9)	8 (11,6)		1,76	
<i>NLRP2</i> rs1043684	AA	25 (33,8)	35 (50,7)	0,135	1	1,07 – 4,49
	AG	39 (52,7)	25 (36,2)		2,18	
	GG	9 (12,2)	9 (13,0)		1,40	
	nicht typisierbar	1 (2,7)	-			
<i>NLRP3</i> rs10754558	CC	23 (31,3)	18 (26,1)	0,827	1	0,39 – 1,83
	CG	38 (51,4)	35 (50,7)		0,85	
	GG	12 (16,2)	15 (21,7)		0,63	
	nicht typisierbar	1 (1,4)	1 (1,4)			
<i>NLRP3</i> rs10925027	CC	22 (29,7)	25 (36,2)	0,476	1	0,62 – 2,76
	CT	41 (55,4)	35 (50,7)		1,33	
	TT	9 (12,2)	9 (13,0)		1,14	
	nicht typisierbar	2 (1,4)	-			

^aP χ^2 oder exakter Test nach Fisher; ^bOdds Ratio; ^cKonfidenzintervall.

3.6 Genotypen des Empfängers und Auftreten eines Rezidivs

In Tab 11 sind Häufigkeiten und Assoziationen der analysierten SNPs in *NLRP1*-, *NLRP2*- und *NLRP3*-Genen mit dem Auftreten eines Rezidivs dargestellt. Der Tabelle lässt sich entnehmen, dass keiner der hier analysierten Genotypen signifikant mit dem Risiko eines Rezidivauftritts nach SZT assoziiert war.

3.7 Genotypen des Spenders und Auftreten einer Graft-versus-host-Reaktion

Tab 12 beschreibt die Häufigkeiten und Assoziation zwischen den Genotypen der *NLRP1*-, *NLRP2*- und *NLRP3*-Gene des Spenders und dem Auftreten einer GvHD nach Transplantation. Der Tabelle lässt sich entnehmen, dass Patienten mit dem Spendergenotyp G/G des *NLRP1*-SNPs rs5862 signifikant häufiger an einer GvHD erkrankten (OR = 3,75, 95% -KI = 1,05-13,42). Die weiteren Analysen ergaben keine signifikanten Unterschiede bezüglich Häufigkeitsverteilung der analysierten SNPs zwischen Patienten mit GvHD und ohne und auch keine signifikanten Werte bezüglich des GvHD-Risikos für die einzelnen Genotyp-Kategorien.

3.8 Genotypen des Spenders und Auftreten eines Rezidivs

Die Häufigkeiten und Assoziationen zwischen den analysierten SNPs der *NLRP1*-, *NLRP2*- und *NLRP3*-Gene des Spenders und dem Auftreten eines Rezidivs zeigt Tab 13. Der Tabelle lässt sich entnehmen, dass keiner der hier analysierten Genotypen signifikant mit dem Risiko eines Rezidivauftritts nach SZT assoziiert war.

Tab 11: Assoziation der *NLRP*-Genotypen des Empfängers mit einem Rezidiv

Genotyp Empfänger		Rezidiv			
		Ja n(%)	Nein n(%)	P ^a	OR ^b 95% -KI ^c
<i>NLRP1</i>	AA	16 (57,1)	55 (47,8)		1
rs5862	AG	7 (25,0)	29 (25,2)		0,83
	GG	5 (17,9)	31 (27,0)	0,567	0,55 0,19 – 1,67
<i>NLRP2</i>	CC	15 (53,6)	42 (36,5)		1
rs1043673	CA	11 (39,3)	56 (48,7)		0,55
	AA	2 (7,1)	17 (14,8)	0,217	0,33 0,07 – 1,60
<i>NLRP2</i>	AA	15 (53,6)	45 (39,1)		1
rs1043684	AG	11 (39,3)	53 (46,1)		0,62
	GG	2 (7,1)	16 (13,9)	0,491	0,38 0,08 – 1,82
	nicht typisierbar	-	1 (0,9)		
<i>NLRP3</i>	CC	8 (28,6)	33 (28,7)		1
rs10754558	CG	13 (46,4)	60 (52,2)		0,89
	GG	7 (25,0)	20 (17,4)	0,724	1,44 0,45 – 4,59
	nicht typisierbar	-	2 (1,7)		
<i>NLRP3</i>	CC	11 (39,3)	36 (31,3)		1
rs10925027	CT	11 (39,3)	65 (56,5)		0,55
	TT	5 (17,9)	13 (11,3)	0,303	1,26 0,37 – 4,32
	nicht typisierbar	1 (3,6)	1 (0,9)		

^a $P \chi^2$ oder exakter Test nach Fisher; ^b Odds Ratio; ^c Konfidenzintervall.

Tab 12: Assoziation der *NLRP*-Genotypen des Spenders mit einer Graft-versus-Host-Reaktion

Genotyp Spender		Graft-versus-Host-Reaktion				
		Ja n(%)	Nein n(%)	P ^a	OR ^b	95% -KI ^c
<i>NLRP1</i> rs5862	AA	20 (48,8)	25 (64,1)	0,102	1	0,38 – 3,30
	AG	9 (22,0)	10 (25,6)		1,13	
	GG	12 (29,3)	4 (10,3)		3,75	
<i>NLRP2</i> rs1043673	CC	19 (46,3)	17 (43,6)	0,615	1	0,41 – 2,94
	CA	16 (39,0)	13 (33,3)		1,10	
	AA	6 (14,6)	9 (23,1)		0,60	
<i>NLRP2</i> rs1043684	AA	19 (46,3)	17 (43,6)	0,615	1	0,41 – 2,94
	AG	16 (39,0)	13 (33,3)		1,10	
	GG	6 (14,6)	9 (23,1)		0,60	
<i>NLRP3</i> rs10754558	CC	10 (24,4)	8 (20,5)	0,801	1	0,29 – 2,74
	CG	20 (48,8)	18 (46,2)		0,89	
	GG	11 (26,8)	13 (33,3)		0,68	
<i>NLRP3</i> rs10925027	CC	19 (46,3)	20 (51,3)	0,261	1	0,44 – 2,89
	CT	16 (39,0)	15 (38,5)		1,12	
	TT	6 (14,6)	4 (10,3)		1,58	

^a $P \chi^2$ oder exakter Test nach Fisher; ^b Odds Ratio; ^c Konfidenzintervall

Tab 13: Assoziation der *NLRP*-Genotypen des Spenders mit einem Rezidiv

Genotyp Spender		Rezidiv				
		Ja n(%)	Nein n(%)	P ^a	OR ^b	95% -KI ^c
<i>NLRP1</i>	AA	11 (73,3)	34 (52,3)	0,095	1	0,23 – 3,01
rs5862	AG	4 (26,7)	15 (23,1)		0,82	
	GG	-	16 (24,6)		-	
<i>NLRP2</i>	CC	6 (40,0)	30 (46,2)	0,220	1	0,58 – 6,30
rs1043673	CA	8 (53,3)	21 (32,3)		1,91	
	AA	1 (6,7)	14 (21,5)		0,36	
<i>NLRP2</i>	AA	6 (40,0)	30 (46,2)	0,220	1	0,58 – 6,30
rs1043684	AG	8 (53,3)	21 (32,3)		1,91	
	GG	1 (6,7)	14 (21,5)		0,36	
<i>NLRP3</i>	CC	1 (6,7)	17 (26,2)	0,152	1	0,44 – 33,86
rs10754558	CG	7 (46,7)	31 (47,7)		3,84	
	GG	7 (46,7)	17 (26,2)		7,00	
<i>NLRP3</i>	CC	8 (53,3)	31 (47,7)	0,261	1	0,36 – 3,56
rs10925027	CT	7 (46,7)	24 (36,9)		1,13	
	TT	-	10 (15,4)		-	

^a P χ^2 oder exakter Test nach Fisher; ^b Odds Ratio; ^c Konfidenzintervall.

3.9 Diskordante *NLRP*-Genotypen und Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion

Tab 14 veranschaulicht die Häufigkeiten und Assoziationen von diskordanten Genotypen bei SZT in den Genen *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* zwischen Empfänger und Spender und dem Auftreten einer GvHD. Von den Patienten, die eine GvHD erlitten, waren im Gen *NLRP1*-SNPs rs5862 63,4% der Genotypen von Empfänger und Spender nicht übereinstimmend. Die berechnete OR spricht für ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer GvHD bei Diskordanz des Genotyps im Gen *NLRP1* zwischen Empfänger und Spender bei Transplantation. Die Effektmaße ließen eine Signifikanz erkennen (OR = 3,1, 95% -KI = 1,24-7,71). Die weiteren Analysen ergaben keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Häufigkeitsverteilung und diskordanter Transplantation in den Genotypen der *NLRP2*- und *NLRP3*-SNPs und dem Risiko einer GvHD.

3.10 Diskordante *NLRP*-Genotypen und Auftreten eines Rezidivs

Tab 15 bildet die Häufigkeiten und Assoziationen von diskordanten Genotypen in den Genen *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* zwischen Empfänger und Spender und dem Auftreten eines Rezidivs nach Transplantation ab. Der Tabelle lässt sich entnehmen, dass sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Häufigkeitsverteilung sowie diskordanter Transplantation in den analysierten Genotypen und dem Auftreten eines Rezidivs ergaben.

Tab 14: Assoziation der diskordanten *NLRP*-Genotypen mit einer Graft-versus-Host-Reaktion

Genotyp		Graft-versus-Host-Reaktion				
		Ja n(%)	Nein n(%)	P ^a	OR ^b	95% -KI ^c
<i>NLRP1</i>	nein	15 (36,6)	25 (64,1)		1	
rs5862	ja	26 (63,4)	14 (35,9)	0,014	3,10	1,24 – 7,71
diskordant						
<i>NLRP2</i>	nein	17 (41,5)	15 (38,5)		1	
rs1043673	ja	24 (58,5)	24 (61,5)	0,784	0,88	0,36 – 2,16
diskordant						
<i>NLRP2</i>	nein	16 (40,0)	18 (46,2)		1	
rs1043684	ja	24 (60,0)	21 (53,8)	0,581	1,29	0,53 – 3,14
diskordant						
<i>NLRP3</i>	nein	17 (42,5)	12 (30,8)		1	
rs10754558	ja	23 (57,5)	27 (69,2)	0,279	0,60	0,24 – 1,52
diskordant						
<i>NLRP3</i>	nein	22 (53,7)	17 (45,9)		1	
rs10925027	ja	19 (46,3)	20 (54,1)	0,496	0,73	0,30 – 1,79
diskordant						

^a $P \chi^2$ oder exakter Test nach Fisher; ^bOdds Ratio; ^cKonfidenzintervall.

Tab 15: Assoziation der diskordanten *NLRP*-Genotypen mit einem Rezidiv

Genotyp		Rezidiv		P ^a	OR ^b	95% -KI ^c
		Ja n(%)	Nein n(%)			
<i>NLRP1</i>	nein	10 (66,7)	30 (46,2)	0,152	1	0,13 – 1,39
rs5862	ja	5 (33,3)	35 (53,8)			
diskordant					0,43	
<i>NLRP2</i>	nein	5 (33,3)	27 (41,5)	0,559	1	0,44 – 4,63
rs1043673	ja	10 (66,7)	38 (58,5)			
diskordant					1,42	
<i>NLRP2</i>	nein	5 (33,3)	29 (45,3)	0,399	1	0,51 – 5,40
rs1043684	ja	10 (66,7)	35 (54,7)			
diskordant					1,66	
<i>NLRP3</i>	nein	5 (33,3)	24 (37,5)	0,763	1	0,37 – 3,93
rs10754558	ja	10 (66,7)	40 (62,5)			
diskordant					1,20	
<i>NLRP3</i>	nein	8 (57,1)	31 (48,4)	0,555	1	0,22 – 2,26
rs10925027	ja	6 (42,9)	33 (51,6)			
diskordant					0,71	

^aP χ^2 oder exakter Test nach Fisher; ^bOdds Ratio; ^cKonfidenzintervall.

4 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, an einem Patientenkollektiv, das an ALL im Kindesalter erkrankt war und sich einer SZT unterzog, durch Genotypisierung von SNPs in den Genen *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* von Empfänger und Spender Aufschluss darüber zu erlangen, in wie weit die untersuchten Varianten mit einem erhöhtem Auftreten eines Rezidivs und einer GvHD assoziiert waren. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob sich eine Genotypisierung der oben genannten SNPs zur Risikoabschätzung und als Stratifizierungsparameter vor SZT und damit potentiell zur Therapieoptimierung eignet.

4.1 Bedeutung der Studie im Kontext mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten

Granell et al. (2008) untersuchten die Beziehung genetischer Variation in Genen von Empfänger und Spender, die für das Inflammasom kodieren, und dem klinischen Therapieergebnis nach Transplantation. Es wurden bei 133 MSD-Spender-Empfänger-Pärchen 14 genetische Varianten in fünf Genen (*NLRP1*, *NLRP2*, *NLRP3*, *CARD8*, *CASP5*) (siehe auch Tab 5) analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung dienten als Ausgangspunkte für die hier vorliegende Studie, in der 143 Patienten mit ALL im Kindesalter analysiert werden konnten. In diesem Kollektiv wurde eine Genotypisierung von fünf SNPs in den Genen *NLRP1*, *NLRP2* und *NLRP3* durchgeführt. Hierbei jedoch nicht nur Patienten, die sich einer MSD-SZT wie bei Granell et al. unterzogen, sondern auch zu einem gewissen Anteil Abweichungen in den HLA-Genorten aufwiesen (siehe Tab 7). Es zeigte sich bei Granell et al. (2008), dass *NLRP2* und *NLRP3* wichtige prognostischen Faktoren für das Therapieergebnis darstellten. So war der T/T Genotyp des SNPs rs10925027 in *NLRP3* signifikant mit dem Auftreten eines Rezidivs assoziiert (OR = 6,3; $p = 1 \times 10^{-7}$). Der Genotyp G/G des SNPs rs 1043684 in *NLRP2* war mit einer NRM (OR = 4,4; $p = 6 \times 10^{-4}$) und einem OS assoziiert (OR = 3,1; $p = 0,001$). Der Genotyp A/A des SNPs rs5862 in *NLRP1* stand signifikant im Zusammenhang mit einer NRM (OR = 2,8; $p = 0,005$) und einem OS (OR = 2,0; $p = 0,009$). Die Allel- und Genotypfrequenzen waren ähnlich den beobachteten der NCBI-Datenbank und standen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht. In der Studie von Granell et al. erlitten 63% der Patienten eine aGvHD, in der

univariaten Regressionsanalyse bezogen auf eine GvHD Grad III und IV zeigte sich, dass in *NLRP2* SNPs rs1043673 Genotyp C/C vs. C/A und A/A (22% vs. 5%, $p = 0,04$) und in SNP rs1043684 Genotyp G/G vs. G/A und A/A (14% vs. 5%; $p = 0,15$) mit dem Auftreten einer GvHD assoziiert waren. Es wurde keine multivariate Analyse aufgrund der geringen Fallzahl durchgeführt. Die *NLRP2*-SNPs rs1043673 und rs1043684 befanden sich im Kopplungsungleichgewicht. Dies beschreibt eine nicht zufällige Assoziation von Genen, die auf geringer physischer Distanz von verschiedenen Loci auf dem Chromosom beruht.

Gruhn et al. veröffentlichten 2009 die erste Studie über die Relevanz von Polymorphismen im *IL23-Rezeptor (IL23R)*-Gen und dem *NOD2/CARD15*-Gen und dem Auftreten einer GvHD bei Kindern, die stammzelltransplantiert wurden. Hierzu untersuchten sie 231 Kinder und Jugendliche und den jeweiligen Spendergenotyp, die in einem Zeitraum zwischen 1982 und 2007 transplantiert wurden. Sie beobachteten, dass eine signifikant verringerte Inzidenz für eine aGvHD Grad II-IV bei Transplantation von Stammzellen der Spender auftrat, bei denen ein variantes *IL23R*-Allel vorlag (5% vs. 33,3%; $p = 0,009$). Es wurde keine Assoziation zwischen dem *NOD2/CARD15*-Polymorphismus und dem Auftreten einer GvHD nachgewiesen. Gruhn et al. (2009) untersuchten ein heterogenes Kollektiv, es schloss nicht nur Patienten mit der Diagnose ALL, sondern auch Patienten mit anderen malignen hämatopoetischen- und angeborenen Stoffwechsel- und Immundefekten ein.

Elmaagacil et al. (2008) hatten zuvor die Assoziation zwischen dem Vorliegen eines *IL23R*-Polymorphismus an zwei Kollektiven und dem Auftreten einer GvHD an Erwachsenen untersucht. Bei 221 Empfänger-Spender-Pärchen, die sich einer Verwandten-MD-SZT unterzogen und 186 Empfänger-Spender-Pärchen, die eine Nicht-Verwandte-MD-SZT erhielten, stellte sich das Vorliegen des varianten Allels als protektiver Faktor in Bezug auf das Auftreten einer GvHD dar. OS und die Auftretenswahrscheinlichkeit für ein Rezidiv wurden nicht signifikant beeinflusst.

Den Einfluss von immungenetischen Faktoren auf das klinische Therapieergebnis untersuchten Madrigal und Shaw (2007). Es zeigte sich, dass eine Übereinstimmung in den HLA-Genorten das OS verbesserte. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HLA-identer-Transplantation in 10/10 Allelen und dem Vorliegen einer Nicht-Übereinstimmung in einem Allel gefunden. Das Auftreten von SNPs im *NOD2/CARD15*-Gen war signifikant mit dem Auftreten eines Rezidivs und erhöhter Sterblichkeit bei einer MD-SZT assoziiert. *NOD2/CARD15* kodiert für das NOD2-Protein, das eine Rolle im angeborenen Immunsystem spielt. Mehrere Studien zeigten den möglichen Zusammenhang von SNPs in diesem Gen und dem Auftreten von entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn. Im Besonderen waren diese assoziiert mit einer Erhöhung der transplantationsbedingten Sterblichkeit

und einer aGvHD (Holler et al. 2004, Elmaagacli et al. 2006, Granel et al. 2006).

Bei Madrigal et al. (2008) betrug die Inzidenz über zwei Jahre eines Rezidivs 54% bei Spender-Empfänger-Pärchen mit dem *NOD2/CARD15*-Polymorphismus im Vergleich zu 32% bei Spender-Empfänger-Pärchen bei denen ein variantes Allel vorlag ($p=0,001$). Diese Daten zeigen die wichtige Rolle der Genotypisierung des *NOD/CARD15*-Polymorphismus vor Transplantation und weisen auf den möglichen Effekt des NOD2-Proteins bei Autoreaktivität und Tumorkontrolle hin.

NLRP1, *NLRP2* und *NLRP3* sind Gene, die für Proteine kodieren, die mit dem so genannten Inflammasom assoziiert sind - einem makromolekularen zytosolischen Komplex, der als Bestandteil der unspezifischen Abwehr in Antwort auf pathologische Stimuli über Caspase1 in die Produktion von IL1 β und IL18 involviert ist (siehe 1.1, 1.3). Diesen proinflammatorischen Zytokinen wird eine wichtige Rolle bezüglich des Auftretens von Komplikationen im Rahmen einer SZT zugeschrieben - etwa im Kontext einer aGvHD oder bei Infektionen (Cavet et al. 1999, Lin et al. 2003, Cullup et al. 2005, Martinon et al 2005, Martinon et al 2009). Daher ist die Untersuchung bezüglich eines Einflusses von SNPs in diesen Genen auf das Therapieergebnis nach SZT ein vielversprechender Ansatz hinsichtlich der zukünftigen Therapieoptimierung durch Genotypisierung und angepasster, verfeinerter Risikostratifizierung.

4.2 Einzelnukleotidpolymorphismen und Auftreten eines Rezidivs

Es zeigte sich in der hier vorliegenden Untersuchung kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von SNPs in den Genen *NLRP1*, *NLRP2*, *NLRP3* bei Spender und Empfänger und dem Auftreten eines Rezidivs. Dagegen beschrieben Granel et al. (2008), dass ein Spender-Genotyp T/T bezüglich des *NLRP3*-SNPs rs10925027 sowie ein Spender-Genotyp G/G des *NLRP3*-SNPs rs10754558 signifikant mit dem Auftreten eines Rezidivs assoziiert waren ($p=0,001$). In der multivariaten Analyse zeigte sich nur ein signifikanter Zusammenhang zwischen Spender-Genotyp T/T des *NLRP3*-SNPs rs10925027 und einem Rezidiv (OR = 6,3; $p = 1 \times 10^{-7}$). Des Weiteren zeigte sich bei Granel et al. (2008) eine Assoziation des SNPs rs11665831 im *CARD8*-Gen des Empfängers mit dem Auftreten eines Rezidivs, dieses Gen wurde von uns nicht genotypisiert. In der multivariaten Analyse unter Einschluss der Variablen Spender-Genotyp des *NLRP3*-SNPs rs10925027, Empfänger-Genotyp des SNPs rs11665831, Krankheitsstadium, Konditionierungstherapie und Patientenalter bei Transplantation, wurde ein Zusammenhang zwischen Spender-Genotyp T/T

des SNPs rs10925027 des *NLRP3*-Gens und Empfänger-Genotyp C/C des SNPs rs11665831 des *CARD8*-Gens und einem Rezidiv gefunden. Von den untersuchten Patienten bei Granell et al. (2008) erlitten 30% der transplantierten Patienten ein Rezidiv, in dem hier untersuchten Kollektiv war die Fallzahl deutlich niedriger, in 28 Fällen (19,6%) wurde ein Rezidiv nach Transplantation beschrieben. Des Weiteren handelte es sich bei dem von Granell et al. (2008) untersuchten Kollektiv um ein homogeneres als hier vorliegend, da nur Patienten genotypisiert wurden, die sich einer MSD-SZT unterzogen. Hier lag ein deutlich heterogenes Kollektiv in Bezug auf den Spendertyp vor. 30,8% der Patienten erhielten eine MSD-Transplantation, 61,5% eine MD-Transplantation und in 11 Fällen (7,7%) wurden Stammzellen eines MMD transplantiert. Dagegen war das hier typisierte Kollektiv homogener bezüglich der Grunderkrankung und der applizierten SZT-Regimes. Daher ist zwischen den hier gewonnenen Daten und den Ergebnissen von Granell et al. (2008) keine direkte Vergleichbarkeit geleistet. Das Therapieergebnis nach SZT ist abhängig von der Verfügbarkeit eines HLA-kompatiblen Spenders (Leung et al. 2002).

4.3 Einzelnukleotidpolymorphismen und Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion

In Bezug auf das Auftreten einer GvHD nach Transplantation zeigte sich in dieser Arbeit bei Vorliegen des Empfänger-Genotyps A/G im *NLRP2*-SNP rs1043684 ein signifikantes Ergebnis (OR = 2,18; 95% -KI = 1,07-4,49). Dagegen war bei Granell et al. (2008) in der univariaten Analyse der Genotyp G/G des Empfängers im Vergleich zum Vorliegen der Allele A/G und A/A in rs1043684 mit einem Auftreten einer GvHD Grad III-IV assoziiert (14% vs. 5%, $p = 0,15$). Auch konnte der SNP rs1043673 in *NLRP2* des Empfängers mit einer GvHD Grad II-I-IV in einen Zusammenhang gebracht werden (C/C vs. C/A und A/A; 22% vs. 5%, $p = 0,04$). Dieser Effekt konnte in der hier vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Des Weiteren befanden sich bei Granell et al. (2008) die Genorte rs1043673 und rs1043684 im Kopplungsungleichgewicht ($D=0,169$, $p<0,001$). Diese Berechnung wurde von uns nicht durchgeführt, da die Ergebnisse der Genotypisierung in ihrer Ausprägung miteinander korrelierten (siehe auch 4.4). Wir führten in unserem kleinen Kollektiv keine Analysen durch, die spezifisch auf die Entstehung einer GvHD Grad III-IV ausgerichtet waren. Der Einfluss des *NLRP2*-SNPs rs1043684 lässt sich somit bestätigen. Nicht zu dieser Hypothese passt, dass in den hier vorliegenden Analysen, das Auftreten des homozygoten varianten Allels G/G in rs1043684 mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit zu der Ausbildung einer GvHD führte als der heterozy-

gote Genotyp. Es ließ sich zwar eine Erhöhung der OR nachweisen, jedoch wies dieses Ergebnis keine Signifikanz auf (OR = 1,4, 95% -KI = 0,49-4,01).

Des Weiteren fiel auf, dass das Vorliegen des Genotyps G/G des *NLRP1*-SNPs rs5862 des Spenders mit einer deutlichen Erhöhung der OR für eine GvHD einherging, das KI ließ eine Signifikanz dieses Ergebnisses erkennen (OR = 3,75, 95% -KI = 1,05-13,42). Dagegen war bei Granell et al. (2008) der SNPs rs5862 in *NLRP1* des Empfängers mit NRM (OR = 2,8, p = 0,005) und OS (OR = 2,0, p = 0,009) assoziiert und kein Zusammenhang der genetischen Varianten in *NLRP1* des Spenders mit einer Verschlechterung des Therapieergebnisses in Bezug auf eine GvHD erkennbar.

Von den Patienten, die eine GvHD erlitten, waren im *NLRP1*-SNP rs5862 63,4% der Genotypen von Empfänger und Spender nicht übereinstimmend transplantiert. Die berechnete OR (OR = 3,1) deutet ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer GvHD bei Diskordanz des Genotyps in diesem SNP des *NLRP1*-Gens zwischen Empfänger und Spender bei Transplantation an. Dieses Ergebnis wies eine Signifikanz auf (95% -KI = 1,24-7,71). In den diskordanten Transplantationen der weiteren Kandidatengene *NLRP2* und *NLRP3* zeigte sich kein signifikantes Ergebnis hinsichtlich des Auftretens einer GvHD.

Bei Verwendung von Stammzellen aus peripherem Blut (PBSC) ist die Inzidenz für eine GvHD höher als bei Stammzellen aus dem KM (Zecca et al. 2002). Das von uns untersuchte Patientenkollektiv erhielt in 29,4% der Fälle ein PBSC-Transplantat. Ein weiteres Problem hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Daten stellt die Heterogenität der GvHD-Prophylaxe dar (Miano et al. 2007, Peters et al. 1998). Wie schon in 4.2 beschrieben handelte es sich bei dem von Granell et al. (2008) untersuchten Patientenkollektiv in Bezug auf die HLA-idente-Transplantation um ein Homogeneres als hier vorliegend. Je größer der genetische Unterschied zwischen Empfänger und Spender ist, desto größer ist die Gefahr für das Auftreten einer GvHD und ihr Ausmaß. Daher wäre es möglich, dass man bei einer diskordanten SZT in den hier genotypisierten *NLRP*-Kandidatengenen eine höhere Inzidenz einer GvHD erwarten könnte als bei nicht-diskordanter SZT. Es wurde hier jedoch nur für die diskordante Transplantation in *NLRP1* eine signifikante Erhöhung des Risikos für eine GvHD beobachtet.

In der aktuellen Studienlage existieren keine Daten hinsichtlich des Zusammenhangs des *NLRP1*-SNPs rs5862 und der Risikoerhöhung für eine GvHD nach SZT und bei diskordanter Transplantation. Nach Auswertung der hier untersuchten Daten stellt der SNP rs5862 in *NLRP1* einen in größeren Kollektiven nachverfolgungswerten, interessanten Kandidaten dar.

4.4 Studiendesign und Fehleranalyse

Bei der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Studie, bei der das Patientenkollektiv retrospektiv analysiert wurde. Die untersuchten Patienten wurden aufgeteilt in eine Fallgruppe mit einem bestimmten Zielereignis (Rezidiv/GvHD) und eine Kontrollgruppe ohne ein Zielereignis und im Anschluss auf das Vorliegen einer Exposition, in diesem Fall die *NLRP*-SNPs, untersucht. So weisen die Anteile von Patienten mit einer Exposition in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf einen Zusammenhang von Zielereignis und Exposition hin. Vorteil an diesem Studiendesign war eine relativ unkomplizierte Durchführung, da bereits vorhandenes Patientenmaterial untersucht wurde, sowie dass durch die retrospektive Betrachtung des Patientenkollektives bereits eine adäquate Beobachtungszeit bei Beginn der Untersuchungen vorlag.

Nachteilig ist, dass eine Verallgemeinerung der Ergebnisse auf eine fiktive Grundgesamtheit nur bedingt möglich ist, da bei einer Fall-Kontroll-Studie Anhaltspunkte für einen vermuteten Zusammenhang gefunden werden, des Weiteren kann nur eine Beurteilung erfolgen, ob die analysierte Exposition einen Risikofaktor darstellt, eine Aussage über Ursache und Wirkung ist jedoch nicht möglich. Zudem bestand keine Strukturgleichheit in Fall- und Kontrollgruppe, sodass möglicherweise beobachtete Zusammenhänge auf eine dritte Variable (Confounder) zurückzuführen sind. Ein Matching der Patienten hilft, die Confounder in beiden Gruppe gleich zu halten und damit ihren Einfluss auf das beobachtete Ergebnis zu minimieren. Dies war in der vorliegenden Studie aufgrund der geringen Fallzahl und des begrenzten Untersuchungsmaterials nicht möglich. Ein weiteres Problem stellt die Selektion von Patienten der Kontroll- und Fallgruppe dar, da stets eine Repräsentativität gewahrt werden sollte. Die Patienten der hier vorliegenden Untersuchung repräsentierten weitestgehend die HR-Gruppe der Patienten mit kindlicher ALL, da sie aufgrund ihrer Merkmale und Risikofaktoren für eine SZT geplant wurden. Um einen eindeutigen Effekt der *NLRP*-SNPs zu analysieren, wäre es von Vorteil, die Fallgruppe hinsichtlich des Auftretens eines Rezidivs/einer GvHD möglichst spezifisch auszuwählen. Die Diskussion der hier gewonnenen Ergebnisse im Vergleich mit anderen Studien wird durch eingeschränkte Vergleichbarkeit aufgrund von unterschiedlichen Diagnosekriterien bzw. unterschiedlicher Strukturen der Patientenkollektive erschwert (Trampisch und Windeler 2000; Kopec und Esdail 1990).

Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes haben SNPs oft keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz eines Proteins, hier führt nur der SNPs rs1043673 des *NLRP2*-Gens, der im Exon13 lokalisiert ist, zu einem Aminosäureaustausch im Protein (siehe Tab 5). Es ist jedoch möglich, dass es bei einem Basenaustausch in regulatorisch wirkenden Abschnitten von Genen, wie SNPs in Promotorregionen, zu einer Beeinflussung der Interaktion

mit bestimmten Transkriptionsfaktoren kommt. Dies kann potentiell eine gesteigerte Transkription, ein Enhancement, oder eine verminderte Transkription des Proteins bewirken. Die übrigen hier untersuchten SNPs liegen innerhalb der Promotorregion der Gene. Diese SNPs in Genen, die für das Inflammasom und damit für die Aktivierung der IL1 β -abhängigen Signalkaskaden kodieren, können einen Schutz- bzw. einen Risikofaktor nach Transplantation darstellen (Dickinson 2007). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die untersuchten SNPs keine Auswirkungen auf ein bestimmtes Protein haben sondern Marker für eine funktionell relevante Genregion, die sich im Verteilungsgleichgewicht mit diesen Markern befindet, darstellen (Weiner und Hudson, 2002).

Die widersprüchliche Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien, wie z.B. das Abweichen der hier gefundenen Daten von denen von Granell et al. (2008) ist möglicherweise auch durch unterschiedliche Frequenzen der untersuchten Polymorphismen in verschiedenen geographischen Regionen zu erklären.

Wie oben bereits beschrieben fiel in den Genotypisierungsanalysen der *NLRP2*-SNPs rs1043673 und rs1043684 auf, dass die Ausprägungen der beiden SNPs in den hier durchgeführten Analysen korrelierten. Es könnte sich hierbei um einen systematischen Fehler der Untersuchung handeln. Jedoch wurden Spender- und Empfänger material getrennt voneinander und an verschiedenen Tagen genotypisiert, was eine Verwechslung der verwendeten Primer unwahrscheinlicher macht. Auch eine durchgeführte Kontrollanalyse an beiden Kollektiven erzielte dieselben Ergebnisse. Eine andere Erklärung wäre, dass dadurch, dass die beiden Genorte dicht beieinander auf dem selben Gen lokalisiert sind, es hier zu einer Kopplung und damit gemeinsamer Vererbung kommt. Auch Granell et al. (2008) beobachteten, dass die SNPs rs1043673 und rs1043684 des *NLRP2*-Gens sich in ihrer Studie in einem Kopplungsungleichgewicht befanden. Dieses tritt auf, wenn die Loci zweier Gene dicht beieinander auf einem Chromosom liegen und sie abhängig voneinander auftreten, d.h. sie werden nicht mehr nach Zufallsprinzip innerhalb einer Population gemeinsam erscheinen, sondern öfter als erwartet. Ein Kopplungsungleichgewicht kann entstehen, wenn Allele mutiert sind und aufgrund eines geringen Zeitraums kein ausreichendes *cross-over* stattfand um eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Population zu erreichen (Grimm 2006).

Das größte therapeutische Potential in der Detektion von klinisch relevanten SNPs liegt darin, diese Beobachtungen in die Auswahl der Spender vor einer SZT mit einzubeziehen. Des Weiteren könnte die Bestimmung dieser Varianten des Patienten zur präziseren Risikostratifizierung und damit zur Therapieoptimierung dienen und somit unter zusätzlicher Berücksichtigung der genetischen Ausstattung des Patienten eine individuell angepasste Therapie ermöglichen. Nicht nur die Analyse, ob ein SNP einen protektiven oder schädlichen Einfluss auf ein Therapieergebnis hat, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein, sondern auch die

funktionellen Mechanismen, die die jeweiligen Polymorphismen auf den Krankheitsverlauf haben, denn dies trägt zum besseren Verständnis und damit möglicherweise zu optimierten Therapieansätzen bei.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters. Durch kontinuierliche Forschungsanstrengungen konnten in den letzten Jahrzehnten Merkmale mit prognostischer Relevanz identifiziert und zur Risikostratifizierung und -adaptation der Therapie im Rahmen standardisierter Behandlungsstudien genutzt werden und führten damit zu Heilungsraten über 80%. Für einen Teil der Patienten mit einem hohen Rückfallrisiko, der der Hoch-Risiko-Gruppe angehört ist eine Stammzelltransplantation Therapie der Wahl. Die Toxizität dieser Behandlung ist bei vielen Patienten mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden. Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in Genen von Empfänger und Spender beeinflussen das Therapieergebnis nach Transplantation. In dieser Arbeit wurden variante Allele eines Patientenkollektivs von 143 Spender-Empfänger-Pärchen mit ALL mit verfügbaren klinischen Daten und DNA-Material in den, in der Literatur als transplantationsrelevant vorbeschriebenen, *NLRP1*-, *NLRP2* und *NLRP3*-Genen, die für das Inflammation kodieren, genotypisiert und hinsichtlich der Bedeutung für das Auftreten eines Rezidivs und einer Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) analysiert. Im Labor erfolgte die Isolierung des DNA-Materials und die Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion. Zur statistischen Auswertung wurden die im Labor erhobenen Ergebnisse sowohl untereinander als auch mit klinischen Parametern korreliert. Es zeigte sich eine hohe Variabilität bezüglich Konkordanz und Diskordanz der Genotypen zwischen Empfänger und Spender. In unseren Analysen war eine diskordante Transplantation des *NLRP1*-SNPs rs5862 mit einem 3,1-fach erhöhtem Risiko für das Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion assoziiert (95% -KI = 1,24-7,71). Das Vorliegen des Genotyps G/G des *NLRP1*-SNPs rs5862 des Spenders führte zu einer 3,75-fachen Risikoerhöhung für eine GvHD (95% -KI = 1,05-13,42). Der Genotyp A/G des Empfängers im SNP rs1043684 des *NLRP2*-Gens führte zu einer signifikanten Erhöhung der Odds Ratio auf 2,18 (95% -KI = 1,07-4,49). Die weiteren Analysen ergaben keine signifikanten Unterschiede bezüglich Häufigkeitsverteilung der analysierten SNPs der *NLRP*-Gene bei Empfänger und Spender der Transplantation mit und ohne Auftreten einer GvHD und/oder eines Rezidivs, sowie keine signifikanten Werte bezüglich des GvHD- und Rezidivrisikos für die einzelnen Genotyp-Kategorien. Nach Auswertung der hier untersuchten Daten stellt der SNP rs5862 in *NLRP1* einen in größeren Kollektiven nachverfolgungswerten, interessanten Kandidaten dar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., Tschopp, J. NALP3 Forms an IL1 β -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder. *Immunity* 2004. 20: 319-325

Aksentijevich, I., Putnam, C., Remmers, E.F., Mueller, J.L., Kolodner, R.D., Moak, Z., Chuang, M., Austin, F., Goldbach-Mansky, R., Hoffman, H.M., Kastner, D.L. The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis Rheum.* 2007. 56(4):1273-85.

Apperley, J., Carreras, E., Gluckman, E., Gratwohl, A., Masszi, T. Haemopoietic Stem Cell Transplantation, überarbeitete Edition 2004 in „The EBMT-Handbook“

Bader, P., Kreyenberg, H., Henze, G.H., Eckert, C., Reising, M., Willasch, A., Barth, A., Borkhardt, A., Peters, C., Hangretinger, R., Sykora, K.W., Holter, W., Kabisch, H., Klingebiel, T., von Stackelberg, A. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol.* 2009. 27(3): 377-384

Balduzzi, A., Valsecchi, M.G., Uderzo, C., De Lorenzo, P., Klingebiel, T., Peters, C., Stary, J., Felice, M.S., Magyarosy, E., Conter, V., Reiter, A., Messina, C., Gadner, H., Schrappe, M. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet* 2005. 366(9386): 635-642

Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., van't Veer, M.B. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995. 1783-1786.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C., Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976. 33: 451-458

Bhatia, S., Ramsay, N.K., Steinbuch, M., Dusenbery, K., Shapiro, R.S., Weisdorf, D.J., Robison, L.L., Miller, J.S., Neglia, J.P. Malignant neoplasms following bone marrow transplantation. *Blood* 1996. 87: 3633-3639

Bhojwani, D., Howard, S.C., Pui, C-H., High-Risk Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Clinical Lymphoma & Myeloma* 2009. 9: 222-230

Bryant, C., Fitzgerald, K.A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends in Cell Biology* 2009. 19(9): 455-464

Bürger, B., Zimmermann, M., Mann, G., Kühl, J., Löning, L., Riehm, H., Reiter, A., Schrappe, M. Diagnostic Cerebrospinal Fluid Examination in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Significance of Low Leukocyte Counts With Blasts or Traumatic Lumbar Puncture. *J Clin Oncol* 2003. 21: 184-188

Cavet, J., Middleton, P.G., Segall, M., Noreen, H., Davies, S.M., Dickinson, A.M. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood* 1999. 94(11): 3941-3946

Cullup, H., Stark, G., Interleukin-1 polymorphisms and graft-vs-host disease. *Leukemia and Lymphoma* 2005. 46(4): 517-523

Dickinson, A.M., Cavet, J., Cullup, H., Wang, X.N., Sviland, L., Middleton, P.G. GvHD risk assessment in hematopoietic stem cell transplantation: role of cytokine gene polymorphisms and an in vitro human skin explant model. *Human Immunology* 2001. 62(11): 1266-1276

Dickinson, A.M., Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: pre-transplant patient and donor factors: non-HLA genetics. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007. 20(2): 189-207

Dinareello, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009. 27: 519-550

Einsele, H., Bertz, H., Beyer, J., Kiehl, M.G., Runde, V., Holb, H-J., Holler, E., Beck, R. Epidemiologie und interventionelle Therapiestrategien infektiöser Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation. *Dtsch med Wochenschr* 2001. 126(45): 1278-1284

Elmaagacli, A.H., Koldehoff, M., Hindahl, H., Steckel, N.K., Trenchel, R., Peceny, R., Ottinger, H., Rath, P.M., Ross, R.S., Roggendorf, M., Grosse-Wilde, H., Beelen, D.W. Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation* 2006. 81(2): 247-54

Falkenburg, J.H., van de Corput, L., Marijt, E., Willemz, R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 2003. 31(9): 743-751

Faraf, S.S., Fehniger, T.A., Ruggeri, L., Velardi, A., Caliguri, M.A. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002. 100(6): 1935-1947

Gaynon, P.S, Desai, A.A, Bostrom, B.C, Hutchinson, R.J, Lange, B.J, Nachman, J.B, Reaman, G.H, Sather, H.N., Steinherz, P.G, Trigg, M.E, Tubergen, D.G, Uckun, F.M. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer* 1997. 80(9):1717-26

Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003. 278(11): 8869-8872

Grimm, T. In: *Humangenetik*, Hrsg: Murken, J., Grimm, T., Holinski-Feder, E. 7. Auflage, Thieme Verlag 2006. S.348

Glucksberg, H., Storb, R., Ferer, A. et al. Clinical manifestations of graft-versus-host

disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974. 18: 295–304

Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol.* 1996. 8(1): 75-81

Granell, M., Urbano-Ispizua, A., Aróstegui, J.I., Fernández-Avilés, F., Martínez, C., Rovira, M., Rius, J., Plaza, S., Gaya, A., Navarro, A., Talam, C., Carreras, E., Monzó, M., Montserrat, E., Yagüe, J. Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006. 91(10): 1372-1376

Granell, M., Urbano-Ispizua, A., Pons, A., Aróstegui, J.I., Gel, B., Navarro, A., Jansa, S., Artells, R., Gaya, A., Talam, C., Fernández-Avilés, F., Martínez, C., Rovira, M., Carreras, E., Rozman, C., Juan, M., Yagüe, J., Montserrat, E., Monzó, M. Common variants in *NLRP2* and *NLRP3* genes are strong prognostic factors for the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2008. 112, 10: 4337-4342

Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 2006. 6: 193-203

Gruhn, B., Intek, J., Pfaffendorf, N., Zell, R., Corbacioglu, S., Zintl, F., Beck, J.F., Debatin, K.M., Steinbach, D. Polymorphism of Interleukin-23 Gene but not of NOD2/CARD15 is associated with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009. 15:1571-1577

Henze, G., Fengler, R., Hartmann, R., Dopfer, R., Göbel, U. Chemotherapy for bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1989. 24(1): 16-19

Henze, G., Fengler, R., Chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the BFM Study Group. *Haematol Blood Transfus* 1994. 36: 374-379

Henze, G.: Leukämien. In: Gutjahr, P. (Hrsg.) Krebs bei Kindern und Jugendlichen: Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie, 5. überarbeitete und erweiterte Aufl., Deutscher Ärzteverlag, Köln 2004: 293-321

Hill, G.R., Ferrara, J.L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000. 95(9): 2754-2759

Holler, E., Rogler, G., Herfarth, H., Brenmoehl, J., Wild, P.J., Hahn, J., Eissner, G., Schölmerich, J., Andreesen, R. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004.104(3): 889-94

Janeway, C.A.Jr., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002. 20: 197-216

Kaatsch, P., Spix, C., Schulze-Rath, R., Schmiedel, S., Blettner, M. Leukaemia in young children living in the vicinity of German nuclear power plants. *Int J Cancer* 2008.122: 721-726

Kinlen, L.J. High-contact paternal occupations, infection and childhood leukaemia: five studies of unusual population-mixing of adults. *Br J Cancer* 1997. 76: 1539-1545

Klein, C.A., Wilke, M., Pool, J., Vermeulen, C., Blokland, E., Burghart, E., Krostina, S., Wendler, N., Passlick, B., Riethmüller, G., Goulmy, E. The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells. *Journal of experimental medicine* 2002. 196(3): 359-368

Klein, J., Sato, A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000. 343(11): 782-786

Koletzko, B. *Kinder und Jugendmedizin*. 13. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg 2007. 301-307

Kopec, J.A., Esdaile, J.M. Bias in case-control studies. A review. *J Epidemiol Community Health* 1990. 44(3): 179-186

Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* 1993. 21, 16: 3761-3766

Leung, W.H., Turner, V., Richardson, S.L., Benaim, E., Hale, G., Horwitz, E.M. Effect of HLA class I or class II incompatibility in pediatric marrow transplantation from unrelated and related donors. *Hum Immunol* 2001. 62: 399-407

Lilleyman, J.S., Hann, I.M., Stevens, R.F., Eden, O.B., Richards, S.M. French-American-British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukaemia and its clinical importance. *J Clin Pathol.* 1986. 39(9): 998-1002

Lin, M.T., Storer, B., Martin, P.J., Tseng, L.H., Gooley, T., Chen, P.J., Hansen, J.A. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2003. 349(23): 2201-2210

Ljungman, P., Urbano-Ispizua, A., Cavazzana-Calvo, M., Demirer, T., Dini, G., Einsele, H., Gratwohl, A., Madrigal, A., Niederwieser, D., Passweg, J., Rocha, V., Saccardi, R., Schouten, H., Schmitz, N., Socie, G., Sureda, A., Apperley, J. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplantation* 2006. 37(5): 439-449

Loh, M.L., Rubnitz, J.E. TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr Op Hematol* 2002. 345-352

Macmahon, B., Lewy, M. Prenatal origin of Childhood Leukemia: evidence of twins. - *New England Journal of Medicine* 1964. 270: 1082

Margolin, J.H., Poplack, D.G. Acute lymphoblastic Leukemia. In: Pizzo, P.A., Poplack, D.G. Principles and practice of pediatric oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1997. 409

Marijt, W.A., Heemskerk, M.H., Kloosterboer, F.M., Goulmy, E., Kester, M.G., van der Hoorn, M.A., van Luxemburg-Heys, S.A., Hoogeboom, M., Mutis, T., Drijfhout, J.W., van Rood, J.J., Willemze, R., Falkenburg, J.H. Hematopoiesis-restricted minor histo-

compatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(5):2742-2747

Marsh, S.G.E. Nomenclature for factors of the HLA system, update September 2010. *Human Immunology* 2011. 72(1): 103-105

Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., Tschopp, J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol.* 2004. 14(21): 1929-34

Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27: 229-265

Martinon, F., Tschopp, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends in immunology* 2005. 26(8): 447-454

Miano, M., Labopin, M., Hartmann, O., Angelucci, E., Cornish, J., Gluckman, E. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007. 39: 89-99

Middleton, P.G., Cullup, H., Dickinson, A.M., Norden, J., Jackson, G.H., Taylor, P.R., Cavet, J. Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002. 30(4): 223-228

Middleton, P.G., Norden, J., Cullup, H., Cavet, J., Jackson, G.H., Taylor, P.R., Dickinson, A.M. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism associates with occurrence of graft-versus-host disease and reduced survival in HLA-matched sib-allo BMT. *Bone Marrow Transplant* 2003. 32(1): 41-47

Morishima, Y., Sasazuki, T., Inoko, H., Juji, T., Akaza, T., Yamamoto, K., Ishikawa, Y., Kato, S., Sao, H., Sakamaki, H., Kawa, K., Hamajima, N., Asano, S., Kodera, Y. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR mat-

ched unrelated donors. *Blood* 2002. 99(11): 4200-4206

Peters, C., Minkov, M., Gadner, H., Klingebiel, T., Niethammer, D. Proposal for standard recommendations for prophylaxis of graft-versus-host disease in children. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party Paediatric Diseases and the International Study Committee of the BFM family-subcommittee Bone Marrow Transplantation (IBFM-STG). *Bone Marrow Transplant* 1998. 21(2): 57-60

Petersdorf, E.W., Anasetti, C., Martin, P.J., Hansen, J.A. Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Tissue Antigens* 2003. 61(1): 1-11

Petersdorf, E.W., Gooley, T.A., Anasetti, C., Martin, P.J., Smith, A., Mickelson, E., Woolfrey, Hansen, J. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* 1998. 92(10): 3515-352

Petrilli, V, Papin, S., Tschopp, J. The inflammasome. *Curr. Biol* 2005. 15(15): R581

Pui, C.H., Behm, F.G., Crist, W.M. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993. 82(2): 343-362

Pui, C.H., Crist, W.M. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1994. 124(4): 491-503

Pui et al. Review: International childhood acute lymphoblastic leukemia workshop. *Leukemia* 2001. 15: 707-715

Pui, C.H. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 142-146

Pui, C.H., Howard, S.C. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol.* 2008. 9(3): 257-268

Pui, C.H., Robison, L.L., Look, T. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 2008. 371: 1030-1043

Pui, C.H., Carroll, W.L., Meshinchi, S., Arceci, R.J. Biology, risk stratification and therapy of pediatric leukemias: an update. *J. Clin. Oncol.* 2011. 29: 551-565

Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H.G., Beatty, P., Hows, J., Thomas, E.D. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplantation* 1995.15(6): 825-828

Rabbitts, T.H. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994. 372: 143-149

Ratanatharathorn, V., Ayash, L., Lazarus, H.M., Fu, J., Uberti, J.P. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplantation* 2001. 28(2): 121-129

Reddy, P., Ferrara, J.L. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev.* 2003. 17(4): 187-194

Reiter, A., Schrappe, M., Ludwig, W.D., Hiddemann, W., Sauter, S., Henze, G., Zimmermann, M., Lampert, F., Havers, W., Niethammer, D. et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994. 84(9): 3122-33

Rodrigue-Gervais, I.G., Saleh, M. Genetics of inflammasome-associated disorders: A lesson in the guiding principals of inflammasome function. *European Journal of Immunology* 2010. 40 (3): 643-648

Rocha, V., Porcher, R., Fernandes, J.F., Filion, A., Bittencourt, H., Silva, W., Vilela, G., Zanette, D.L., Ferry, C., Larghero, J., Devergie, A., Ribaud, P., Skvortsova, Y., Tamouza, R., Gluckman, E., Socie, G., Zago, M.A. Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia* 2009. 23(3): 545-556

Rowlings, P.A., Przepiorka, D., Klein, J.P. et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol* 1997. 97: 855–864

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M.F., Velardi, A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002. 295(5562): 2097-2100

Sawyers, C.L. Molecular genetics of acute leukaemia. *The Lancet* 1997. 349(9046): 196-200

Schaaf, C.P., Zschocke, J. *Basiswissen Humangenetik*. Springer Verlag 2008. 188-195

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D.M., Bazan, J.F., Kastelein, R.A. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005. 23(5): 479-90

Schrappé, M., Reiter, A., Ludwig, W.D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., Kornhuber, B., Ritter, J., Welte, K., Gadner, H., Riehm, H. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALLBFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 95. 3310-3322

Schrappé, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W-D., Henze, G., Gadner, H., Odenwald, E., Riehm, H. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Leukemia* 2000. 14: 2205–2222

Schrappé, M. Risk-adapted stratification and treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Radiation Protection Dosimetry* 2008. 132: 130-133

Schrauder, A., von Stackelberg, A., Schrappe, M., Cornish, J., Peters, C. Indications and Results of Haematopoietic Stem Cell Transplantation in Acute Leukaemia: Allogeneic hematopoietic SCT in children with ALL: current concepts of ongoing prospective SCT trials. *Bone Marrow Transplantation* 2008. 41: 71–74

Shulman, H.M., Sullivan, K.M., Weiden, P.L., McDonald, G.B., Striker, G.E., Sale, G.E., Hackman, R., Tsoi, M.S., Storb, R., Thomas, E.D. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med.* 1980. 69(2): 204-217

Stanulla, M, Bourquin, J.-P. Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter. *Pharmazie in unserer Zeit* 2012. 3: 203-213

Teitell, M., Pandolfi, P.P. Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Annual Review of Pathology* 2009. 4: 175-198

Thomas, E.D., Storb, R., Clift, R.A. et al. Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 1975. 292: 895-902

Trampisch, H.J., Windeler, J. *Medizinische Statistik*. Springer Verlag, 2. Auflage, 2000.

Tschopp, J., Martinon, F., Burns, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003. 4: 95-104

Uderzo, C., Rondelli, R., Dallorso, S., Messina, C., Miniero, R., Locatelli, F., de Manzini, A., Pession, A., Balduzzi, A. High-dose vincristine, fractionated total-body irradiation and cyclophosphamide as conditioning regimen in allogeneic and autologous bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission: a 7-year Italian multicentre study. *British journal of haematology* 1995. 89(4): 790-797

van Dongen, J.J., Seriu, T., Panzer-Grumayer, E.R., Biondi, A., Pongers-Willemsse, M.J., Corral, L. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998. 28(352): 1731-1738

Vrooman, L.M., Silverman, L.B. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Current Opinion in Pediatrics* 2009. 21(1): 1-8

Weiner, M.P, Hudson, T.J. Introduction to SNPs: Discovery of markers for disease. *BioTechniques* 2002. 32: 4-13

Wilhelm, J., Pingoud, A. Real time polymerase chain reaction. *ChemBioChem* 2003. 4: 1120-1128

Yomeyama, M., Fujita, T., RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev.* 2009. 227(1):54-65

Zecca, M., Prete, A., Rondelli, R., Lanino, E., Balduzzi, A., Messina, C. et al. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* 2002. 100: 1192–1200.

<http://www.dkms.de/wir-ueber-uns/historie/index.html> ; Stand: 29.12.2010

7 ANHANG

7.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ida Helene Siuts
Geburtsdatum: 07.06.1987 in Jever
Anschrift: Samwerstr.35, 24118 Kiel
Eltern: Weert und Andrea Siuts
Geschwister: Focke, Hanna, Greta, Thea und Frerich Siuts

Schulbildung

08/1994-08/1998 Grundschole Hohenkirchen
08/1998-08/2000 Orientierungsstufe der Haupt-und Realschole Hohenkirchen
08/2000-08/2006 Mariengymnasium Jever; Abitur

Studium

10/2006-09/2008 Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
09/ 2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 10/2008 Studium der Humanmedizin, Christian-Albrechts-Universität Kiel
10/2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

Februar 2009 Gynäkologie, St. Willehad Hospital Wilhelmshaven
September 2009 Innere Medizin, Reinhard-Nieter Krankenhaus Wilhelmshaven
August 2010 Hämatologie/Pädiatrie, UKSH Campus Kiel
Oktober 2010 Unfallchirurgie, Lubinuslinik Kiel

März/April 2011 Praxisfamulaturen in der Pädiatrie und Allgemeinmedizin

Praktisches Jahr

1.Tertial	Chirurgie im Westklinikum Hamburg und im Regionalkrankenhaus Bozen, Italien
2.Tertial	Kinder- und Jugendmedizin im Westküstenklinikum Heide
3.Tertial	Innere Medizin am UKSH, Campus Kiel

7.2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit werden nach Abschluss der Studie veröffentlicht werden.

7.3 Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

7.4 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Martin Stanulla und PD Dr. Alexander Claviez für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Fertigstellung der Arbeit. Sowie den Mitarbeitern der ALL-BFM Studienzentrale und des Studienlabors, die mir stets freundlich und hilfsbereit zur Seite standen. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Birthe Fedders für die Einarbeitung und Hilfe bei den labortechnischen Methoden. Meiner Familie und meinen Freuden bin ich dankbar für die Unterstützung während des Studiums, ohne die das und damit auch diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre und Timo für seine Geduld mit mir und der Formatierung.