

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie

**Zusammenhang zwischen dem KIR-Rezeptorprofil
und dem Auftreten akuter lymphoblastischer Leukämien
im Kindesalter**

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

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

vorgelegt von

Firnkorn, Matthias

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schittenhelm

Tag der Disputation: 26.01.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	4
1.1 Epidemiologische Grundlagen	4
1.2 NK-Zellen	4
1.2.1 Toleranz gegen körpereigene Zellen	4
1.2.2 Zytotoxische Funktionsweise der NK-Zellen	5
1.2.3 Aktivitätssteuerung der NK-Zellen	5
1.2.4 Definition der KIR	6
1.2.5 Nomenklatur der KIR	6
1.2.6 KIR-Protein-Aufbau und Signalvermittlung	9
1.2.7 KIR2DS4	9
1.2.8 KIR und ihre Liganden	10
1.2.9 Haplotyp A/B	11
1.2.10 B-Content Score	11
1.3 Stammzelltransplantation	13
1.3.1 Match/Mismatch	13
1.3.2 Einfluss des KIR-Rezeptorprofils auf das Krankheitsgeschehen verschiedener Erkrankungen	14
1.4 KIR-Rezeptorprofil und das Auftreten einer ALL	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits	17
2.1.4 Primer	18
2.1.5 DNA-Proben	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 DNA-Aufbereitung	20
2.2.2 Mastermix-Herstellung	20
2.2.3 Herstellung des Ausgangsreagenz	20
2.2.4 Quantitative Real-Time PCR	21
2.2.5 PCR für KIR2DS4	22
2.2.6 Konventionelle PCR	22
2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.8 Software und Statistik	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Wahl der Methode und resultierende Probandenzahl	25
3.2 Patientencharakteristika	25
3.3 Durchführung der Experimente	27
3.3.1 PCR	27
3.3.2 Erfassung der Daten	28
3.3.3 Deletionsnachweis von KIR2DS4	28
3.4 Statistische Auswertung	29
3.5 Analysemodell	32
3.5.1 Univariate logistische Regression	32
3.6 KIR-Genotypen der verschiedenen Risikogruppen	34
3.7 Rezeptorprofile der Risikogruppen	36
3.7.1 KIR2DS5/KIR3DS1, KIR2DS2, KIR2DS3/KIR2DS4	36
3.7.2 Sonderfall KIR2DS1	38

3.8	Beobachtete KIR-Kombinationen innerhalb der verschiedenen Risikogruppen	39
3.8.1	Anzahl aktivierender KIRs und Auftreten einer ALL	39
4	Diskussion	41
4.1	KIR-Profil und kindliche ALL	41
4.2	Kritische Beurteilung der angewandten Studiendesigns.....	42
4.3	Einordnung der Patientendaten in die Literatur	42
4.4	Auswertungskonzept.....	43
4.5	Die Bedeutung von KIR2DS1 für die kindliche Leukämie.....	44
4.6	Die klinische Relevanz des KIR-Liganden-Modells	45
4.7	Ausblick.....	46
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	48
7	Erklärung zum Eigenanteil	54
	Danksagung	55

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BC	B-Content
bp	Basenpaar
CCD	charge-coupled device
CD	Cluster of differentiation
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFÜ	Ereignisfreies Überleben
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
H ₂ O	Wasser
HSZT	Haploidente Stammzelltransplantation
IG	Immunglobulin
IPD	Immuno Polymorphism Database
KI	Konfidenzintervall
KIR	Killer-Zell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
LRK	Leukozyten-Rezeptor-Komplex
mRNA	Messenger RNA
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
SZT	Stammzelltransplantation
TBE	TRIS-Borat-EDTA
Tel	Telomer
Zen	Zentromer
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Epidemiologische Grundlagen

Leukämien machen knapp ein Drittel der bösartigen Erkrankungen im Kindesalter in Deutschland aus (30,6 % lt. Jahresbericht des Deutschen Kinderkrebsregisters, http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/29942/0/f474d594c6b5a8805c4e629db249872e05d69ddb/jb2015_s.pdf). Leukämien im Kindesalter teilen sich zum allergrößten Teil – mit ca. 80 % – in ALL (akute lymphoblastische Leukämie) und mit ca. 20 % in AML (akute myeloische Leukämie) auf. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen zwei und fünf Lebensjahren, im Median bei 4,7 Jahren, Jungen sind etwas häufiger betroffen als Mädchen. Im Rahmen der Therapie der ALL findet eine Differenzierung des Krankheitsgrades anhand bestimmter Merkmalsausprägungen (Risikogruppen Low/Medium/High) statt.

1.2 NK-Zellen

Die NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie sind eine Subpopulation (ca. 10 %) der Leukozyten und für die Vernichtung entarteter und infizierter Zellen zuständig (French and Yokoyama, 2003; Moretta et al., 2002; Robertson and Ritz, 1990; Yokoyama and Scalzo, 2002). Dabei ist hervorzuheben, dass ihre Funktion unabhängig vom Antigen ist (Trinchieri, 1989). Zusätzlich schütten die NK-Zellen immunregulatorische Zytokine aus, die das spezifische Immunsystem auf den Plan rufen (Azzoni et al., 2002; Cooper et al., 2001; Nguyen et al., 2002).

Auf den NK-Zellen befindet sich eine Vielzahl an Oberflächenstrukturen. Dazu gehören Killer-Zell-Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR), NKG-Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Fc-Rezeptoren. Diese Oberflächenmerkmale kommunizieren mit bestimmten NK-Zell-Rezeptoren auf ihren Zielzellen.

1.2.1 Toleranz gegen körpereigene Zellen

Nachdem 1975 NK-Zellen erstmalig beschrieben wurden (Herbermann et al., 1975, Kiessling et al., 1975), blieb es lange unklar, wie sie andere Zellen danach differenzieren, ob es sich um eine körpereigene oder um eine fremde Zelle handelt.

Nach der Missing-self-Hypothese von 1990 funktioniert die Differenzierung der Zellen so, dass sich auf den Ziel- oder Targetzellen HLA-Klasse-I-Moleküle befinden, mit denen die NK-Zellen interagieren (Kärre et al., 1986; Ljunggren and Karre, 1990).

Befinden sich diese Oberflächenmerkmale auf einer anderen Zelle, wird diese als „selbst“ erkannt. Es kommt zu einem hemmenden Signal in der NK-Zelle und die Zerstörung der anderen Zelle bleibt aus. Die Rezeptorausprägung einer Target-Zelle verändert sich bei einem viralen Befall oder bei einer Entartung der Zelle. Damit verändert sich die betroffene Rezeptorausprägung der Zelloberfläche. Dies führt zu einer Aktivierung der NK-Zelle und zur Zerstörung der Target-Zellen.

1.2.2 Zytotoxische Funktionsweise der NK-Zellen

Zur Zerstörung der als fremd erkannten Zielzelle kommt es über mehrere Mechanismen:

- mittels einer Exozytose von mit Granzymen und Perforinen gefüllten Granula (Trapani and Smith, 2002). Dabei schafft das Perforin ein ringförmiges Polymer und zerstört damit die Membranintegrität. Über diesen Zugang gelangen die Granzyme in die Zielzelle und leiten dort die Apoptose ein (Smyth, Kelly et al., 2001).
- mittels Bindung eines Fas-Liganden der NK-Zelle an ein CD95-Molekül der Zielzelle. Dabei wird eine endogene proteolytische Enzymkaskade ausgelöst und es kommt zur Apoptose (Enari, Talanian et al., 1996).
- mittels eines FC γ -Rezeptors III, der IG G-Antikörper bindet und zur Zielzelllyse führt.

1.2.3 Aktivitätssteuerung der NK-Zellen

Die Steuerung der Aktivität der NK-Zellen hängt von dem hemmenden und aktivierenden Zusammenspiel zwischen den auf der Target-Zelle exprimierten Liganden und der Rezeptorausprägung der NK-Zellen ab. Einen wichtigen Bestandteil dieses Regulationsmechanismus stellen die KIR auf den NK-Zellen dar (Lanier, 2005; Raulet et al., 2001; Moretta et al., 2001). Die Partner der KIR auf den Target-Zellen gehören häufig zu den HLA-Molekülen (vgl. Abschnitt 1.2.8). Abbildung 1 zeigt die Steuerung.

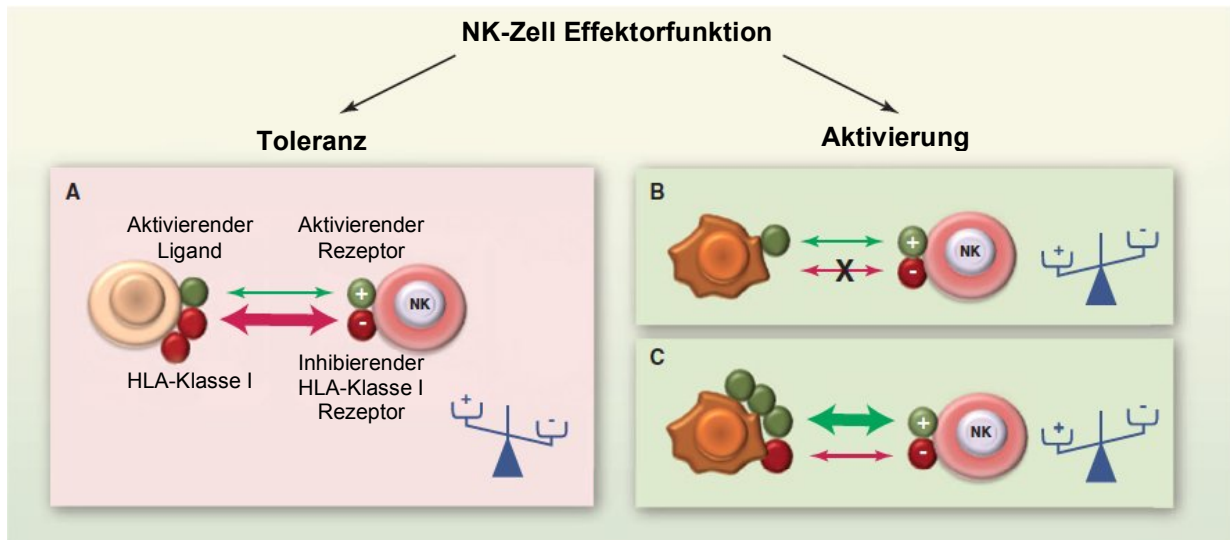


Abbildung 1: Regulationmechanismus der NK-Zellfunktion. Die Funktion als NK-Effektorzelle wird über das Vorhandensein von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren gesteuert. NK-Zellen greifen Zellen mit normaler +Rezeptordichte und einer ausreichenden Anzahl von inhibierenden HLA-Klasse-I Liganden nicht an (A). Lysiert werden Zellen mit entweder verminderter HLA-Klasse I Expression (B) oder vermehrter +Rezeptordichte (C). Abbildung aus (Vivier, Raulet et al., 2011).

1.2.4 Definition der KIR

Die KIR sind auf Gen 19q13.4 innerhalb des 1Mb Leukozyten-Rezeptor-Komplexes (LRK) lokalisiert (Uhrberg et al., 1997). Sie stellen eine polymorphe Genfamilie dar. Es sind 15 KIR-Gene sowie zwei Pseudogene, die nicht exprimiert werden, bekannt. Sie befinden sich insbesondere auf NK-Zellen, aber auch auf Subpopulationen der T-Lymphozyten. Die NK-Zellen gehören somit zum angeboren Immunsystem und haben die Aufgabe, Zellen, die durch Viren, Mycobakterien oder Tumorstadium verändert sind, zu erkennen und eine Zerstörung einer als krank oder als verändert erkannten Zelle einzuleiten (Harel-Bellan et al., 1986; Moretta et al., 1990; Uhrberg et al., 2001).

1.2.5 Nomenklatur der KIR

Weil sich die Funktionsweise der KIR in deren klassifizierender Nomenklatur wiederfindet, ist es hilfreich, diese darzustellen. So können die einzelnen KIR leicht identifiziert werden. Die KIR werden nach der Struktur ihres Rezeptors bezeichnet: Die erste Zahl nach dem KIR steht für die Anzahl der extrazellulären Domänen. Das folgende D bedeutet Domäne. Darauf folgt ein L für long oder ein S für short. Diese beiden Buchstaben bezeichnen den zytoplasmatischen Anteil, der lang oder kurz sein kann. Wenn ein Pseudogen vorhanden ist, wird es an dieser Stelle mit P bezeichnet.

Die folgende Zahl beschreibt die Nummer des Gens mit dieser Struktur.

Da es sich bei den KIR um Zellen des Immunsystems handelt, haben auch KIR-Gene eine CD-Zuordnung (Cluster of differentiation). Gemeinsam ist ihnen eine Bezeichnung als CD158-positiv (Marsh et al., 2003).

Die Zusammenstellung der KIR-Bezeichnungen wird in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Nomenklatur der KIR. Angelehnt an Marsh et al., 2003.

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

1.2.6 KIR-Protein-Aufbau und Signalvermittlung

Die Basis der meisten KIR-Proteine ist ein 21 Aminosäuren langes Peptid. Insgesamt variiert die Größe der KIR-Proteine zwischen 306 und 456 Aminosäuren (Selvakumar et al., 1996).

Strukturgebende Elemente der KIR sind die IG-ähnlichen Domänen (KIR2D oder KIR3D), die extrazellulär liegen, die Länge des zytoplasmatischen Anteils (KIRxDS (short) oder KIRxDL (long)) und der transmembranäre Bereich. An die IG-ähnlichen Domänen binden unter anderem HLA-Moleküle der Klasse I (vgl. Abschnitt 1.2.8). Die IG-ähnlichen Domänen sind mit dem transmembranären Teil des KIR-Proteins verbunden und wesentlicher Bestandteil der Signalvermittlung der NK-Zellen.

Je nachdem, ob ein langer oder kurzer zytoplasmatischer Anteil mit dem transmembranären verknüpft ist, kommt es zu unterschiedlichen Signalkaskaden. Bei einem langen zytoplasmatischen Teil kommt es über zwei Immun-Tyrosin-basierte inhibitorische Motive zu einer Signalvermittlung, die die NK-Zellen in ihrer zytolytischen Funktion hemmen. Bei einem kurzen zytoplasmatischen Teil kommt es über eine positiv geladene Aminosäure in dem dazugehörigen transmembranären Teil zu einer Signalvermittlung, die die NK-Zellen in ihrer zytolytischen Funktion aktivieren. Dabei wird über ein DAP-12-Signalmolekül die Aktivierung der NK-Zelle ausgelöst (Olcese et al., 1997; Lanier, 1998).

1.2.7 KIR2DS4

Es gibt eine Ausnahme unter den KIR-Proteinen in Bezug auf den Zusammenhang zwischen langem zytoplasmatischem Teil und einer Signalvermittlung, die die NK-Zellen in ihrer zytolytischen Funktion hemmt. KIR2DS4 vermittelt nicht über den DAP-12-Kanal, sondern über ein ITAM-Adaptermolekül. Dieses Adaptermolekül hat aktivierende Eigenschaften auf die NK-Zelle. Struktur und Funktionsmechanismus aller KIR inklusive KIR2DS4 sind in Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt.

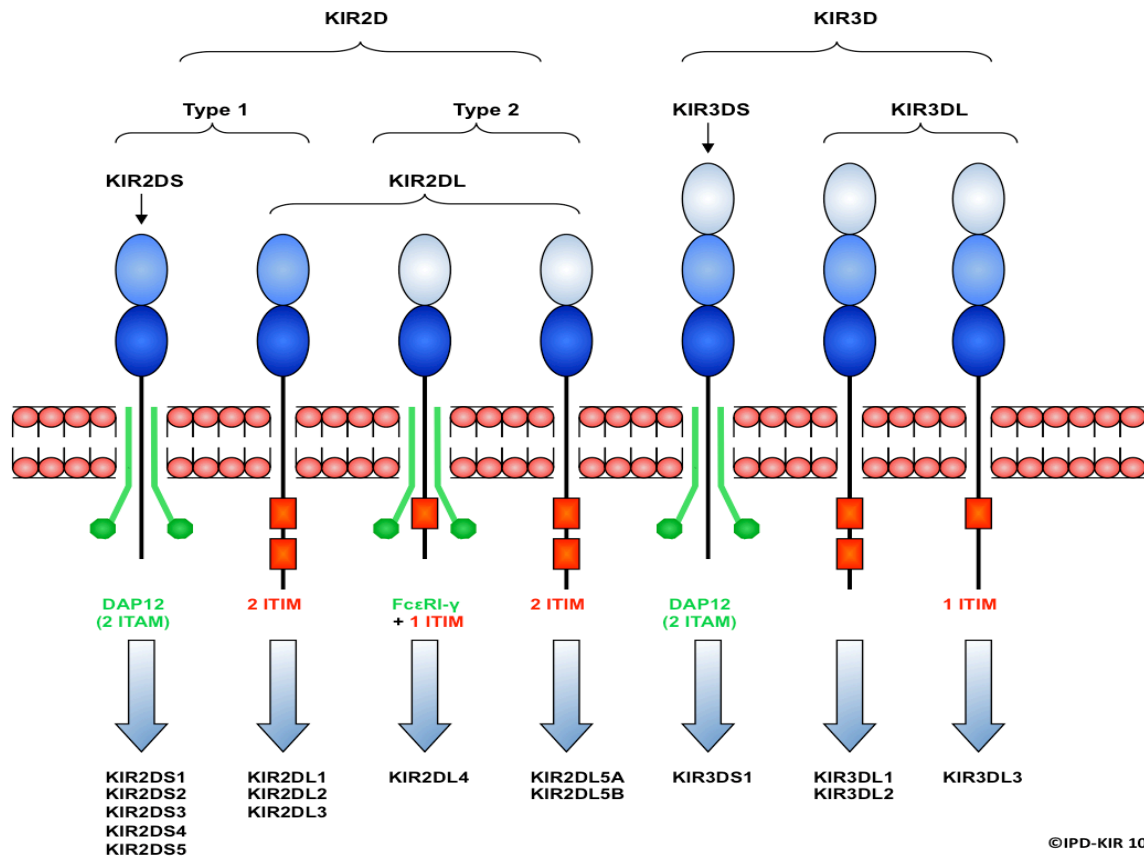


Abbildung 2: KIR-Protein-Struktur. Dargestellt sind die Unterschiede der Struktur und der Signalvermittlung der 2 oder 3 IG-ähnlichen Domänen. In Grün sind die auf die NK-Zellen aktivierenden Signalkaskaden, in Rot die hemmenden Signalkaskaden der einzelnen KIR-Proteine dargestellt. Darstellung aus IPD-KIR Database (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>).

1.2.8 KIR und ihre Liganden

Die Liganden der KIR sind Moleküle der HLA Klasse I (Vilches and Parham, 2002; Long and Rajagopalan, 2000; Sawicki et al., 2001). Treffen KIR und Liganden aufeinander, kommt es zu einer Interaktion. Nachgewiesen ist diese für die HLA-C Gruppe 2 mit KIR2DL1/KIR2DS, die HLA-C Gruppe 1 mit KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2, HLAC1/C2 mit KIR2DL2/3, HLAC2 mit KIR2DS1, HLAA11 mit KIR2DS2 (Biassoni et al., 1995; Colonna et al., 1992; Verneris and Miller, 2014). HLA-B-Liganden, die ein Bw4-Motiv enthalten, kommunizieren mit KIR3DL1. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der KIR und ihrer Liganden.

Tabelle 2: KIR-Rezeptoren und deren HLA-Liganden (nach Michaelis, 2015).

KIR				
2DL1 und 2DS1	2DL2/3 und 2DS2	3DL1 und 3DS1	3DL2	2DL4
HLA Ligand				
HLA-C Gruppe 2	HLA-C Gruppe2	HLA-B Bw4	HLA-A	HLA-G
		B*08	A*03	
C*02	C*01	B*13	A*11	
C*04	C*03	B*27		
C*05	C*07	B*44		
C*06	C*08	B*51		
		B*52		
		B*53		
		B*57		
		B*58		

1.2.9 Haplotyp A/B

Gibt es lediglich zwei aktivierende KIR (KIR2DS4 und KIR2DL4), handelt es sich um Haplotyp A. Sind weitere aktivierende KIR (KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR3DS1) vorhanden, handelt es sich um Haplotyp B. Typ B kommt mit einer Häufigkeit von ca. 70 %, Typ A mit 30 % vor (Marsh et al., 2003; Hsu et al., 2002).

Diese Einteilung in Haplotyp A/B folgt funktionellen Aspekten und führt zum B-Content-Score.

1.2.10 B-Content Score

Der BC-Score (B-Content Score) geht von 0 bis 4, wobei 0 Punkte Haplotyp A bedeuten. 1 bis 4 Punkte bedeuten ein Genmotiv eines Haplotyp B. Der Score errechnet sich aus Addition der vorhandenen B-Genmotive. Je höher die Nummer, desto mehr aktivierende KIR sind vorhanden. In Tabelle 3 wird dies systematisch dargestellt.

Tabelle 3: BC-Score-Berechnung, je nach Anzahl der B-Genmotive (Tabelle nach Cooley, 2010).

KIR Genotyp Spender	B-Content Score	Telomer	Zentromer
A	0	A/A	A/A
B	1	A/A	A/B
		A/B	A/A
	2	A/A	B/B
		A/B	A/B
		B/B	A/A
	3	A/B	B/B
		B/B	A/B
	4	B/B	B/B

Diese Einteilung hat Bedeutung, weil sie hilft Risiken für die erkrankten Kinder zu stratifizieren und die Tauglichkeit von Stammzellspendern zu beurteilen.

Sie beruht auf der Zuordnung der einzelnen Genmotive der KIR-Haplotypen zu den telomerischen oder zentromerischen Regionen innerhalb eines Chromosoms. Dabei können mehrere Kombinationen aus telomerischer und zentromerischer Genmotivverteilung zu demselben Score führen, dargestellt in Tabelle 4.

Die Scores werden bewertet: Neutral = Score 0, Better = Score 1 und 2, Best = 3 und 4 (Robinson et al., 2005; Cooley et al., 2010).

Tabelle 4: Darstellung der Telomer-/Zentromer-Genmotive. Tabelle nach Cooley et al., 2010.

Telomer-Genmotive (KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DS1, KIR2DS4)	
Tel-A/A	KIR3DL1 und 2DS4
Tel-A/B	KIR 3DL1 und 2DS4 und 3DS1 und/oder 2DS1
Tel-B/B	Kein KIR3DL1 und/oder 2DS4

Zentromer-Genmotive (KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL3)	
Zen-A/A	KIR2DL3
Zen-A/B	KIR2DL3 mit 2DS2 und/oder 2DL2
Zen-B/B	KIR2DS2 und/oder 2DL3; kein 2DL3

1.3 Stammzelltransplantation

Bei der Stammzelltransplantation (SZT) ist es das Ziel, ein neues, nicht entartetes blutbildendes System zu etablieren, das vom Empfänger nicht abgestoßen wird. Zusätzlich kommt es im besten Fall zu einem Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL). Dabei bekämpft das neue Immunsystem die noch vorhandenen Leukämiezellen (Weiden, 1979).

Die Zellspende kann autolog erfolgen. Spender und Empfänger sind dabei identisch, das „immunologische Selbst“ bleibt gleich.

Unterscheiden sich Spender und Empfänger, handelt es sich um eine allogene SZT. Der kritische Punkt bei der allogenen SZT ist die Spenderauswahl. Von ihr hängt unter anderem ab, wie das myeloablative Therapieregime durchgeführt werden muss, wie wahrscheinlich eine Abstoßungsreaktion ist. Zudem wirkt sie sich auf Ereignisfreies Überleben (EFÜ), Rückfallrate und Sterblichkeit aus.

Die SZT gehört inzwischen zur hämatologischen Praxis (Rubnitz et al., 2015)

1.3.1 Match/Mismatch

Die HLA-Merkmale und der Grad ihrer Übereinstimmung sind für die Graft-versus-Host Disease (GvHD) verantwortlich. Die Spendertypisierung ist hinsichtlich dieser Merkmale etabliert. Die Anzahl der T-Lymphozyten und das KIR-Profil sind für den GvL-Effekt verantwortlich. Somit sollte die Typisierung eines Spenders auch hinsichtlich dieser Faktoren durchgeführt werden (Handgretinger, 2010).

Erfolgt die allogene SZT in den wichtigen immunologischen Markern wie zum Beispiel HLA oder KIR ident, besteht ein sogenanntes Match. Gibt es keine Übereinstimmung, liegt ein Mismatch vor. Seit es möglich ist, durch Immunmodulation und Konditionierung auch allogenen zu transplantieren, konnte der Spenderpool auf die

Eltern als haploidente Spender erweitert werden.

Das Gleichgewicht aus positiver immunologischer Wirkung eines neuen Immunsystems und dem Abstoßungspotential ist von sehr vielen Faktoren wie zum Beispiel Alter, Geschlecht, Art der Erkrankung oder KIR-Profil abhängig. Es muss für jede einzelne Erkrankung separat erforscht und festgelegt werden (Leung et al., 2005; Oevermann et al., 2014).

Es wird versucht Algorithmen zu entwickeln, um ein möglichst günstiges Spender- und Empfängerprofil etablieren zu können (Ruggeri et al., 2002; Wang et al., 2014; Handgretinger, 2014).

1.3.2 Einfluss des KIR-Rezeptorprofils auf das Krankheitsgeschehen verschiedener Erkrankungen

Es konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Outcome einer Leukämieerkrankung und der nach NK-Zell-Rezeptoren getroffenen Spenderauswahl gibt (Cooley et al., 2010). So zeigt eine HLA-idente Spende bei einer akuten myeloischen Leukämie (AML) mit dem Genmotiv Haplotyp B ein signifikant höheres Überleben (Cooley et al., 2010). Es konnte ferner nachgewiesen werden, dass eine alloreaktive haploidente Stammzelltransplantation (HSZT) bei Patienten mit einer AML einen Vorteil für das Krankheitsgeschehen hat (Ruggeri et al., 2007).

Um einen Score für die Behandlung der Leukämien unter Berücksichtigung des KIR-Profiles zu berechnen, wurde ein Donor B-content group Calculator eingerichtet: (http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html).

Für einige Erkrankungen konnte ein Zusammenhang zwischen KIR-Profil und anderen Erkrankungen nachgewiesen werden, so etwa für die Präeklampsie (Hiby et al., 2004; Varla-Leftherioti et al., 2005), die Psoriasis-Arthritis (Martin et al., 2002b), die Rheumatoide Arthritis (Warrington et al., 2001), die Hepatitis C (Khakoo et al., 2004), die HIV-Erkrankung (Martin et al., 2002a) und für das Multiple Myelom nach einer Stammzelltransplantation (Kroger et al., 2011).

1.4 KIR-Rezeptorprofil und das Auftreten einer ALL

In diese zum Teil noch offene Forschungslage hinein veröffentlichte Almalte die Ergebnisse seiner Forschung und formulierte einen statistischen Zusammenhang zwischen einem KIR-Rezeptorprofil mit vielen aktivierenden KIR und einer geringeren Wahrscheinlichkeit, an einer kindlichen akuten lymphatischen Leukämie (ALL) zu

erkranken. Weil dieser Zusammenhang erhebliche Folgen beispielsweise für die Auswahl der Stammzellspender hätte, verdient Almaltes Forschungsergebnis nachfolgend eine vertiefende Überprüfung.

Sie besteht zum einen in einer eigenen Erfassung der molekularbiologischen Daten auf einer größeren Probandenzahl, zum anderen in der Überprüfung eines eventuellen statistischen Zusammenhangs zwischen der KIR Ausprägung und dem Auftreten einer ALL im Kindesalter beziehungsweise der Interpretation der statistischen Ergebnisse.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Gel-Elektrophorese, Submarine Agarose-GEL Unit HE33	Hoefer
Gel-Photodokumentationssystem	raytest
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr
Mikrowelle, Perfecto MW 311	DéLonghi
PCR-Cycler, CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad
Pipetten	Abimed, Discovery Comfort, Gilson, Pipetman, Eppendorf
Stromquelle, Power Pac 200	Bio-Rad
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Fisher Scientific
Vortexer: REAX 2000	Heidolph
MS1 Minishaker	JK
Wasserfilteranlage, Milli-Q	Milipore
Zentrifuge: Mini Centrifuge 5415C	Eppendorf
Rotina 420R	Hettich

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Labormaterial	Hersteller
Reaktionsgefäße, Low Tube Strip	Bio-Rad
Deckel, Flat Cap Strips Optically clear	Bio-Rad
Eppendorfröhrchen, 1,5 ml	Eppendorf
Parafilm	Pechiney
Pipettenspitzen: blau	Greiner
gelb	Mediware Servoprax
weiß	Abimed
Ultra Micro Pipette Tips	Biozym

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits.

Reagenz	Hersteller
Agarose-Tablets, SeaKem ^R LE	Bioline
GEL-Red Nucleic Acid Stain	Biotium
Ladepuffer, Orange G	Invitrogen
Primer, 100 ng/µl	eurofinsmwg operon
SybrGreen, KAPA Sybr Fast qPCR Universal Reaktionsmix	PeqLab
TBE-Puffer pH 8,0	1000 ml enthalten: 108,0 g Tris 70,9 g Borsäure 7,44 g EDTA-di-Natrium-dihydrat
Wasser	peqGOLD RNase free Water

2.1.4 Primer

Die Primersequenzen, die verwendet wurden, stammen aus den Arbeiten von Vilches et al. und Alves et al. (Alves et al., 2009, Vilches et al., 2007) und sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten KIR-Primer.

Rezeptor	Forward	Reverse	Schmelzpunkt	Amplifikat
2DL1	GTT GGT CAG ATG TCA TGT TTG AA	CCT GCC AGG TCT TGC G	81,94 °C	142 bp
2DL2	AAA CCT TCT CTC TCA GCC CA	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A	84,52 °C	142 bp
2DL3	AGA CCC TCA GGA GGT GA	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA	81,44 °C	156 bp
2DL4	TCA GGA CAA GCC CTT CTG C	GGA CAG GGA CCC CAT CTT TC	84,32 °C	131 bp
2DL5	ATC TAT CCA GGG AGG GGA G	CAT AGG GTG AGT CAT GGA G	85,46 °C	147 bp
3DL1	CCA TYG GTC CCA TGA TGC T	CCA CGA TGT CCA GGG GA	81,58 °C	108 bp
	TCC ATC GGT CCC ATG ATG TT			108 bp
3DL2	CAT GAA CGT AGG CTC CG	GAC CAC ACG CAG GGC AG	85,27 °C	131 bp
3DL3	AAT GTT GGT CAG ATG TCA G	GCY GAC AAC TCA TAG GGT A	83,87 °C	196 bp

2DS1	TCT CCA TCA GTC GCA TGA G	GGT CAC TGG GAG CTG AC	81,44 °C	96 bp
	TCT CCA TCA GTC GCA TGA A			96 bp
2DS2	TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	CCC TGC AAG GTC TTG CA	81,42 °C	110 bp
2DS3	CTT GTC CTG CAG CTC CT [2]	CCC TGC AAG GTC TTG CA	84,60 °C	157 bp
2DS4	GGT TCA GGC AGG AGA GAA T	CTG GAA TGT TCC GTK GAT G	83,25 °C	133/111 bp
2DS5	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	CTG ATA GGG GGA GTG AGT	82,92 °C	147 bp

3DS1	CAT CGG TTC CAT GAT GCG	CCA CGA TGT CCA GGG GA	82,24 °C	107 bp
	CAT CAG TTC CAT GAT GCG			

2DP1	CGA CAC TTT GCA CCT CAC	GGG AGC TGA CAA CTG ATG	83,18 °C	141 bp
3DP1f1	GTG TGG TAG GAG CCT TAG	GAA AAC GGT GTT TCG GAA TAC	85,13 °C	179 bp
3DP1f2	GTA CGT CAC CCT CCC ATG ATG TA	GAA AAC GGT GTT TCG GAA TAC	87,45 °C	398 bp

Necdin	GGC TGC ACC TGA GGC TAA	GCC CCA AAA GAA CTC GTA TTC	87,50 °C	335 bp
GALC	TTA CCC AGA GCC CTA TCG TTC T	GTC TGC CCA TCA CCA CCT ATT	78,00 °C	352 bp

2.1.5 DNA-Proben

Es wurden 328 Proben Remissions-DNA von Kindern mit ALL verwendet, die von Professor Martin Schrappe (Direktor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein) bereitgestellt wurden. Die Vergleichsgruppe bestand aus 339 Proben Remissions-DNA von Erwachsenen, die Professor Matthias Schwab (Direktor des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie am Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart) zur Verfügung stellte.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Aufbereitung

Die DNA-Proben lagen in flüssiger Form je 50 ng/µl bei einem Volumen von 10 µl in 96-Well-Platten vor. Die Proben wurden bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert, nach dem Auftauen bei 8 °C im Kühlschrank. Zunächst wurde die DNA von 10 µl auf 100 µl mit RNase freiem Wasser verdünnt. Durch Mischen mit der Pipette wurde eine gründliche Vermengung der Flüssigkeiten herbeigeführt.

2.2.2 Mastermix-Herstellung

Da jede DNA-Probe in 24 Einzeluntersuchungen amplifiziert wurde, konnte ein Mastermix aus SybrGreen, DNA und H₂O für jede Einzelprobe hergestellt werden.

Tabelle 9: Übersicht des Mastermixes.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
SybrGreen	110 µl	-
DNA	44 µl	5 ng/µl
H ₂ O	44 µl	-
Primer	0 µl	-

2.2.3 Herstellung des Ausgangsreagenz

Zur Herstellung des Ausgangsreagenz wurden je 9 µl des Mastermixes in ein Low Tube Strip pipettiert und anschließend je 1 µl KIR-spezifischer Primermix (0,5 µl Forward-Primer + 0,5 µl Reverse-Primer) der Reaktion ebenfalls mit der Pipette hinzugefügt. Anschließend wurden die Bestandteile vorsichtig vermischt. Danach wurde jedes Low Tube Stripe mit einem Deckel gründlich verschlossen, durch das Vortex-Gerät vermischt, zentrifugiert und anschließend in den PCR-Cycler gestellt. Für jede DNA-Probe wurde neben den 17 KIR-Genen H₂O als Negativkontrolle sowie Necdin und GALC als Positivkontrolle mitgeführt.

2.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Bei der quantitativen Real-Time PCR kann man Rückschlüsse auf das Amplifikat ziehen, ohne dass das entstandene Reaktionsprodukt zur Gelelektrophorese auf ein Agarosegel aufgetragen wird. Charakteristische Schmelzkurven mit einem definierten Schmelzpunkt geben Auskunft über das Vorhandensein eines Gens. In der PCR wurde als Farbstoff SybrGreen I von der Firma PEQLAB verwendet, der sich unspezifisch an ds-DNA anlagert. Steigt die Menge an ds-DNA an, erhöht sich das Signal im Verlauf der PCR-Reaktion.

Für die PCR zur KIR-Genotypisierung wurde dasselbe PCR-Protokoll sowie dasselbe Reaktionsgemisch verwendet, das später auch in der konventionellen PCR verwendet wurde (siehe 2.2.6).

Zusätzlich wurde nach jedem PCR-Schritt die Signalstärke gemessen. Nach dem letzten PCR-Zyklus erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse, indem von 75 °C beginnend die Temperatur in 0,1 °C-Schritten pro Sekunde bis 90 °C erhöht und nach jeder Erhöhung die Signalstärke gemessen wurde.

Das Protokoll für die PCR zur Bestimmung der KIR-Genotypisierung wurde von Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Mezger im Laborbereich der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen etabliert.

Tabelle 10: Übersicht des Real-Time PCR-Protokolls.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	3 min
Amplifikation	32	95 °C	3 s
		64 °C	20 s
Schmelzkurve	1	75 °C	1 s
		90 °C	0,1 °C/s
Kühlen	1	25 °C	HOLD

Eine vorhandene Schmelzkurve in entsprechender Amplifikatlänge entsprach dem Vorhandensein des KIR-Gens. Wenn die Schmelzkurve entweder nicht vorhanden oder unspezifisch war, wurde das Gen als nicht vorhanden interpretiert.

2.2.5 PCR für KIR2DS4

Für den Rezeptor KIR2DS4 stellte die PCR eine Besonderheit dar. Um das um 22 Basenpaare (bp) verkürzte Amplifikat zu differenzieren, musste das Amplifikat auf ein Agarosegel aufgetragen werden, da über die Schmelzkurvenanalyse keine Unterscheidung möglich war. Damit die DNA-Banden bei der Gelelektrophorese stark genug waren, wurde das PCR-Protokoll gegenüber dem Real-Time PCR-Protokoll modifiziert, die Anzahl der PCR-Zyklen betrug insgesamt 38 statt 32 bei der Real-Time PCR.

Tabelle 11: Übersicht für das PCR-Protokoll für KIR2DS4.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	3 min
Amplifikation	38	95 °C	3 s
		64 °C	20 s
Schmelzkurve	1	75 °C	1 s
		90 °C	0,1 °C/s
Kühlen	1	25 °C	HOLD

2.2.6 Konventionelle PCR

Für die PCR wurde das in 2.2.4 beschriebene Ausgangsreagenz verwendet, in dem alle für die PCR benötigten Reagenzien enthalten sind. Jede PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 12: Übersicht über eine PCR-Reaktion.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
SybrGreen	5 µl	-
DNA	2 µl	5 ng/µl
H ₂ O	2 µl	-
Primer	1 µl	2,5 pmol

Das PCR-Protokoll sah folgendermaßen aus:

Tabelle 13: Übersicht über das PCR-Protokoll der konventionellen PCR.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	3 min
Amplifikation	32	95 °C	3 s
		64 °C	20 s
Kühlen	1	25 °C	HOLD

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurde ein dreiprozentiges Gel unter der Verwendung von Agarosetabletten, die in TBE-Puffer gelöst wurden, hergestellt. Auf 35 ml Agaroselösung wurden 3,5 µl GelRed verwendet. Indem die Agarosesuspension in Gelkammern gegossen wurde und zwei Kämme mit zwölf Zinken eingesetzt wurden, entstand nach dem Abkühlen eine Gelplatte mit insgesamt 24 (2 x 12) Laufkammern. Die fertigen Gele wurden anschließend in die Elektrophoreseapparatur gestellt und mit kaltem TBE-Puffer umspült, bis sie vollständig mit der Flüssigkeit bedeckt waren. Anschließend wurde eine Kammer mit 7,5 µl eines DNA-Längenstandards befüllt. Die anderen elf Kammern wurden jeweils mit 10 µl Probe befüllt. Dazu mussten die PCR-Produkte mit Probenpuffer im Verhältnis 10:1 vermischt werden. Zum Mischen verwendete Materialien waren Pipetten und Parafilm. Danach folgte der Verschluss der

Elektrophoreseapparatur mit dem dazugehörigen Deckel und es wurde eine Stromquelle mit einer konstanten Spannung von 100 Volt angelegt. Nachdem das Amplifikat die gewünschte Trennstrecke von 100 bis 300 bp erreicht hatte, konnte das Gel in eine CCD-Kamera-Apparatur gelegt, fotografiert und archiviert werden.

2.2.8 Software und Statistik

Für die Datenerfassung wurde bei der Real-Time PCR die Software CFX-Manager der Firma Bio-Rad verwendet. Das Ergebnis dieser Untersuchung wurde in eine selbst entworfene Microsoft Excel-Tabelle übertragen. Ein Teil der statistischen Auswertung erfolgte mit SAS JMP durch den Verfasser. Den anderen Teil wertete Frau Dr. biol. hum. Corinna Engel am Center for Pediatric Clinical Studies, Ressort IV – Biometrie an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen aus. Geschrieben wurde die Arbeit mit Microsoft Word für Mac, Version 15.17. Die Quellenangaben für die zitierten Ergebnisse der Literaturrecherche wurden eigenhändig eingegeben. Zum Bearbeiten der Fotos wurde Adobe Photoshop benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Wahl der Methode und resultierende Probandenzahl

Es sollten mehrere Einflussfaktoren hinsichtlich des Auftretens einer kindlichen ALL untersucht werden, im Einzelnen sind diese in Abschnitt 3.4 beschrieben. Um eine multivariate Analyse der Daten durchführen zu können, wurde eine Probandenzahl von mindestens 256 berechnet. Es wurden daraufhin 328 Proben von Kindern mit einer ALL untersucht, die nach dem AIEOP-BFM-ALL 2000 Protokoll behandelt worden waren. Zum Vergleich wurden 339 Proben von gesunden Probanden untersucht (vgl. 2.1.5).

3.2 Patientencharakteristika

Die Einteilung und Verteilung der Proben der Kinder mit einer ALL ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Eigenschaften der Kinder mit ALL. Man sieht die gleiche relative Verteilung für Alter, Geschlecht und Diagnose, die sich auch in den Jahresberichten des Deutschen Kinderkrebsregisters wiederfindet. Die Chromosomenveränderung wurde erfasst, weil diese Einfluss auf Krankheitsverlauf und Therapieregime hat. Ein DNA-Index > 1 ist ein positiver prädiktiver Faktor und wurde deshalb aufgenommen (Tabelle nach Oevermann, 2015).

Charakteristika	Verteilung	
Alter		
1-10 Jahre	243	74,10%
über 10 Jahre	85	25,90%
Geschlecht		
Männlich	203	61,80%
Weiblich	125	38,10%
Diagnose		
Pro B-ALL	12	3,70%
Pre B-ALL	74	22,50%
c-ALL	179	54,60%
T-ALL	62	18,90%
unbekannt	1	0,30%
Chromosomenveränderung		
TelAml	64	19,50%
Bcr-abl	9	2,74%
Leukämie-Risiko		
niedrig	116	35,40%
mittel	151	46%
hoch	61	18,60%
ZNS-Beteiligung		
nein	301	91,80%
ja	13	3,90%
unbekannt	14	4,30%
DNA-Index		
1	173	52,70%
über 1	49	14,90%
unbekannt	106	32,30%

3.3 Durchführung der Experimente

3.3.1 PCR

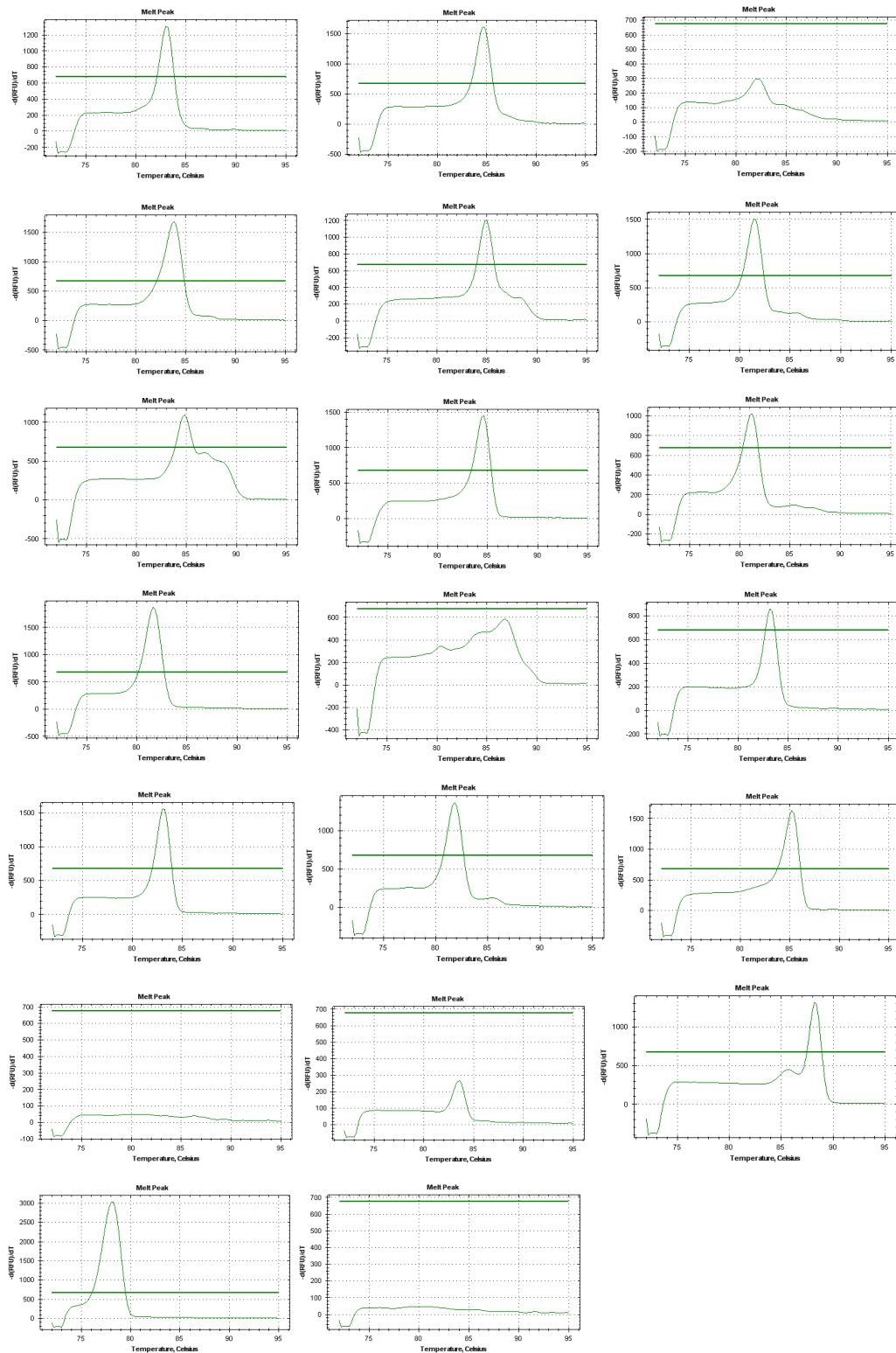


Abbildung 3: Vollständiges Rezeptorprofil einer ALL-Probe (Haplotyp B) einschließlich Positiv- und Negativkontrolle (negativ an der letzten Position, positiv an den beiden davorliegenden), gewonnen mittels Real-Time-PCR. Es ist die Temperatur gegen die log-Darstellung der Cyclerrunden dargestellt.

Um eine PCR zur KIR-Genotypisierung durchführen zu können, musste eine Aufbereitung der Proben nach dem Protokoll aus Abschnitt 2.2.1–2.2.3 erfolgen. In der PCR (Protokoll vgl. 2.2.4–2.2.6) entstand für jede Probe ein individuelles Rezeptorprofil aus Schmelzkurven. Abbildung 3 zeigt ein komplettes Rezeptorprofil eines Kindes mit ALL und einem KIR-Haplotyp B. Die letzte Kurve zeigt das Ergebnis von Wasser als Negativkontrolle, die beiden davor zeigen die Positivkontrollen mit Necdin und GALC.

3.3.2 Erfassung der Daten

Die Daten aus der Real-Time PCR wurden in einer Microsoft Excel-Tabelle erfasst (Daten nicht gezeigt). Aus den Daten in dieser Tabelle wurde für jede Probe der BC-Score und Haplotyp A/B errechnet. Es wurde die zugehörige Region (Telomer/Zentromer) für die Haplotypen erfasst (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Deletionsnachweis von KIR2DS4

Da man für KIR2DS4 eine Deletion nachweisen konnte, wurde für 308 der ALL-Proben eine Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Abbildung 4 zeigt die Banden für den Rezeptor KIR2DS4 der auf diese Art und Weise untersuchten Probanden. Bei einigen Proben zeigt sich eine Doppelbande. Das kommt zustande, weil es für KIR2DS4 zwei verschiedene Varianten gibt, eine mit einer 22 bp Deletion in Exon 5 und eine ohne (Maxwell et al., 2002). Ist der Spender der Probe heterozygot für dieses Merkmal, kommt es zur Doppelbande.

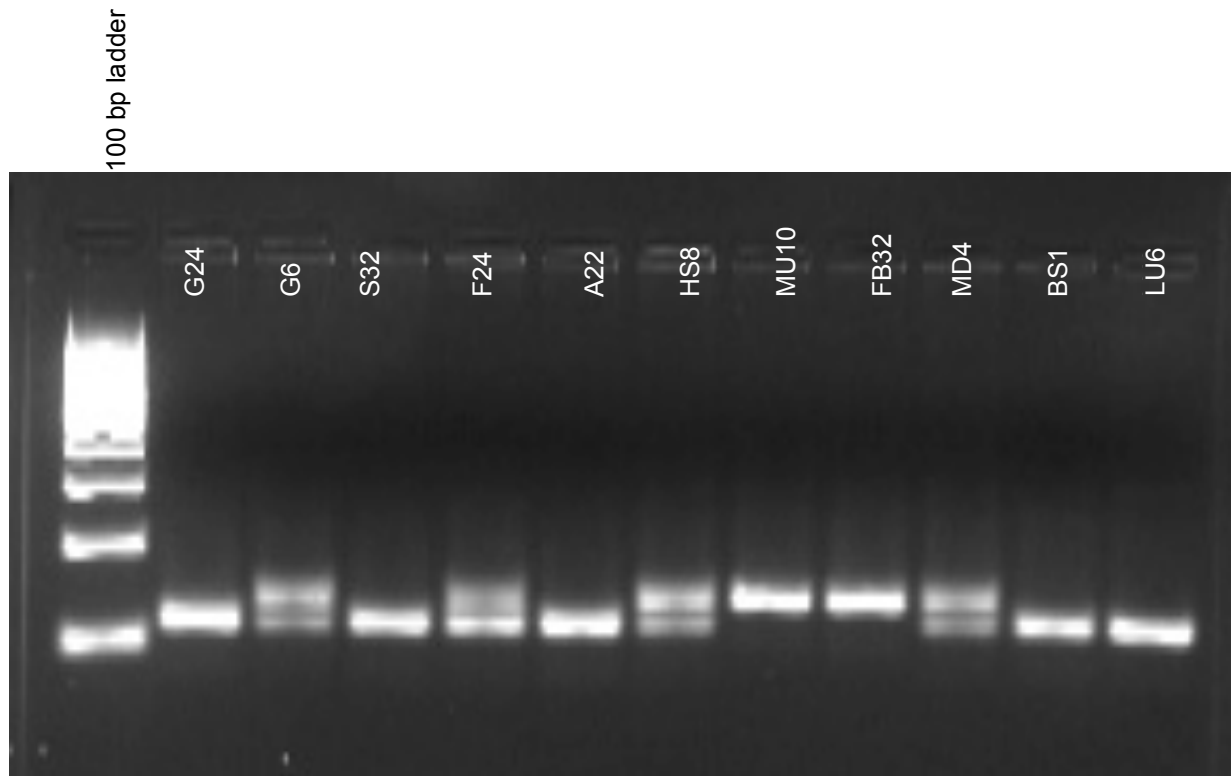


Abbildung 4: Darstellung von KIR2DS4 für elf Proben mittels Gel-Elektrophorese. Durch eine Deletion um 22 Basen-Paare im KIR2DS4-Allel kommt es zu Ausprägungen mit 133 (MU10, FB32) oder 111 (G24, S32, A22, BS1, LU6) Basen-Paaren. Bei Vorliegen einer Doppelbande (G6, F24, HS8, MD4) zeigen sich beide Ausprägungen. Links ist eine 100 Basen-Paare-Vergleichsprobe zu sehen.

3.4 Statistische Auswertung

Der Vergleich der KIR-Gene mit dem KIR Haplotyp zwischen den beiden Gruppen Krank und Kontrolle erfolgte mit einer univariaten Regressionsanalyse.

Der Vergleich der beiden Gruppen Krank/Kontrolle hinsichtlich BC-Score erfolgte mittels des Cochran-Armitage-Tests.

Ob es einen Zusammenhang zwischen dem Alter, dem Geschlecht, der Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS), dem DNA-Index, der genetischen Variante (Telomer/Zentromer), den KIR-Genen, dem KIR-Haplotyp oder dem BC-Score gab, wurde mit dem Fishers-Exakt-Test und dem Cochran-Armitage-Test überprüft.

Die Faktoren, die untersucht wurden, waren die Zielgröße Leukämiepatient/kein Leukämiepatient mit den Einflussgrößen BC-Score, KIR-Genotyp und Risiko. Unter den KIR-Genen wurden diejenigen in die erweiterte statistische Auswertung einbezogen, von deren Vorhanden- beziehungsweise Nicht-Vorhandensein eine Krankheitsausprägung abhängen kann, also die KIR mit einem aktivierenden

zytoplasmatischen Anteil: KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 und KIR2DS1. Die übrigen neun KIR-Gene und zwei Pseudogene wurden einmalig erfasst und ausgewertet.

Die Zielgröße war für alle Patienten bekannt, bei den Einflussgrößen traten nie mehr als sechs (0,01 %) fehlende Werte für einen Faktor auf.

Bei zwei Proben war die Auswertung nicht eindeutig und es wurden Korrekturen durchgeführt. Bei Probe A20 wurde KIR2DS2=0 gewertet und der BC-Score auf 0 gesetzt, bei Probe HV64 wurde der BC-Score als nicht vorhanden gewertet.

Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Verteilung der oben angeführten Einflussgrößen für die Zielgrößen. Graphische Darstellungen verdeutlichen nachfolgend ausgewählte Ergebnisse.

Tabelle 15: Verteilung der einzelnen KIRs, der KIR-Haplotypen und des B-Content-Scores zwischen der Leukämiegruppe und der Kontrollgruppe. Dargestellt in absoluten Zahlen sowie in Prozent. Für jede Einflussgröße sind Odds Ratio (OR) mit einem KI von 95 % und p-Wert angegeben.

Einflussgröße	Leukämie	Kontrolle	OR (95 % KI)	p
KIR2DS1				
ja	112 (34,1 %)	127 (37,5 %)		
nein	216 (65,9 %)	212 (62,5 %)	1,154 (0,842-1,585)	0,372
KIR2DS2				
ja	172 (52,4 %)	180 (53,1 %)		
nein	156 (47,7 %)	159 (46,9 %)	1,027 (0,758-1,392)	0,865
KIR2DS3				
ja	107 (32,6 %)	93 (27,4 %)		
nein	221 (67,4 %)	246 (72,6 %)	0,781 (0,560-1,088)	0,143
KIR2DS4				
ja	310 (94,5 %)	318 (93,8 %)		
nein	18 (5,5 %)	21 (6,2 %)	0,879 (0,460-1,681)	0,689
KIR2DS5				
ja	103 (31,4 %)	103 (30,4 %)		
nein	225 (68,6 %)	236 (69,6 %)	0,952 (0,686-1,323)	0,776
KIR3DS1				
ja	122 (37,2 %)	126 (37,2 %)		
nein	206 (62,8 %)	213 (62,8 %)	0,999 (0,730-1,368)	0,993
KIR-Haplotyp				
A	88 (26,8 %)	103 (30,4 %)		
B	240 (73,2 %)	236 (69,6 %)	0,841 (0,600-1,176)	0,3103
B-Content Score				
0	96 (29,3 %)	103 (30,4 %)		
1	128 (39,0 %)	134 (39,5 %)		
2	81 (24,7 %)	79 (23,3 %)		0,313
3	21 (6,4 %)	19 (5,6 %)		
4	2 (0,6 %)	4 (1,2 %)		
KIR2DL1				
ja	313 (95,4 %)	333 (98,2 %)		
nein	15 (4,6 %)	6 (1,8 %)	24,139 (1,018-6,941)	0,046
KIR2DL2				
ja	176 (53,7 %)	178 (52,5 %)		
nein	152 (46,3 %)	161 (47,5 %)	0,955 (0,703-1,293)	0,766
KIR2DL3				
ja	287 (87,5 %)	303 (89,4 %)		
nein	41 (12,5 %)	36 (10,6 %)	1,201 (0,746-1,934)	0,448
KIR2DL4				
ja	328 (100 %)	339 (100 %)		
nein	0 (0 %)	0 (0 %)	1,033 (0,02-52,241)	0,987
KIR2DL5				
ja	183 (55,8 %)	176 (51,9 %)		
nein	145 (44,2 %)	163 (48,1 %)	0,856 (0,631-1,160)	0,316
KIR3DL1				
ja	312 (95,1 %)	323 (95,2 %)		
nein	16 (4,9 %)	16 (4,7 %)	0,744 (0,363-1,518)	0,416
KIR3DL2				
ja	328 (100 %)	338 (99,7 %)		
nein	0 (0 %)	1 (0,3 %)	0,344 (0,014-8,463)	0,512
KIR3DL3				
ja	313 (95,4 %)	328 (96,8 %)		
nein	15 (4,6 %)	11 (3,2 %)	1,428 (0,645-3,158)	0,378
KIR2DP1				
ja	320 (97,6 %)	337 (99,4 %)		
nein	8 (2,4 %)	2 (0,59 %)	4,213 (0,888-19,988)	0,070
KIR3DP1f1				
ja	105 (32,01 %)	115 (33,9 %)		
nein	223 (67,99 %)	224 (66,08 %)	1,090 (0,788-1,505)	0,599
KIR3DLP1f2				
ja	305 (93 %)	324 (95,5 %)		
nein	23 (7 %)	15 (4,4 %)	1,629 (0,833-3,180)	0,153

3.5 Analysemodell

Da mehr als eine Einflussgröße untersucht wurde, kam von vornherein eine univariate logistische Regression zur Anwendung, bei der jeweils eine dichotome Einflussgröße gegen die Ausprägung der Zielgröße untersucht wurde.

Dabei wurden die Odds Ratio und der p-Wert berechnet. Die Nullhypothese lautete „kein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Einflussgröße und dem Auftreten einer akuten lymphatischen Leukämie.“

3.5.1 Univariate logistische Regression

Es zeigte sich für die Einflussgröße KIR-Genotyp die in Abbildung 5 dargestellte Verteilung.

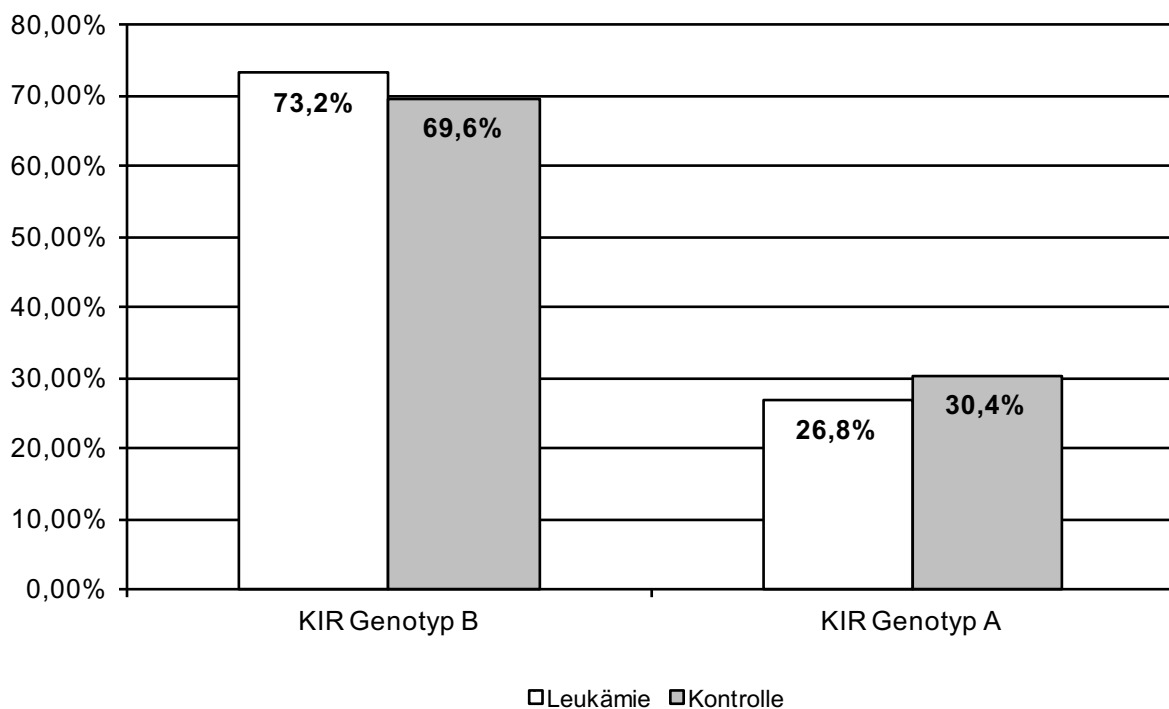


Abbildung 5: KIR-Genotypen B/A von Leukämiepatienten (weiß) und Kontrollgruppe (grau) in Prozent.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Zielgrößen Leukämiepatient/Kontrolle in Bezug auf die Merkmalsausprägung KIR-Genotyp A/B festgestellt werden. Die Odds Ratio wurde mit 0,8401 berechnet bei einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,600-1,176. Der p-Wert lag bei 0,3103.

Für die Einflussgröße KIR2DS1 ist in Abbildung 6 exemplarisch die Verteilung dargestellt.

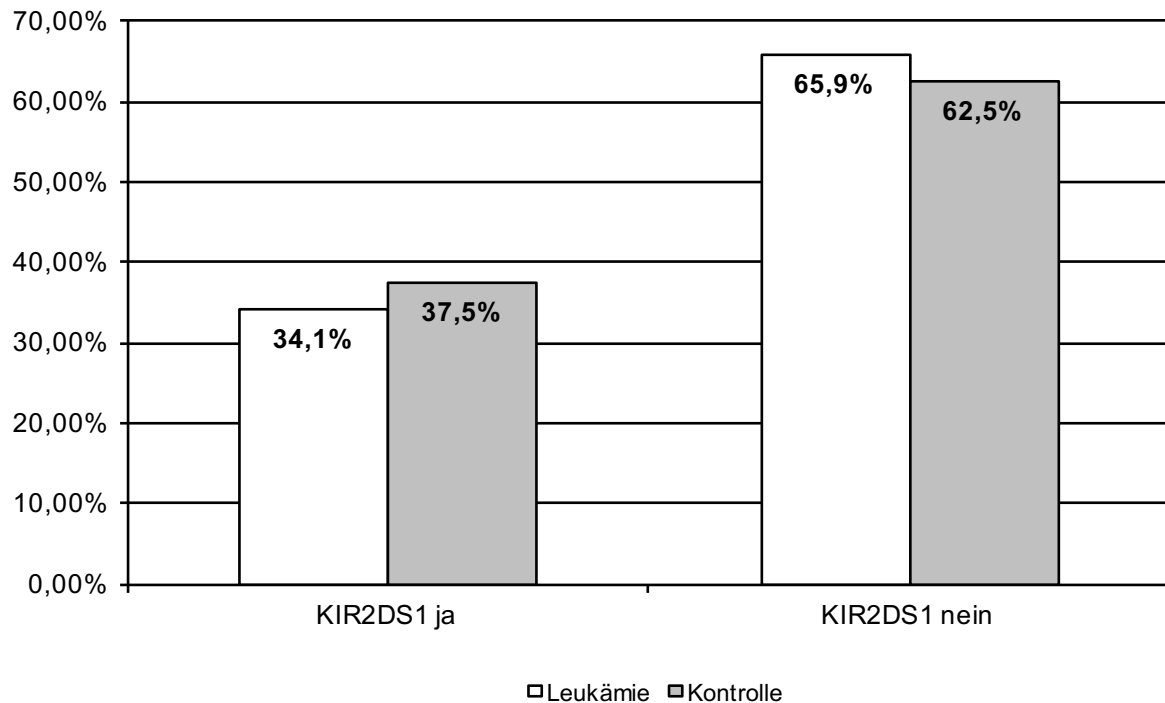


Abbildung 6: KIR2DS1-Ausprägung von Leukämiepatienten (weiß) und Kontrollgruppe (grau) in Prozent.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Zielgrößen Leukämiepatient/Kontrolle in Bezug auf die Merkmalsausprägung KIR2DS1 ja/nein festgestellt werden. Die Odds Ratio wurde mit 1,154 berechnet bei einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,842-1,585. Der p-Wert lag bei 0,372.

Für die weiteren Einflussgrößen KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1 zeigten sich ebenfalls nicht signifikant unterschiedliche Ergebnisse. Deshalb wurde auf die Darstellung im Einzelnen verzichtet.

Für die Einflussgröße BC-Score zeigte sich die in Abbildung 7 dargestellte Verteilung.

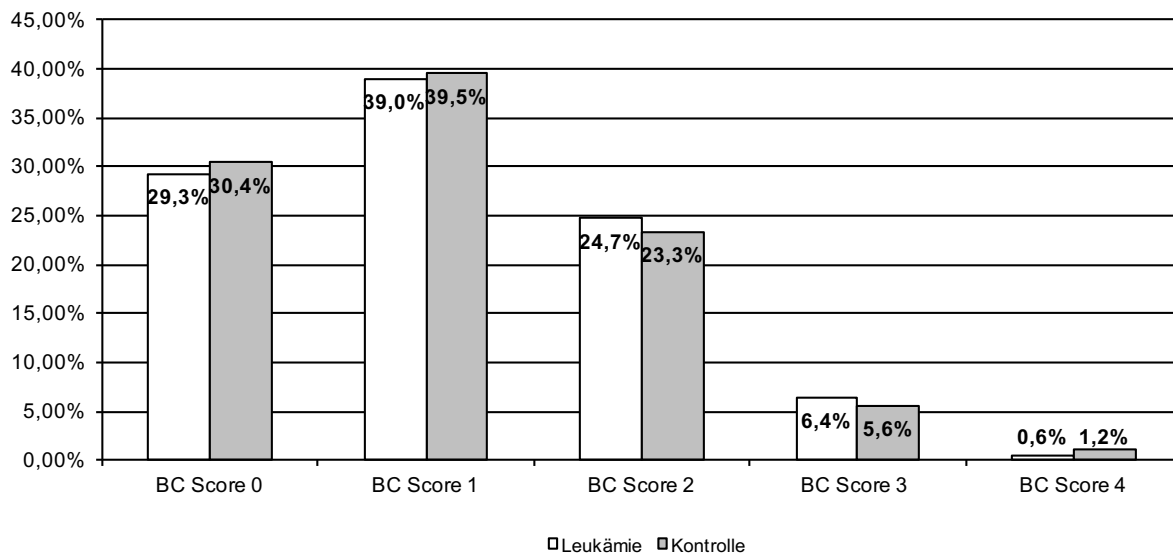


Abbildung 7: Verteilung der BC-Scores von Leukämiepatienten (weiß) und Kontrollgruppe (grau) in Prozent.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Zielgrößen Leukämiepatient/Kontrolle in Bezug auf die Merkmalsausprägung BC-Score 0-4 festgestellt werden. Der p-Wert lag bei 0,313.

In die multivariate Auswertung flossen die kollinearen Einflussgrößen auf die Zielgröße Leukämie ein, da aber in den univariaten Analysen keiner der Faktoren eine Signifikanz zeigte, kam es bei der multivariaten Auswertung erwartungsgemäß ebenfalls zu keinem signifikantem Ergebnis.

3.6 KIR-Genotypen der verschiedenen Risikogruppen

Bei der Verteilung der KIR-Genotypen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem KIR-Genotyp der Kontrollgruppe und der Leukämiegruppe, aufgeteilt in ihre einzelnen Risikogruppen Low/Medium/High (vgl. 1.1), besteht. Methodisch wurden die Prozentwerte der einzelnen Gruppen miteinander verglichen.

Die KIR-Genotyp-Verteilung ist in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt. Für keine der beiden Ausprägungen des KIR-Genotyps zeigt sich beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Leukämiegruppe ein statistischer Zusammenhang, der die These stützt, dass ein bestimmter KIR-Genotyp mit einem bestimmten Risiko einhergeht. Die Kontrollgruppe liegt jeweils zwischen den Ausprägungen der Risikogruppen.

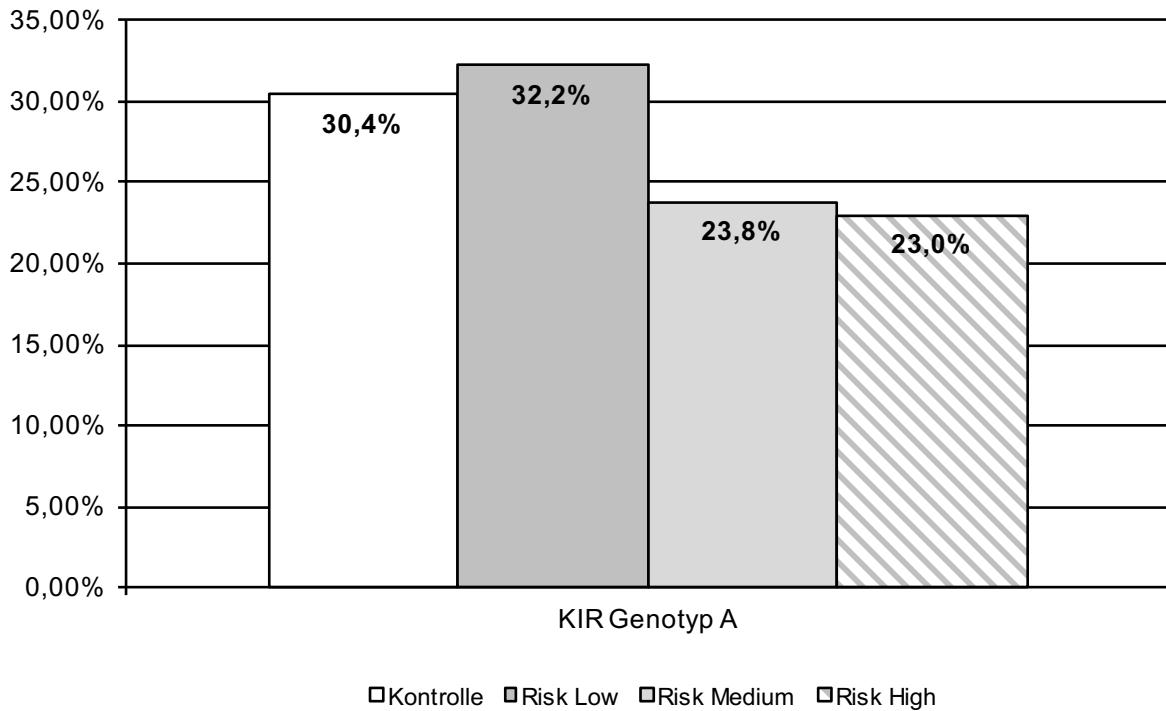


Abbildung 8: KIR-Genotyp A – alle KIR-Genotyp A-Proben, aufgeteilt in Kontrollgruppe und in der Leukämiegruppe in die einzelnen Risikogruppen Low/Medium/High, dargestellt in Prozent.

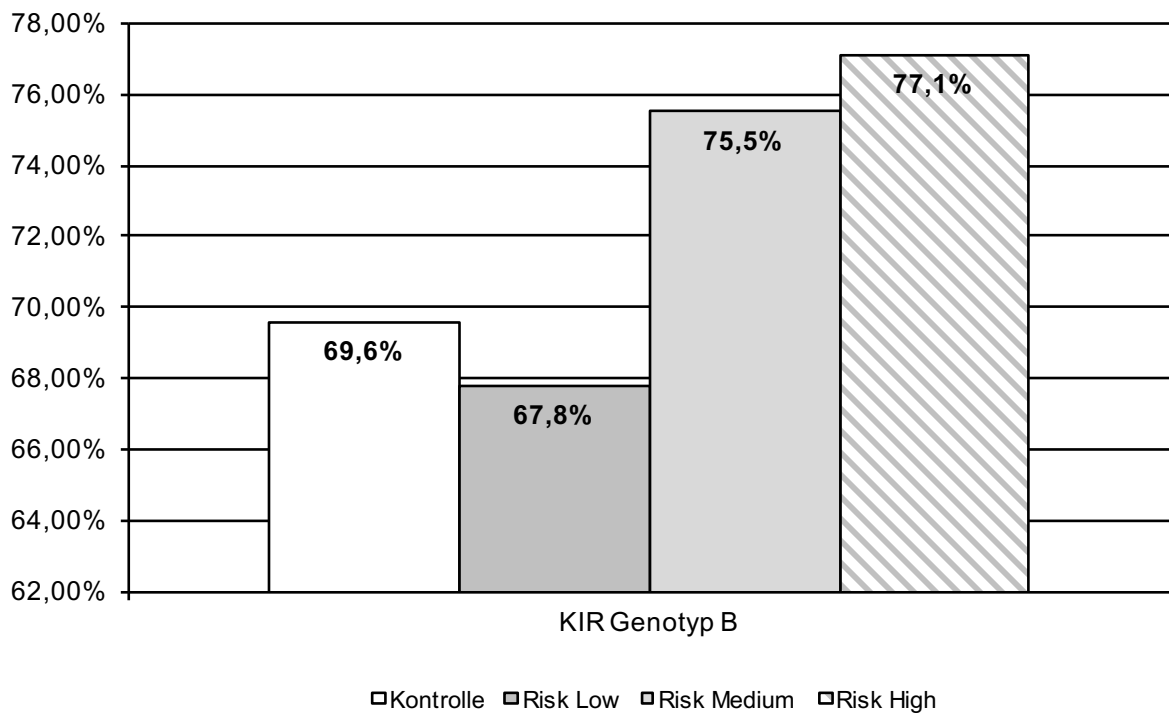


Abbildung 9: KIR-Genotyp B – alle KIR-Genotyp B-Proben, aufgeteilt in Kontrollgruppe und in der Leukämiegruppe in die einzelnen Risikogruppen Low/Medium/High, dargestellt in Prozent.

3.7 Rezeptorprofile der Risikogruppen

Es wurde die Verteilung der einzelnen KIR, die in die Auswertung einbezogen wurden (vgl. Abschnitt 3.4), in Bezug auf die Risikogruppen auf einen statistischen Zusammenhang hin untersucht.

3.7.1 KIR2DS5/KIR3DS1, KIR2DS2, KIR2DS3/KIR2DS4

Beim Vergleich der Risikogruppen für KIR2D25 und KIR3DS1 lässt sich zwar zunächst ein leichter Trend bei der Ausprägung vorhanden/nicht vorhanden dieser zwei KIRs ablesen, der die Aussage unterstützen würde, dass das Vorhandensein eines der beiden Rezeptoren mit der Einteilung in eine niedrigere Risikogruppe einhergeht. Bezieht man die Werte der Kontrollgruppe mit ein, liegen sie stets zwischen denen der Risikogruppen. Damit ist keine Tendaussage mehr möglich. Abbildung 10 verdeutlicht dies am Beispiel von KIR3DS1.

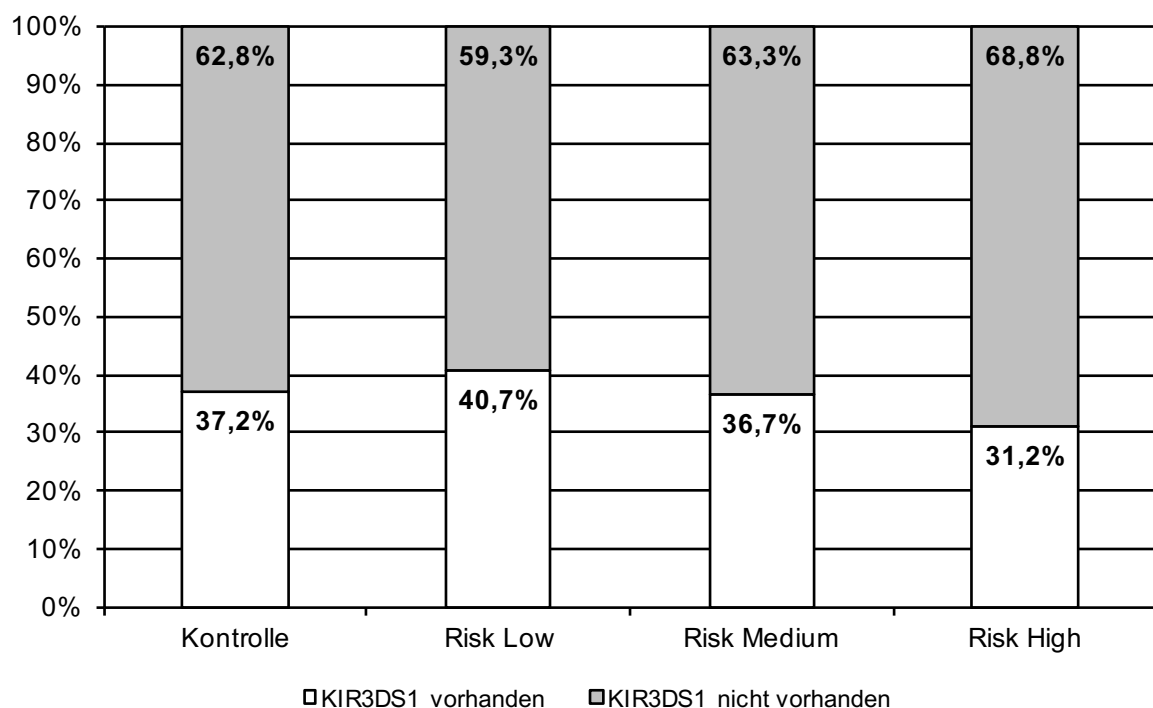


Abbildung 10: Im Vergleich der Risikogruppen untereinander zeigt sich ein Trend hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Rezeptorausprägung für KIR3DS1: Der Anteil derjenigen, die den Rezeptor haben, nimmt von Risikogruppe Low zu High ab. Der Anteil der Kontrollgruppe liegt jedoch dazwischen.

Gleiches gilt für KIR2DS2 (vgl. Abbildung 11), wobei hier der Trend in die umgekehrte Richtung geht und das Vorhandensein des Rezeptors mit der Einteilung in eine höhere Risikogruppe einhergeht.

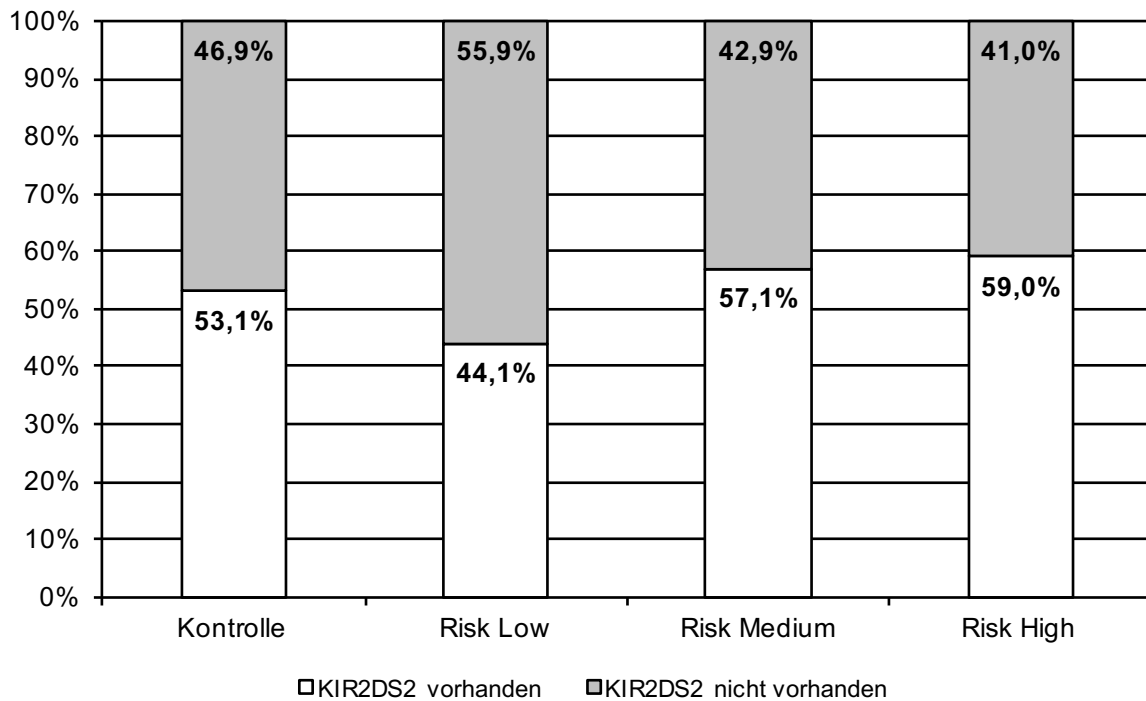


Abbildung 11: Im Vergleich der Risikogruppen untereinander zeigt sich ein Trend hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Rezeptorausprägung für KIR2DS2: Der Anteil derjenigen, die den Rezeptor haben, nimmt von Risikogruppe Low zu High zu. Der Anteil der Kontrollgruppe liegt jedoch dazwischen.

Bei KIR2DS3 und KIR2DS4 kam es in keiner Ausprägung zu einem in einer Reihe darstellbaren Ergebnis, wie Abbildung 12 am Beispiel von KIR2DS3 zeigt.

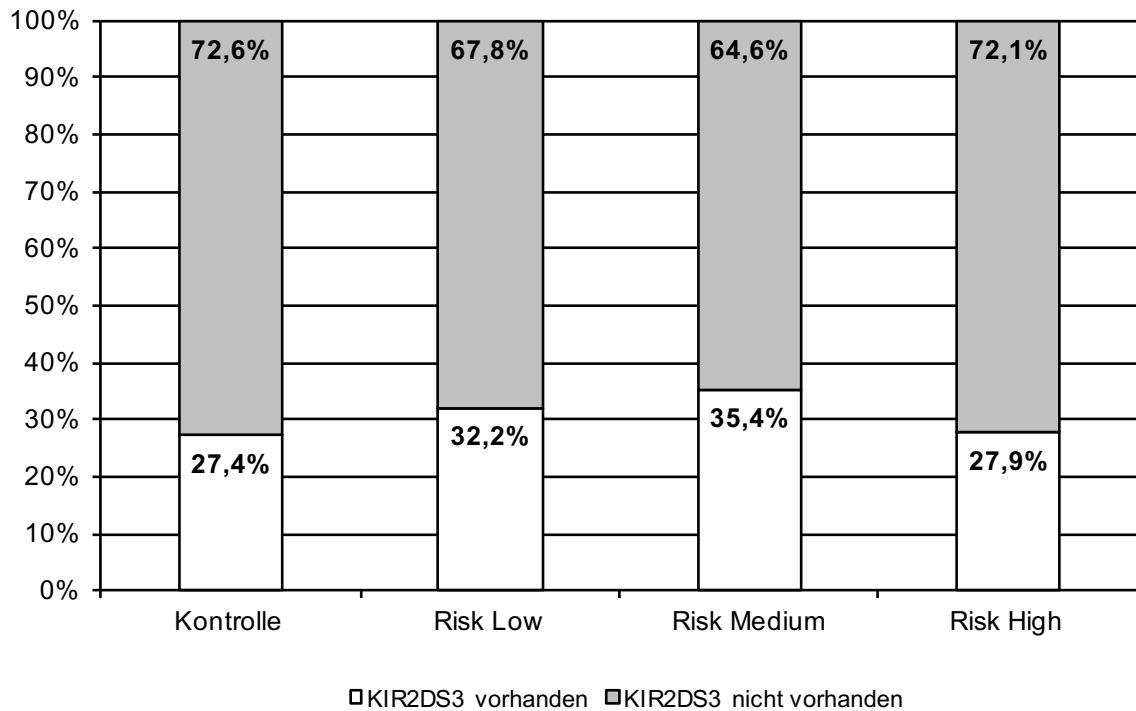


Abbildung 12: Es zeigt sich weder im Vergleich der Risikogruppen untereinander noch im Vergleich der Risikogruppen mit der Kontrollgruppe ein Trend hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Rezeptorausprägung für KIR2DS3.

3.7.2 Sonderfall KIR2DS1

Die Besonderheit von KIR2DS1 bestand in der Abnahme des Prozentanteils des Rezeptors bei Gesunden (Kontrollgruppe) über Risikogruppe Low und Medium zu High. Damit stützt der Trend für dieses Rezeptorprofil die These, dass ein Zusammenhang zwischen der KIR-Ausprägung und dem Risiko für das Auftreten einer ALL besteht. KIR2DS1 ist das einzige der Rezeptorprofile, das in dieser Art und Weise dargestellt werden konnte (vgl. Abbildung 13). Es ist jedoch zu beachten, dass es sich hier lediglich um einen Trend ohne statistische Signifikanz handelt.

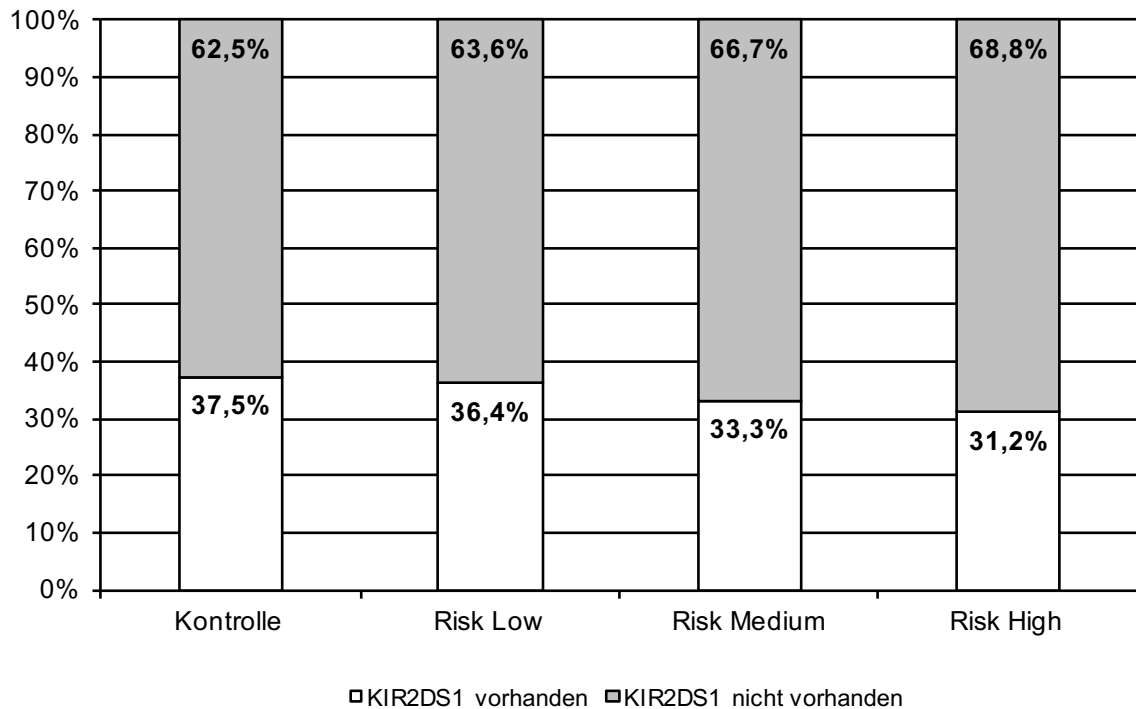


Abbildung 13: Im Vergleich der Risikogruppen untereinander zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter Trend hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Rezeptorausprägung für KIR2DS1: Der Anteil derjenigen, die den Rezeptor haben, nimmt von Kontrollgruppe über Risikogruppe Low zu High ab.

3.8 Beobachtete KIR-Kombinationen innerhalb der verschiedenen Risikogruppen

Um zu prüfen, ob bestimmte KIR-Kombinationen für die verschiedenen Risikogruppen charakteristisch sind, wurden die häufigsten vier Rezeptor-Kombinationen in den verschiedenen Gruppen zusammengestellt und miteinander verglichen (Daten nicht gezeigt).

Dabei konnte kein Zusammenhang der Kombinationen innerhalb der einzelnen Risikogruppen und auch in Bezug auf die Kontrollgruppe festgestellt werden.

3.8.1 Anzahl aktivierender KIRs und Auftreten einer ALL

Um zu prüfen, ob zwischen der reinen Anzahl aktivierender KIRs und dem Auftreten einer ALL ein Zusammenhang besteht, wurden die Daten von Kontroll- und Probandengruppe gegenübergestellt.

Wie Tabelle 16 zeigt, konnte kein entsprechender Zusammenhang festgestellt werden. Dieses Ergebnis untermauert die zuvor dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 16: Zahl der aktivierenden KIR in Bezug auf Leukämie/keine Leukämie. Dargestellt in absoluten Zahlen. Für jede Einflussgröße sind Odds Ratio (OR) mit einem KI von 95 % und p-Wert angegeben.

Zahl der aktivierenden KIR	Leukämie	Keine Leukämie	Gesamt	OR (95 % CI)	p
kleiner = 1	101	104	205	1,0054 (0,7235-1,3971)	0,9745
2 bis 3	113	114	227	1,0373 (0,7530-1,4291)	0,8226
über/= 4	114	121	235	0,9598 (0,6984-1,3189)	0,8000
Gesamt	328	339	667		

4 Diskussion

4.1 KIR-Profil und kindliche ALL

Bisher ist unklar, warum ein Kind an einer ALL erkrankt und ein anderes nicht. Bei der ALL wird ein malignes Zellwachstum beobachtet. Es besteht eine Unfähigkeit des Immunsystems, diese entarteten Zellen zu vernichten. Wie gut das Immunsystem eines Kindes Tumorzellen bekämpft, kann – neben anderen Faktoren - genetisch bedingt sein. Ein mögliches genetisches Korrelat stellen die KIR dar (Verneris and Miller, 2014; Oevermann et al., 2014).

Dass eine Kombination aus dem Vorhandensein eines KIR und eines bestimmten Liganden mit dem Auftreten von Leukämien im Erwachsenenalter assoziiert ist, wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen (Giebel et al.; 2008; Verneris et al.; 2014; Cooley et al., 2014). Dass ferner der Polymorphismus der KIR eine Rolle bei der Entstehung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) und der ALL des Erwachsenen spielen kann, legt eine Arbeit von Zhang nahe (Zhang et al., 2010).

Für die kindliche B-ALL hat Babor eine Korrelation zwischen dem Auftreten einer Erkrankung und dem Vorhandensein von KIR2DL1 und dem Ligand HLAC2 festgestellt. Auch die Rückfallrate bei vorhandenem HLAC2 schien höher zu sein (Babor et al., 2014).

Durch derartige Erkenntnisse können neue Therapien entwickelt oder bestehende angepasst werden, so dass es zu einem besseren Outcome für die Patienten nach einer Krankheitsmanifestation und einer angepassten Behandlung kommt. Oevermann konnte an Kindern mit einer ALL zeigen, dass eine KIR-Haplotyp-B-selektierte Spenderauswahl bei der SZT einen positiven Einfluss auf das EFÜ und das Risiko eines Rückfalls hat (Oevermann et al., 2014). Für die AML des Erwachsenen konnten seit der Anpassung der Therapien bereits bessere Ergebnisse nachgewiesen werden (Cooley et al., 2009; Cooley et al., 2010). Dabei gilt es allerdings zu beachten, dass es sich sowohl bei Oevermann, als auch bei Cooley um Kinder handelte die bereits eine SZT erhalten hatten. Für das Multiple Myelom (Kroger et al., 2011) und nochmals für die ALL und die AML des Erwachsenen (Zhou et al., 2014) wurden ebenfalls von bessern Therapieergebnissen nach einer KIR-angepassten SZT berichtet.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem KIR-Profil und einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer ALL im Kindesalter gibt.

4.2 Kritische Beurteilung der angewandten Studiendesigns

Almalte stellte einen statistischen Zusammenhang zwischen einer höheren Zahl an aktivierenden KIR, insbesondere KIR2DS2, und einem geringeren Risiko für das Auftreten einer ALL fest (Almalte et al., 2011). Babor hingegen kam zu dem Schluss, dass kein Zusammenhang zwischen der KIR-Ausprägung und dem Risiko für das Auftreten einer ALL besteht (Babor et al., 2012). Babor verwendete zwar eine ähnlich große Zahl an Probanden (B-ALL n = 185; T-ALL n = 33) wie Almalte (B-ALL n = 145; T-ALL n = 30), er rechnete allerdings mit einer anderen Methode und bezog nicht nur die sechs aktivierenden KIR in die statistische Auswertung mit ein, sondern das gesamte KIR-Profil. Es scheint einleuchtend, dass eine andere statistische Methodik ein anderes Ergebnis liefert. Auch kann das Miteinbeziehen des gesamten KIR-Profiles zu einer veränderten Auswertung geführt haben.

Ferner enthielt die Auswertung von Almalte eine ungewöhnlich hohe Zahl an KIR2DS5 verglichen mit den Daten aus dem Allele Frequency Net (www.allelefrequencies.net). Die abweichenden Ergebnisse von Almalte könnten damit zusammenhängen, dass die Anzahl der untersuchten Proben für die angewendete Methode zu klein gewesen ist. Letztlich bleibt die Ursache für das erhöhte Vorkommen von KIR2DS5 bei Almalte jedoch ungeklärt.

Da es sich bei der Untersuchung von mehreren Faktoren über einen statistischen Zusammenhangs um eine multivariate Auswertung handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Testgröße entsprechend angepasst und lag damit deutlich und ausreichend höher als in der Untersuchung von Almalte.

4.3 Einordnung der Patientendaten in die Literatur

Bei der Zusammenstellung der Patientenmerkmale stimmte in der vorliegenden Arbeit die Häufigkeit der Merkmale mit denen des Deutschen Kinderkrebsregisters überein. Die Merkmale, die Almalte berücksichtigte, unterschieden sich in zwei Punkten von denen in der vorliegenden Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte keine Differenzierung nach der Ethnie. Das könnte bei dieser Untersuchung dann eine Rolle spielen, wenn sehr viele Kinder in der

untersuchten Gruppe spanischer Abstammung wären. Denn bei dieser Ethnie herrscht das Rezeptorprofil KIR A/A vor (de Smith et al., 2014). Es ist allerdings sehr unwahrscheinlich, dass eine relevante Menge an Kindern rein spanischer Epigenetik im untersuchten Patientenkollektiv vorhanden ist, das ausschließlich in Deutschland generiert wurde. Ein weiteres Beispiel für ein mit der Ethnie in Zusammenhang stehendes KIR-Profil ist das türkischstämmiger Erwachsener, und zwar in Bezug auf Morbus Behçet (Middleton et al., 2007, Erer et al., 2016). Für weitere Arbeiten wäre es daher ein möglicher Ansatzpunkt, Kinder mit ALL nach ihrer ethnischen Abstammung auf ihr KIR-Profil hin zu untersuchen.

Auch das Patientenmerkmal, ob schon ein Rückfall bestanden hat oder nicht, wurde in die vorliegende Arbeit nicht einbezogen. Dieses Merkmal ist zwar für das Outcome einer ALL im Kindesalter ein wesentlicher Faktor, auf die Pathogenese der ALL in Bezug auf das KIR-Profil kann es aber logischerweise keinen Einfluss haben.

4.4 Auswertungskonzept

In die Auswertung einbezogen wurden als Einflussgrößen der BC-Score, der KIR-Genotyp, die sechs aktivierenden KIRs und die Risikogruppe. Da es dringende Hinweise darauf gibt, dass lediglich die sechs aktivierenden KIRs und nicht alle 17 KIRs Einfluss auf die Immunreaktion des Körpers auf Tumorzellen haben, wurden auch nur diese mit in die statistische Auswertung aufgenommen. Zusätzlich war durch das ähnliche Merkmalsprofil wie in Almaltes Arbeit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sichergestellt. Schon in der univariaten Auswertung zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem KIR-Profil und dem Auftreten einer kindlichen ALL. In der multivariaten Auswertung konnte kein statistischer Zusammenhang hergestellt werden.

Kritisch ist darauf hinzuweisen, dass die Vergleichsproben der Gesunden von Erwachsenen stammen. Das könnte für weitere Untersuchungen von Bedeutung sein, weil man bereits gesehen hat, dass es Unterschiede bei der Expression der Rezeptorausprägung zwischen Erwachsenen und Kindern gibt (Feuchtinger et al., 2009). Die unterschiedlich starke Expression zwischen Erwachsenen und Kindern kann allerdings von Umwelteinflüssen abhängen. Am Beispiel des mTOR konnte dieses Phänomen gut nachgewiesen werden (Hay and Sonnenberg, 2004).

Auch spielen Polymorphismen bei der Expression eine Rolle. So ist davon auszugehen, dass ca. 15 % der Untersuchten einen Polymorphismus für KIR3DL1

haben. Leung konnte für diesen Anteil der Untersuchten den Rezeptor auf DNA-Ebene nachweisen, nicht jedoch als messenger Ribonukleinsäure (mRNA) (Leung et al., 2005). Der Polymorphismus gilt als eine mögliche Ursache für die höchst unterschiedliche phänotypische Rezeptorausprägung (Babor et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit spielte KIR3DL1 allerdings keine Rolle, da es sich um einen inhibierenden Rezeptor handelt, dem bei der Pathogenese der kindlichen ALL keine entscheidende Rolle zugeschrieben wird. Daher floss er nicht mit in die Auswertung mit ein.

4.5 Die Bedeutung von KIR2DS1 für die kindliche Leukämie

Lediglich der Rezeptor KIR2DS1 zeigte statistisch einen Trend zu der Aussage, dass es einen Zusammenhang zwischen dem KIR-Profil und dem Auftreten einer kindlichen ALL geben könnte. Es konnte allerdings keine statistische Signifikanz festgestellt werden. Aufgrund der Kohortengröße ist es jedoch unwahrscheinlich, dass dieser Trend zufällig auftritt.

Eine mögliche Erklärung für diesen Trend, der bisher nur bei der kindlichen ALL nachgewiesen wurde, ist die Tatsache, dass kindliche Leukämieblasten eine andere Expression von KIR-Liganden haben als die von Erwachsenen.

Es gibt inzwischen Arbeiten darüber, dass es nicht nur das KIR-Profil ist, das mit dem Auftreten bestimmter Erkrankungen assoziiert ist, sondern vielmehr die Kombination aus vorhandenen KIR und ihren Liganden (Babor et al., 2014; Cooley et al., 2014). So könnte es auch bei dieser Rezeptorausprägung sein, dass das alleinige Beobachten der KIR-Ausprägung ein zu einfaches Vorgehen ist.

Es geht aber aus einer anderen Untersuchung hervor, dass KIR2DS1 durchaus eine spezifische Rolle spielt. So konnte Venstrom für einen KIR2DS1-positiven Patientenstatus verminderte Rückfallquoten bei der AML des Erwachsenen aufzeigen. Er untersuchte AML-Patienten, die eine allogene Transplantation von KIR2DS1-positiven Spendern erhalten hatten. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass diese Patienten eine geringere Rückfallrate im Vergleich zu KIR2DS1-negativen Spenden hatten (Venstrom et al., 2012).

4.6 Die klinische Relevanz des KIR-Liganden-Modells

Es gibt inzwischen für verschiedene Erkrankungen den Nachweis, dass entweder ihr Auftreten von einem bestimmten KIR-Profil oder aber das Outcome nach einer Therapie von dem vorhandenen oder zur Therapie verwendeten KIR-Profil abhängt.

Beispiele mit einem Zusammenhang zwischen KIR-Profil und einer höheren Wahrscheinlichkeit einer Krankheitsmanifestation sind die Präeklampsie (Hiby et al., 2004; Varla-Leftherioti et al., 2005), die Psoriasis-Arthritis (Martin et al., 2002b), die Rheumatoide Arthritis (Warrington et al., 2001), die Hepatitis C (Khakoo et al., 2004), die HIV-Erkrankung (Martin et al., 2002a).

Beispiele für ein besseres Outcome nach einer KIR-Haplotyp B selektierten Stammzelltransplantation sind das Multiple Myelom des Erwachsenen (Kroger et al., 2011; Zhou et al., 2014) oder die AML des Erwachsenen (Cooley et al., 2009; Cooley et al., 2010; Cooley et al., 2014).

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Zusammenhangs zwischen dem KIR-Rezeptorprofil und dem Auftreten einer ALL im Kindesalter. Es zeigte sich eindrücklich (vgl. Tabelle 16), dass es keinen Hinweis auf einen solchen Zusammenhang gibt. Auch in Almaltes Arbeit ist kein signifikanter Zusammenhang ersichtlich (Almalte et al., 2011), wie auch dort die univariate tabellarische Aufbereitung der Daten zum Thema zeigt.

Bei den Untersuchungen zu den KIR wurde deutlich, dass die Funktionsweise komplex ist und viele Einflussfaktoren beim Auftreten einer ALL im Kindesalter eine Rolle spielen. Zum Beispiel zeigte sich, dass es für die gleiche Erkrankung durchaus einen Unterschied macht, ob es sich um Kinder oder Erwachsene handelt. Die KIR-Expression scheint sich im Laufe des Lebens zu verändern. Das Outcome nach einer allogenen SZT mit dem KIR-Haplotyp B verbessert sich bei Kindern (Michaelis, 2015), für Erwachsene dagegen konnte kein Einfluss nachgewiesen werden (Cooley et al., 2010).

Ruggeri hat ein Modell entwickelt, um die Alloreaktivität vorhersagen zu können (Ruggeri et al., 2002). Aufgrund des komplexen Zusammenspiels zwischen KIR und ihren Liganden ist dieses Modell allerdings nur sehr bedingt für eine Vorhersage geeignet. Cooley entwickelte ein praktikables Modell. Dabei werden den aktivierenden KIR bessere alloreaktive NK-Zell-Effekte zugeschrieben (Cooley et al., 2010).

Die Relevanz der Forschung an den KIR kann man auch am derzeitigen Procedere der Stammzellspende bei der DKMS sehen. So ist es inzwischen üblich, nach der

ersten Typisierung bei positivem HLA-Match eine weitere Typisierung hinsichtlich des KIR-Profiles vorzunehmen.

Hätte diese Arbeit einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem KIR-Rezeptorprofil und dem Auftreten einer ALL im Kindesalter nachweisen können, wäre die Screeninguntersuchung in Familien, in denen es bereits eine Leukämieerkrankung gibt, eine sich daraus ergebende Konsequenz. Auch bei anderen Erkrankungen die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine Leukämieerkrankung einhergehen, z. B. Trisomie 21, hätte man Screeninguntersuchungen starten können. Die Ergebnisse hätten den Vorteil gehabt, entsprechenden Screeningabständen die Veränderung des Risikos im Zeitablauf zuordnen zu können. Damit wäre die Wahrscheinlichkeit gestiegen, eine Erkrankung früher diagnostizieren und damit mit mehr Aussicht auf Erfolg behandeln zu können.

4.7 Ausblick

Die Pathogenese der kindlichen ALL zu kennen, bedeutet einen erheblichen Vorteil für die Behandlung der kindlichen ALL. Die Heilungschancen steigen und die Therapien können schonender angewandt werden. Die Klärung der Pathogenese der kindlichen ALL hat aber auch Vorteile für die gesamte Gesundheitsversorgung: so sind die Kinder unter einer der intensiven Therapien sehr häufig immunsupprimiert. Dies führt sehr häufig zu sehr langen antibiotischen Therapien. Diese stellen ein hohes Risiko für die Resistenzbildung von Keimen dar, die dann nicht nur die kleinen ALL-Patienten bedrohen (Manns, 2016). Es ist also nicht nur im Interesse des Kindes und der Familie, eine möglichst zielgerichtete Therapie anbieten zu können, sondern auch im Interesse der Allgemeinheit.

In der vorliegenden Arbeit wurde für eine ausreichend große Kohorte gezeigt, dass es kein bestimmtes KIR-Profil gibt, das ein Auftreten einer ALL im Kindesalter wahrscheinlicher macht. Die aktuellen Forschungen an KIR zeigen jedoch, dass die KIR mit dem Auftreten der kindlichen ALL trotzdem zu tun haben könnten, nur eben nicht alleine. Deshalb sollte man sich in weiteren Forschungen auf die Liganden der KIR, deren Ausprägung und die Wechselwirkung mit den KIR konzentrieren.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich ein statistischer Zusammenhang zwischen einem bestimmten KIR-Profil und dem Auftreten einer ALL im Kindesalter herstellen lässt. Ein solcher Zusammenhang, der einen prognostischen Marker liefern würde, lässt sich nicht herstellen. Unabhängig davon spielt allerdings das KIR-Profil bei der Spenderauswahl im Falle einer Stammzelltransplantation eine wichtige Rolle. KIR A hat mit KIR2DS4 nur einen für die NK-Zellen aktivierenden Rezeptor, KIR B ist gekennzeichnet durch eine höhere Anzahl an aktivierenden KIRs. Es gibt Hinweise darauf, dass eine solche höhere Anzahl mit einer besseren Immunreaktion einhergeht. Für einige immunologische Erkrankungen konnte ein positiver Krankheitsverlauf für den Haplotyp B gezeigt werden. Insbesondere bei der SZT bei einer AML spielt die KIR-Genotypisierung von Spender und Empfänger bereits eine Rolle in der Therapie. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, den von Almalte formulierten statistischen Zusammenhang zwischen der Anzahl aktivierender KIRs und dem Auftreten kindlicher Leukämien zu überprüfen. Da die Probandenzahl in der Arbeit von Almalte niedrig angesetzt war, wurde in der vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk darauf gerichtet, diese in einer Größe zu wählen, mit der nach Durchführung der Laboruntersuchungen eine zuverlässige statistische Aussage getroffen werden konnte. Um dies zu erreichen, wurde eine Probandenzahl von 256 als nötig berechnet. Untersucht wurden 328 Proben von Kindern mit einer ALL, verglichen mit 339 Proben von gesunden Erwachsenen.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit fanden mittels einer Real-Time PCR statt. Das entsprechende Protokoll wurde am Chimärismus-Labor der Kinderklinik Tübingen etabliert und liefert sehr zuverlässige Ergebnisse. Die statistische Auswertung erfolgte mittels univariater logistischer Regression sowie multivariater Analysemethoden.

Das Ergebnis zeigt keinen Zusammenhang zwischen einem bestimmten KIR-Profil und einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer ALL im Kindesalter und widerspricht dem Ergebnis der Arbeit von Almalte.

Zu den Faktoren, die möglicherweise die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beeinflussen, gehört die Vergleichbarkeit der Proben von Kindern und Erwachsenen aufgrund der unterschiedlichen Leukämieblastenausstattung sowie die epigenetische Zusammensetzung der Stichprobe. Es erscheint sinnvoll, diese Aspekte in künftigen Arbeiten weiter zu klären.

6 Literaturverzeichnis

Almalte, Z., Samarani, S., Iannello, A., Debbeche, O., Duval, M., Infante-Rivard, C., Amre, D. K., Sinnett, D. & Ahmad, A. 2011. Novel association between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia. *Blood*, 118, 1323-8.

Alves, L. G., Rajalingam, R. and Canavez, F. 2009. A novel real-time PCR method for genotyping. *Tissue Antigens*, 73: 188-91.

Azzoni L., Papasavvas, E., Chehimi, J., Kostman, J. R., Mounzer, K., Ondercin, J., Perussia, B., Montaner, L. J. 2002. Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J Immunol* 168, 5764-70.

Babor, F., Manser, A., Schonberg, K., Enczmann, J., Borkhardt, A., Meisel, R. & Uhrberg, M. 2012. Lack of association between KIR genes and acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*, 120, 2770-2; author reply 2772

Babor, F., Fischer, J. C., Uhrberg, M. 2013. The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. *Front Immunol*, 4:27.

Babor F., Manser, A. R., Fischer, J. C., Scherenschlich, N., Enczmann, J., Chazara, O., Moffett, A., Borkhardt, A., Meisel, R. and Uhrberg, M. 2014. KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse. *Blood*, 124: 2248-51.

Biassoni, R., Falco, M., Cambiaggi, A., Costa, P., Verdiani, S., Pende, D., Conte, R., Di Donato, C., Parham, P. & Moretta, L. 1995. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group-1" NK clones. *The journal of experimental medicine*, 182, 605-9.

Colonna, M., Spies, T., Strominger, J. L., Ciccone, E., Moretta, A., Moretta, L., Pende, D. & Viale, O. 1992. Alloantigen recognition by two human natural killer cell clones is associated with HLA-C or a closelylinked gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 7983-5.

Cooley, S., Trachtenberg, E., Bergemann, T. L., Saetern, K., Klein, J., Le, C. T., Marsh, S. G., Guethlein, L. A., Parham, P., Miller, J., S. & Weisdorf, D. J. 2009. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 113; 726-32.

Cooley, S., Weisdorf, D. J., Guethlein, L. A., Klein, J. P., Wang, T., Le, C. T., Marsh, S. G., Geraghty, D., Spellman, S., Haagenson M. D., Ladner, M., Trachtenberg, E., Parham, P. & Miller, J. 2010. Donor selection for natural killer cell receptor genes lead to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 116, 2411-9.

Cooley, S., Weisdorf, D. J., Guethlein, L. A., Klein, J. P., Wang, T., Marsh, S. G., Spellman, S., Haagenson, M. D., Saetern, K., Ladner, M., Trachtenberg, E., Parham, P. and Miller, J. S. 2014. Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-

C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Immunol.*, 192: 4592-600.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A. 2001. The biology of natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-40.

De Smith, A. J., Walsh, K.M., Ladner, M. B., Zhang, S., Xiao, C., Cohen, F., Moore, T. B., Chokkalingam, A. P., Metayer, C., Buffler, P. A., Trachtenberg, E. A., Wiemels, J. L. 2014. The role of KIR genes and their cognate HLA class I ligands in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 123, 2497-2503.

Enari, M., Talanian, R. V. et al. 1996. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380(6576), 723-726.

Erer, B., Takeuchi, M., Ustek, D., Tugal-Tutkun, I., Seyahi, E., Özyazgan, Y., Duymaz-Tozkir, J., Gül, A., Kastner, D. L., Remmers, E. F., Ombrello, M. J. 2016. Evaluation of KIR3DL1/KIR3DS1 polymorphism in Behçet's disease. *Genes immun.*, 17, 396-399.

French, A. R., Yokoyama, W. M. 2003. Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 15, 45-51.

Feuchtinger T., Pfeiffer, M., Pfaffle, A., Teltschik H M., Wernet, D., Schumm, M., Lotfi, R., Handgretinger, R. and Lang, P. 2009. Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor-B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones. *Bone marrow Transplant*, 43: 875-81.

Giebel, S., Nowak, I., Krawczyk-Kulis, M., Holowiecki, H., Kyrz-Krzemien and Kursnierczyk, P. 2008. Association of KIR2DS4 and its variant KIR1D with leukemia. *Leukemia*, 22: 2129-2130.

Handgretinger, R. 2010. Donor selection for AML: do the KIR. *Blood*, 116, 2407-9.

Handgretinger, R. 2014. Haploidentical transplantation: the search for the best donor. *Blood*, 124, 827-28.

Harel-Bellan, A., Quillet, A., Marchiol, C., Demars, R., Tursz, T. & Fradelizi, D. 1986. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 83, 5688-92.

Hay, N, Sonnenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 15; 18: 1926-45.

Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T. and Lavrin, D. H. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogenic tumors. II. characterization of effector cells. *Int J cancer.* 16, 230-9.

Hiby, S. E., Walker J. J., O'Shaugnessey K. M., Redman, C. W., Carrington, M., Trowsdale, J. & Moretta, A. 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C

genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *The Journal of experimental medicine*, 200, 957-65.

Hsu, K. C., Chida, S., Geraghty, D. E. & Dupont, B. 2002. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological reviews*, 190, 40-52.

Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319, 675-8.

Khakoo, S. I., Thio, C. L., Martin, M. P., Brooks, C. R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J. J., Vlahov, D., Hilgartner, M., Cox, S., Little, A. M., Alexander, G. J., Cramp, M. E., O'Brian, S. J., Rosenberg, W. M., Thomas, D. L. & Carrington, M. 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*, 305, 872-4.

Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. and Wigzell, H. 1975. Natural killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*. 5, 117-21.

Kroger, N., Zabelina, T., Berger, J., Duske, H., Klyuchnikov, E., Binder, T., Stubig, T., Hilde-Brandt, Y., Atanackovic, D., Alchaby, H., Ayuk, F., Zander, A. R., Bacher, U. & Eiermann, T. 2011. Donor KIR haplotype B improves progression-free and overall survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia*, 25, 1657-1661.

Lanier, L.L. 1998. NK cell receptors. *Annual review of immunology*, 16, 359-93

Lanier, L. L., 2005. NK cell recognition. *Annual review of immunology*, 23, 225-74.

Leung, W., Iyengar, R, Triplett, B., et al. 2005. Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *Immunol*, 174, 6540-6545.

Leung, W. 2011. Use of NK cell activity in cure by transplant. *Br J Haematol*, 155, 14-29.

Ljunggren, H.G. & Karre, K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*, 11, 237-44.

Long, E. O., & Rajagoplan, S. 2000. HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors. *Seminars in immunology*, 12, 101-8

Manns, M. P. 2016. Die Zukunft der Infektionsmedizin. *FAZ*, 17.06.2016, S0V1 / Seitenüberschrift: Infektionskrankheiten Ressort: V

Marsh, S. G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D. E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L. A., Shilling, H., Garcia, C. A. Hsu K. C. and Wain H. 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics*, 55: 220-6.

Martin, M. P., Gao, X., Lee, J. H., Nelson, G. W., Detels, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., Wilson, M., O'Brian, S. J. & Carrington, M. 2002a. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*, 31, 429-434.

Martin, M. P., Nelson, G., Lee, J. H., Pellet, F., Gao, X., Wade, J., Wilson, M. J., Trowsdale, J., Gladman, D. & Carrington, M. 2002b. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *Journal of Immunology*, 169, 2818-22.

Maxwell, L D., Wallace, A., Middleton, D. and Curran, M D. 2002. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue antigens*, 60: 254-8.

Michaelis, S. U. 2015. Die klinische Relevanz der KIR Rezeptoren bei haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.

Middleton, D., Meenagh, A., Sleator, C., Gourraud, P. A., Ayna, T., Tozki, H., Köse, A. A., Azizleri, G. and Diller, A. S. 2007. No association of KIR genes with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 70:435-8.

Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. and Moretta, L. 2002. What is natural killer cell? *Nat Immunol* 3, 6-8.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. & Moretta, L. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*. 29, 197-223.

Moretta, A., Tambussi, G., Bottino, C., Tripodi, G., Merli, A., Ciccone, E., Pantaleo, G. & Moretta, L. 1990. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytotoxic function. *The Journal of experimental medicine*, 171, 695-714.

Nguyen, K. B., Salazar-marther T. P. Dalod, M. Y., Van Deusen, J. B., Wie, X. Q., Liew, F. Y., Caliguri, M. A., Durbin, J. E. and Biron C. A. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell response to viral infection. *J Immunol* 169, 4279-87.

Oeverman, L., Firnkorn, M., Michaelis, S., Müller, S., Schaeffler, E., Schrappe, M., Cario, G., Stanulla, M., Schwab, M., Handgretinger, R. & Mezger, M. 2015. No association between the presence of killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and susceptibility to childhood ALL. *Blood*, 125, 3355-57.

Oevermann, L., Michaelis, S. U., Mezger, M., Lang, P., Toporski, J., Zecca, M., Moretta, L., Locatelli, F., Handgretinger, R. 2014. KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. *Blood*, 124: 2744-7.

Olcese, L., Cambiaggi, A., Semenzato, G., Bottino, C., Moretta, A. & Vivier, E. 1997. Human killer cell activating receptors for MHC class I molecules are included in a

multimeric complex expressed by natural killer cells. *Journal of immunology*, 158, 5083-6.

Raulet, D. H., Vance, R. E. & Mc Mahon, C. W. 2001. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annual review of immunology*, 19, 291-330.

Robertson, M. J. and Ritz, J. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-38.

Robinson, J., Waller, M. J., Stoehr, P., Marsh, S. G. 2005. IPD—the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res*, 33, D523-6.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F. & Velardi, A. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 295, 2097-100.

Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Perruccio, K., Burchielli, E., Topini, F., Bianchi, E., Aversa, F., Martelli, M. F. & Velardi, A. 2007. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*, 110, 433-40.

Rubnitz, J. E., Inaba, H., Kang, G., Gan, K., Hartford, C., Triplett, B. M., Dallas, M., Shook, D., Gruber, T., Pui, C. H. and Leung, W. 2015. Natural killer cell therapy in children with relapsed leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 62, 1468-72.

Sawicki, M. W., Dimasi, N., Natarajan, K., Wang, J., Margulies, D. H. & Mariuzza, R. A. 2001. Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors. *Immunological reviews*, 181, 52-65.

Selvakumar, A., Steffens, U. & Dupont, B. 1996. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue antigens*, 48, 285-94.

Smyth, M. J., Kelly, J. M. et al. 2001. Unlocking secrets of cytotoxic granule proteins. *J Leukoc Biol* 70, 18-29.

Trapani, J. A. and Smyth, M. J. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.

Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187-376.

Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L. L. & Parham, P. 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, 7, 753-63.

Uhrberg, M., Valiante, N. M., Young, N. T., Lanier, L. L., Phillips, J. H. & Parham, P. 2001. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *Journal of immunology*, 166, 3923-32.

Varla-Leftherioti, M., Spyropoulou-Vlachou, M., Keramitsoglou, T., Papadimitropoulos, M., Tsekoura, C., Graphou, O., Papadopoulou, C., Gerondi, M. & Stravropoulos-Giokas, C. 2005. Lack of appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion. *Human immunology*, 66, 65-71.

Venstrom, J. M., Pittari, G., Gooley, T. A., Chewing, J. H., Spellman, S., Haagenson, M., Gallagher, M. M., Malkki, M., Petersdorf, E., Dupont, B. and Hsu, K. C. 2012. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med*, 367, 805-16.

Verneris, M. R. and Miller, J. S. 2014. KIR B or not to be? ... that is the question for ALL. *Blood*, 124: 2623-2624.

Vivier, E., Raulet, D. H. et al. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331(6013), 44-49.

Vilches, C. & Parham, P. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology*, 20, 217-51.

Vilches, C., Castano, J, Gomez-Lozano, N. and Estefania, E. 2007. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens*, 70:415-22.

Warrington, K. J., Takemura, S., Goronzy J. J., & Weyand, C. M. 2001. CD4+, CD28+ - T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune system. *Arthritis and rheumatism*, 44, 13-20.

Wang, Y., Chang, Y.-J., Xu, L.-P., Liu, K.-Y., Liu, D.-H., Zhang, X.-H., Chen, H., Wie, H., Chen, Y.-H., Wang, F.-R., Wang, J.-Z., Chen, Y., Yan, C.-H., Huo, M.-R., Li, D. and Huang X.-J. 2014. Who is the best donor for a related HLA haplotype-mismatched transplant? *Blood*, 124, 843-50.

Weiden, P., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D. and Storb, R. 1979. Antileukemic effect of Graft-versus-Host Disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*, 300, 1068-1073.

Yokoyama, W. M., Scalzo, A. A. 2002. Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes Infect* 4, 1513-21.

Zhang, Y., Wang, B, Ye, S, Liu S., Shen, C., Teng, Y. and Qi, J. 2010. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphism in patients with leukemia: possible association with susceptibility to the disease. *Leukemia Res*, 34(1): 55-58.

Zhou, H., Bao, X., Wu, X., Tang, X., Wang, M., Wu, D. and He, J. 2014. Donor selection for killer immunoglobulin-like receptors B haplotype of the centromeric motifs can improve the outcome after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20, 98-105.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen, Abteilung I, Allgemeinpädiatrie, Hämatologie und Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger, Ärztlicher Direktor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen, Dr. rer. nat. Dr. med. Markus Mezger, Leiter des Chimärismuslabors an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen und Dr. med. Lena Oevermann, Assistenzärztin an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen und mir.

Die Versuche zur KIR-Genotypisierung der ALL-Gruppen wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. rer. nat. Dr. med. Markus Mezger und Dr. med. Sebastian Michaelis) von mir durchgeführt.

Die Darstellung der Tabelle 2 ist angelehnt an die aus der Dissertation von Dr. med. Sebastian Ulrich Michaelis. Auch ist auf S. 45 aus seiner Dissertation zitiert.

Die Versuche zur KIR-Genotypisierung der Kontrollgruppe wurden von Daniela Koendgen, MTA, durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte zum einen Teil selbständig durch mich und zum anderen Teil nach Beratung durch Dr. biol. hum. Corinna Engel am Institut für Biometrie durch mich.

Die Remissions-DNA von Kindern mit ALL stellte Prof. Dr. med. Martin Schrappe (Direktor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein) bereit. Die Remissions-DNA der Kontrollgruppe wurde von Prof. Dr. med. Matthias Schwab (Direktor des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie am Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart) zur Verfügung gestellt.

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

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger für die Überlassung des Themas und die angenehme Unterstützung bei der Arbeit.

Bei Dr. rer. nat. Dr. med. Markus Mezger, Dr. Sebastian Michaelis sowie Dr. med. Lena Oevermann bedanke ich mich für die fachliche Betreuung, für die guten Ratschläge und für themenaktuelle wissenschaftliche Diskussionen.

Bei Daniela Koendgen bedanke ich mich für die Durchführung der KIR-Genotypisierung der Kontrollgruppe, bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Chimärismusalabors bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab und bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Schrappe bedanke ich mich für die Bereitstellung der Proben.

Bei Dr. biol. hum. Corinna Engel bedanke ich mich für die Beratung zur statistischen Auswertung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich.

Liebe Anke, bei dir bedanke ich mich für dein Anhalten dran zu bleiben, deine kritischen Einwände, für den Glauben an mich und dafür, dass Du mich während dieser Zeit ausgehalten hast. Ich liebe Dich.