

Aus der Kinderklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer, FRCPE

**Einfluss der Zytokingenpolymorphismen bei allogenen
transplantierten Kindern auf das Vorliegen einer Graft-versus-
Host-Disease**

**Influence of cytokine polymorphisms in allogeneic transplanted
children on the presence of graft-versus-host disease**



Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Engelke Kristina Rasche

aus Würzburg

Würzburg, April 2018

Eingereicht am: 02.05.2018

Referent: Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. med. Franziska Jundt

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2019

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meiner Familie

Inhaltverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	
1 Einleitung	1
1.1 Maligne Erkrankungen im Kindesalter	1
1.2 Stammzelltransplantation	3
1.2.1 Was ist Stammzelltransplantation.....	3
1.2.2 Indikation einer Stammzelltransplantation	7
1.2.2.1 Hämatopoetische und lymphatische Malignome.....	7
1.2.2.2 Solide Tumoren und ZNS-Tumoren	8
1.2.3 Risiken / Nebenwirkungen einer Stammzelltransplantation: Graft-versus-Host-Disease	10
1.3 Zytokine und GvHD / Abstoßungsreaktion	18
1.3.1 Zytokine allgemein.....	18
1.3.1.1 Interferon- γ	18
1.3.1.2 TNF- α	19
1.3.1.3 IL-6	19
1.3.1.4 TGF- β 1.....	19
1.3.1.5 IL-10	20
1.3.2 Zytokine und GvHD	20
1.4 Fragestellung	25
2 Material	27
2.1 Studiendesign.....	27
2.2 Patienten.....	28
2.3 Geräte	28
2.4 Laborbedarf.....	29
2.5 Chemikalien, Enzyme, Kits und Primer	30
3 Methoden.....	31
3.1 DNA-Extraktion	31
3.2 Photometrische Quantifizierung von DNA	32
3.3 Polymerase chain reaction (PCR)	32
3.4 Primersequenzen	35
3.5 Gelelektrophorese	36

3.6 Auswertung der Ergebnisse anhand eines Beispiels	38
3.6.1 Einführung in die Auswertung anhand des TNF- α -SNP	38
3.6.2 Auswertung des TGF- β 1-SNP	41
3.6.3 Auswertung des IL-10-SNP	43
3.6.4 Auswertung des IL-6-SNP	45
3.6.6 Auswertung des IFN- γ -SNP	46
4 Statistische Analysen.....	48
5 Ergebnisse	49
5.1 Patientencharakteristika	49
5.1.1 Patientencharakteristika allgemein	49
5.1.1.1 Empfänger.....	49
5.1.1.2 Spender.....	50
5.1.2 GvHD und Patientencharakteristika.....	53
5.1.3 Rezidiv	56
5.2 Überleben	59
5.3 Zytokinpolymorphismen	60
5.3.1. Zytokinpolymorphismen allgemein	60
5.3.2 Unterschiede der Zytokinpolymorphismen zwischen Empfänger und Patient...64	
5.3.3 Geschlecht, Alter und Zytokinpolymorphismen	67
5.3.4 Bereits durchgeführte SZT und Zytokine	67
5.3.5 Spender, Stammzellherkunft und Zytokine.....	67
5.3.6 Einfluss der Zytokinpolymorphismen auf die Entstehung einer GvHD	68
5.3.6.1 TNF- α	69
5.3.6.2 TGF- β	69
5.3.6.3 IL-10	69
5.3.6.4 IL-6	72
5.3.6.5 IFN- γ	72
6 Diskussion.....	73
6.1 Einführende Bemerkungen.....	73
6.2 (Bekannt) klinische Parameter und Risikofaktoren für die Entstehung einer GvHD.....	73
6.3 Zytokinpolymorphismen	75

6.3.1 TNF- α	77
6.3.2 TGF- β	78
6.3.3 IFN- γ	80
6.3.4 IL-6.....	80
6.3.5 IL-10.....	82
6.3.6 Zytokinpolymorphismen allgemein	84
7 Zusammenfassung	86
8 Summary	88
9 Anhang	90
10 Abbildungsverzeichnis	90
11 Tabellenverzeichnis.....	90
12 Literaturverzeichnis.....	91
Danksagung
Eidesstattliche Erklärung.....
Affidavit
Lebenslauf.....

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APCs	Antigen presenting cells, Antigen-präsentierende Zellen
Bp	Basenpaare
CDA	Kongenitale dyserythropoetische Anämie
CI	Konfidenzintervall
CML	Chronische myeloische Leukämie
CR	Complete remission, Komplettremission
CTLs	Cytotoxische T-Lymphozyten
DBA	Diamond-Black-Anämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
GF	Gel filtration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FasL	Fas-Liganden
GI-Trakt	Gastrointestinal-Trakt
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
aGvHD	akute Graft-versus-Host-Disease
cGvHD	chronische Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukämie
HA	(minor) histocompatibility antigen
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation (hämatopoetische Stammzelltransplantation)
HDCT	Hochdosischemotherapie
HLA	Human Leukozyte Antigen
HR	High Risk
IL	Interleukin

IFN- γ	Interferon gamma
KM	Knochenmark
LCH	Langerhans-Zell-Histiozytose
LPS	Lipopolysaccharide
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major histocompatibility complex
MW	Mittelwert
NK-Zellen	Natural Killer Zellen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
RNAse	Ribonuklease
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD	Progressive Disease
PBS	Phosphate buffered saline
PR	Partial Remission, Teilremission
SD	Stable Disease
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotidpolymorphismus
SAA	schwere aplastische Anämie
SZT	Stammzelltransplantation
Taq Polymerase	Polymerase aus thermophilus aquaticus
TBI	Total body irradiation, Ganzkörperbestrahlung
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Maligne Erkrankungen im Kindesalter

Leukämien und maligne Tumore sind seltene Erkrankungen im Kindesalter.

Bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren betrug die Zahl der malignen Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2015 1758 (Meldung aus 64 Kliniken), bei den unter 18-Jährigen wurden insgesamt 2169 maligne Neuerkrankungen gezählt (Meldung aus 66 Kliniken).

Durchschnittlich werden jährlich, bezogen auf den Zeitraum 2006 bis 2015, bei den unter 17-Jährigen circa 1760 Neuerkrankungen gemeldet.

In 446 Fällen erkrankten die Kinder an einer lymphatischen Leukämie.[1]

Aufgrund der Malignität sind Tumorerkrankungen nach Unfällen die zweithäufigste Todesursache nach dem ersten Lebensjahr bei Kindern.

Durch die Regulation jeder Körperzelle in Form von Zellteilung, Zelldifferenzierung, natürlicher Zellalterung und Apoptose herrscht zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung ein dynamisches und exakt abgestimmtes Gleichgewicht dieser Prozesse. Kommt es zur Fehlregulation eines dieser Abläufe kann dies potentiell zu einer malignen Entartung beitragen. So kommt es bei einer Krebszelle durch das gestörte Verhältnis von Zellproliferation und Apoptose zu einer Nettozunahme an Zellmasse. Zudem begünstigen eine veränderte Zell-Zell-Kommunikation sowie eine erhöhte Mobilität das Verlassen von Ursprungsort und Zellverband der Zelle und das Durchdringen von Gefäßwänden. Die entarteten Zellen können sich an anderen Orten des Körpers ansiedeln und vermehren, also Metastasen bilden. In der Regel werden diese Zellen vom körpereigenen Immunsystem erkannt und eliminiert. Krebszellen besitzen jedoch die Eigenschaft, sich dieser Überwachung des Abwehrsystems zu entziehen.[2]

Im Kindesalter treten fast ausschließlich Malignome mesodermalen Ursprungs auf während im Erwachsenenalter epi- und endodermale Neoplasien dominieren.

Systemerkrankungen wie Leukämien und maligne Lymphome überwiegen mit insgesamt 47 Prozent, gefolgt von Tumoren des Zentralnervensystems, Weichteilsarkomen und Knochentumoren. Karzinome kommen mit 1 Prozent (%) äußerst selten vor.[3]

Leukämien sind die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter.

Hier stellt die akute lymphatische Leukämie (ALL) die häufigste Einzeldiagnose dar und tritt bereits in den ersten 6 Lebensjahren auf. Die Prognose der akuten lymphatische Leukämie ist gut (90% Langzeitüberlebende, mindestens 15 Jahre) und steigt weiter an.

Die akuten myeloischen Leukämien kommen deutlich seltener vor und haben eine schlechtere Prognose (73% Langzeitüberlebende).

Im Gegensatz dazu weisen Lymphome im Allgemeinen im Jugend- und Erwachsenenalter eine vergleichsweise hohe Inzidenz auf und treten nur selten bei Kleinkindern auf.

Die Tumore des zentralen Nervensystems stellen eine heterogene Gruppe von Krebserkrankungen dar, die maligne und nichtmaligne Formen einschließt.

Neuroblastome zählen zu den embryonalen Tumoren, die sich besonders bei Kleinkindern zeigen.

Ein weiterer embryonaler Tumor, von dem ältere Kinder ab 10 Jahren kaum betroffen sind, ist das Retinoblastom. Die Prognose wird mit 97% Langzeitüberlebenden als sehr gut eingestuft.

Weichteilsarkome können alle Altersgruppen betreffen. Bis zum Alter von 14 Jahren ist eines von 7100 Kindern betroffen. Besonders häufig tritt im Kindesalter das Rhabdomyosarkom auf. Laut Register erkranken Jungen etwa 20% häufiger als Mädchen.

Eine weitere heterogene Gruppe von Krebserkrankungen wird von den Keimzelltumoren gebildet. Einige treten häufiger bei Kleinkindern auf, andere sind charakteristisch bei beginnender Pubertät. Somit kommen diese malignen Erkrankungen zwischen dem 4. und 7. Lebensjahr eher selten vor. Besonders Mädchen bis 14 Jahre sind 30% häufiger betroffen. Seit dem Jahr 2000 werden die intrakraniellen Formen der Keimzelltumoren zu den Hirntumoren gezählt. Im Allgemeinen zeigt sich eine gute Langzeitprognose mit 93%. [1]

1.2 Stammzelltransplantation

1.2.1 Was ist Stammzelltransplantation

Unter einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (SZT) versteht man die Übertragung von Blutstammzellen eines Spenders auf einen Empfänger, die bei einer Reihe von malignen und hämatologischen Erkrankungen eine kurative Therapieoption darstellt.

Durch Chemotherapie und/oder Bestrahlung wird zunächst das hämatopoetische System sowie das Immunsystem des erkrankten Empfängers eliminiert und anschließend durch die transplantierten Stammzellen ersetzt. Dieses Therapieverfahren beabsichtigt, die Hämatopoese des Empfängers aus den transplantierten Zellen regenerieren zu lassen.

Stammzelltransplantationen werden nach Spender, Herkunft der Stammzellen sowie Aufbereitung des Transplantats unterteilt.

Stammt das Transplantat von einem Familienmitglied (allogen verwandt) oder Fremdspender (allogen unverwandt), handelt es sich um eine allogene Transplantation.

Ein erwünschter Effekt bei der Übertragung fremder Stammzellen ist der Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL-Effekt). Die Zellen des Fremdspenders greifen die

Körperzellen des Patienten an und richten sich somit auch gegen Leukämie- oder Tumorzellen, die nach Bestrahlung oder Chemotherapie noch im Körper verblieben sind. Die GvL ist wesentlich dafür verantwortlich, dass das Wiederauftreten der Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation seltener vorkommt als nach der Übertragung eigener Stammzellen.

Anhand von Bluttests werden die infrage kommenden Spender auf ihre Tauglichkeit untersucht. Hierbei ist die Übereinstimmung der HLA-Antigene die wichtigste Voraussetzung. Geschwister passen in 25% der Fälle überein, wohingegen Eltern primär nicht als Spender in Frage kommen, da normalerweise nur die Hälfte der HLA-Antigene übereinstimmen (haploid).

Werden jedoch die eigenen Stammzellen des Empfängers zu einem früheren Zeitpunkt entnommen, eingefroren, gelagert und anschließend an diesen Empfänger zurückgegeben, spricht man von einer autologen Transplantation. Diese kommt im Anschluss an eine sog. Hochdosistherapie zum Einsatz. Um alle Krebszellen zu zerstören kann die Dosis der chemotherapeutischen Zytostatika auf das drei- bis zehnfache erhöht werden. Die Hochdosistherapie schädigt jedoch das blutbildende System irreversibel und muss deshalb durch eine autologe SZT wiederhergestellt werden. Im Unterschied zu einer allogenen Transplantation werden keine immunsuppressiven Medikamente benötigt und eine Graft-versus-Host-Disease kann nicht aufkommen.

Erhalten Patienten Stammzellen von ihrem eineiigen Zwilling bezeichnet man dies als synergetische Transplantation. Der eineiige Zwilling ist jedoch nicht der ideale Spender. Zwar zeigt sich eine gute Verträglichkeit der übertragenen Stammzellen, jedoch kommt es nicht zu einer GvL und die Reste des erkrankten Knochenmarks können nicht vollständig beseitigt werden.

Die größte Anzahl an Stammzellen befindet sich im Knochenmark, aber auch im peripheren Blut und im Nabelschnurblut finden sich Stammzellen, die für die Transplantation verwendet werden.

Das gewonnene Stammzellpräparat kann unmanipuliert oder aufgereinigt transplantiert werden. Wird das gesamte Präparat in toto eingesetzt, beinhaltet es neben den eigentlichen hämatopoetischen Stammzellen eine Vielzahl anderer Zellen. Wird in bestimmten Situationen lediglich die eigentliche Stammzellfraktion transplantiert, spricht man von einem aufgereinigten Transplantat. [4]

Ziel dieses positiven Selektionsverfahrens ist die hochselektive Anreicherung humaner hämatopoetischer Stammzellen.

In der autologen Transplantation dient sie der Eliminierung kontaminierter Tumorzellen.

Im allogenen Setting zielt dieses Verfahren auf die Entfernung reifer immunkompetenter T- und B-Zellen aus dem Transplantat ab. Die Depletion der T-Zellen reduziert das Auftreten einer GvHD, während die Entfernung der B-Zellen zur Senkung EBV-assoziiierter Lymphome im ersten Jahr nach Transplantation beiträgt.

Findet sich kein passender Spender in der Spendersuche und die Konditionierung wurde bereits durchgeführt, kann ein negatives Depletionsverfahren angewendet werden. Hier können beispielsweise Stammzellen eines Elternteils verwendet werden, obwohl sie nur zur Hälfte passen (haploident) und primär nicht als Spender in Frage kommen. Bei dieser Form der Transplantation werden die Stammzellen individuell aufgereinigt und aus einem haploidenten Stammzellpräparat reife T- und B-Zellen entfernt, während Stammzellen, weitere lymphatische Progenitoren und dendritische Zellen im Transplantat erhalten bleiben. So wird das transplantierte Präparat vom Empfänger besser vertragen und die Regeneration des Immunsystems nach Transplantation wird beschleunigt.

Der zeitliche Ablauf der Stammzelltransplantation gliedert sich in die Phasen der Konditionierung, der Transplantation sowie der Aplasie und der Immunrekonstitution.

In der Phase der Konditionierung werden sequenziell Chemotherapeutika mit oder ohne fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (TBI, „total body irradiation“) verabreicht. Diese Behandlung beabsichtigt die Zerstörung residueller Tumor-/ Leukämiezellen ebenso wie die Ausschaltung der körpereigenen Immunabwehr des Empfängers um das Anwachsen des neuen Grats zu ermöglichen.

In der Phase der eigentlichen Transplantation wird das gewonnene Stammzellpräparat, in toto oder aufgereinigt, intravenös transplantiert. Die Spenderstammzellen siedeln sich zunächst im Stroma des Knochenmarkraumes an und beginnen dort mit der Teilung und Differenzierung.

In der darauffolgenden Phase der Aplasie und der nachfolgenden Immunrekonstitution teilen sich die infundierten Stammzellen in Tochterstammzellen und Progenitorzellen. Diese Differenzierung in die verschiedenen blutbildenden und antigenpräsentierenden Zellen ist wichtiger Bestandteil der Transplantation und notwendig um einen GvL-Effekt und eine effektive Immunfunktion zu erzielen. In dieser Phase hat der Patient kein funktionsfähiges Immunsystem, so dass einerseits Nebenwirkungen der Konditionierung zum Tragen kommen, andererseits eine hohe Infektanfälligkeit besteht.

Es handelt sich um die kritische Phase der Transplantation und erfordert eine supportive Therapie.

In dieser Phase kommen ebenfalls die toxischen Nebenwirkungen der Konditionierungsphase zum Tragen. Diese können sich im kompletten Ausfall der Hämatopoese, Mukositis, passagerer Niereninsuffizienz, dem Verlust der Immunabwehr oder toxischer Beeinträchtigung der Funktion verschiedener anderer Organe etablieren.

Der Spender der Wahl für eine Transplantation bei hämatologischen Erkrankungen ist Histokompatibilitätsantigen (engl. Histocompatibility antigen, HLA)-kompatibel. Unter HLA versteht man ein Oberflächenantigen, das auf allen kernhaltigen Zellen vorkommt und die Immunantwort gegen fremdes Gewebe anregt. Da sich nur bei 30% der Patienten ein kompatibler Spender findet, kann die sog. Graft-versus-Host-Disease zu einem entscheidenden Problem werden. [5] Unter der GvHD versteht man die Abstoßungsreaktion des Transplantates gegen den Empfänger.

Die blutbildenden Zellen des gesunden Transplantats ersetzen die erkrankten Zellen des Patienten und übernehmen zudem deren Aufgaben. Des Weiteren kann das transplantierte Präparat residuale Krebszellen angreifen. Greifen die mit dem Spendermark übertragenen Abwehrzellen wie Lymphozyten und Monozyten die noch im Körper des Patienten verbliebenen Tumorzellen an und versuchen diese zu vernichten, spricht man von der sog. Graft-versus-Leukämie-Reaktion.

1.2.2 Indikation einer Stammzelltransplantation

Im Kindesalter ist eine Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation bei verschiedenen malignen und nichtmalignen Systemerkrankungen indiziert.

Diese umfassen sowohl nichtmaligne Erkrankungen wie Syndrome mit Knochenmarkinsuffizienz, Hämoglobinopathien, Immundefekte oder selektive Autoimmunerkrankungen wie multiple Sklerose oder juvenile rheumatoide Arthritis. Hier stellt die Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen derzeit die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar.

Zudem ist die Stammzelltransplantation bei malignen Erkrankungen des Knochenmarks, soliden Tumoren und Tumoren des ZNS indiziert.

1.2.2.1 Hämatopoetische und lymphatische Malignome

Kinder, die an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erkrankt sind, fallen aufgrund ihrer guten Heilungschancen anhand moderner Behandlungsprotokolle

nicht primär in die Gruppe der Kandidaten für eine Stammzelltransplantation. Bei schlechtem Ansprechen auf die Cortisonvorphase oder beim Vorliegen spezieller Translokationen oder persistierendem Knochenmarksbefall kann aufgrund der schlechteren Prognose bereits in erster kompletter Remission eine Transplantation durchgeführt werden, sofern die betroffenen Kinder über einen HLA-identischen Geschwister- oder Fremdspender verfügen.

Ebenso zeigt sich besonders bei frühen Rezidiven (<6 Monate nach Ende der Dauertherapie) ein signifikanter Unterschied zugunsten der allogenen SZT (Stammzelltransplantation) gegenüber der Chemotherapie hinsichtlich der rezidivfreien Überlebensrate.

Aktuell können ca. 50% der an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) erkrankten Kinder langfristig geheilt werden. Eine allogene SZT begünstigt die Heilungschancen von Kindern mit einer primär refraktären oder sekundären AML sowie Kinder mit einer De-novo-AML bei bestimmten Risikokonstellationen.

Ebenso wird die Behandlung mit einer allogenen SZT bei Kindern mit einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) nach einer Vorbehandlung mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor eingesetzt.

Da die Prognose bei Morbus Hodgkin für Erkrankungen im Kindesalter generell sehr gut ist, wird die autologe SZT nur bei sehr seltenen Rezidiven durchgeführt. Die allogene SZT hingegen wird bei rezidivierenden Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt.

Die konventionelle Chemotherapie zeigt bei Kindern mit einem myelodysplastischen Syndrom oder einer chronisch myelomonozytären Leukämie geringe Heilungschancen. Daher sollte die allogene Transplantation bei diesen Erkrankungen ebenfalls eingesetzt werden.

1.2.2.2 Solide Tumoren und ZNS-Tumoren

High-Risk(HR) Patienten profitieren in bestimmten Situationen von einer autologen Hochdosischemotherapie (HDCT). So kann die Reinfusion autologer Stammzellen

die Chemotherapiedosis bei der Behandlung um ein Vielfaches gegenüber der konventionellen Chemotherapie steigern. Dieses Therapiekonzept wird als Hochdosistherapiekonzept bezeichnet und verbesserte die 4-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von Kindern, die an einem Neuroblastom erkrankt waren von 19% auf 49% nach autologer SZT. Besonders bei Kindern im Stadium 4 und Kindern, deren Tumor die Amplifikation des N-myc-Gens aufwies, zeigten sich signifikante Verbesserungen.

Kinder mit Knochen- und Knochenmarksmetastasen bei Diagnose haben eine schlechte Prognose und sollten ebenso anhand der Hochdosistherapie behandelt werden.

Das Prinzip der Hochdosistherapie wurde ebenfalls erfolgreich bei Kindern mit einem rezidivierenden Medullablastom angewandt. Die sequenzielle Therapie aus autologer SZT mit anschließender Bestrahlung der Fossa posterior erreichte eine 31-Monateüberlebensrate von 50%.

Junge Patienten mit primärer Metastasierung bei Diagnosestellung sollen ebenso von der Hochdosistherapie profitieren.

Obgleich primitive neuroektodermale Tumoren mit supratentorieller Lokalisation primär chemotherapiesensibel sind haben diese Tumoren nach einem Rezidiv meist einen letalen Verlauf. Junge Kinder können durch die zusätzliche Hochdosistherapie eine Remission erfahren.

Bei soliden Tumoren wird die allogene SZT angewandt. Unter der Vorstellung eines Graft-versus-Leukemia (GvL)- Effektes greifen die Zellen des Spenders im Körper des Patienten verbleibende Tumorzellen an und senken so die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens der Krankheit.[4]

1.2.3 Risiken / Nebenwirkungen einer Stammzelltransplantation: Graft-versus-Host-Disease

In seltenen Fällen kann es zu einer Abstoßungsreaktion von wenigen überlebenden immunologischen Effektorzellen des Empfängers kommen. Das neue Knochenmark wird als fremd erkannt und die neuen Stammzellen können primär nicht anwachsen oder werden nach vorübergehendem Anwachsen abgestoßen. Für beide Komplikationen werden die T-Lymphozyten und NK-Zellen (Natural-Killer-Zellen) des Empfängers verantwortlich gemacht. Obgleich sie mit 3-5% relativ selten erscheint, tritt diese Komplikation bei polytransfunden HLA-sensibilisierten Patienten gehäuft auf.

Können die transplantierten Stammzellen primär nicht anwachsen, persistiert die Phase der Aplasie. Findet die Abstoßungsreaktion nach einem vorübergehenden Anwachsen statt, zeigt sich zunächst ein Ansteigen der Granulozyten, welches von einem erneuten Absinken der Leukozyten, nach zunächst erfolgreicher hämatopoetischer Regeneration, gefolgt wird. Dieser Verlauf wird oftmals von einer relativen Lymphozytose und Fieber begleitet. Die Therapie besteht in der immunologischen Rekonditionierung und der erneuten Transplantation.

Die häufigste Todesursache nach primär erfolgreicher Transplantation ist das leukämische Rezidiv. Wenige leukämische Blasten können die vorangegangene Konditionierung überleben und zeigen eine hohe Teilungs- und Proliferationsrate. Inwiefern die unterschiedlichen Konditionierungsregime die Rezidivhäufigkeit beeinflussen ist noch unvollständig geklärt, es zeigt sich aber, dass eine höhere Ganzkörperstrahlendosis und/oder der Einsatz von Etoposid eine geringere Rezidivrate aufweisen. Daher zeigt sich die immunologische Überwachung residualer Blasten und deren Gehalt an immunologischen Effektorzellen von großem Wert. Ein Abfall der Thrombozytenzahl kann ein drohendes hämatologisches Rezidiv ankündigen. Hierbei befinden sich mehr als 5% Blasten im Knochenmark und es kommt zu einer Ausschwemmung unreifer Vorstufen in das periphere Blut.

Um eine Graft-versus-Host-Disease zu vermeiden, ist eine Immunsuppression in den ersten 100 bis 150 Tagen erforderlich. Im Frühstadium eines Rezidivs kann durch Absetzen der immunsuppressiven Therapie eine Remission erzielt werden. Dabei steigt jedoch die Gefahr eine akute Graft-versus-Host-Disease (aGvHD) zu erleiden.

Bei späterem Auftreten eines Rezidivs zeigt sich eine Chemotherapie als günstiger Versuch eine erneute Remission zu erreichen.

Bei Patienten mit einer CML, AML oder ALL können durch die frühzeitige Gabe von Spenderlymphozyten drohende Rezidive günstig beeinflusst werden.

Des Weiteren kann es in der Phase der Aplasie gehäuft zu bakteriellen Infektionen kommen, die durch Neutropenie und die Zerstörung wichtiger Haut- und Schleimhautbarrieren ausgelöst werden. Entsteht Fieber ohne gesicherten Fokus, muss bei neutropenischen Patienten von einer bakteriellen Infektion durch gramnegative oder grampositive Erreger ausgegangen werden. Die Therapie findet sich in einer empirischen Kombinationstherapie, die sämtliche Erreger einschließen sollte.

Persistiert Fieber trotz einer adäquaten antibiotischen Therapie besteht der klinische Verdacht auf eine fungale oder virale Infektion.

Auch in der Phase der Immunkonstitution kann es nach Anwachsen des neuen Knochenmarks zu einer Infektion kommen. Bis zur Beendigung des ersten Jahres nach Transplantation zeigen sich niedrige T- und B-Zellfunktionen. Dies begünstigt besonders virale Infektionserkrankungen wesentlich.

Die GvHD ist eine der größten Komplikationen bei einer allogenen SZT. Unter Graft-versus-Host-Disease versteht man eine immunologische Reaktion, die in Folge einer Stammzell- oder Knochenmarkstransplantation auftreten kann.

Normalerweise kommt es nach dem Transfer von Gewebe auf einen fremden Empfänger zu einer Abstoßungsreaktion gegen das fremde Gewebe. Diese Reaktion wird als Host-versus-Graft-Reaktion bezeichnet.

Bei der Graft-versus-Host-Reaktion hingegen reagieren die T-Lymphozyten des Spendertransplantats gegen den Empfängerorganismus.

Reife T-Lymphozyten im Transplantat erkennen Antigenstrukturen gesunder Gewebe des Empfängers als fremd. Durch den Antigenkontakt mit dem Empfängergewebe werden T-Zellen aktiviert und können sich proliferieren. Es kommt zum immunologischen Angriff auf gesundes Gewebe, der sogenannten Graft-versus-Host-Disease (GvHD). Auslöser hierfür ist in der HLA-kompatiblen Situation, bei der zehn von zehn Gewebemerkmale übereinstimmen, die Erkennung von Minorhistokompatibilitätsantigenen durch die T-Zellen des Spendergewebes mit dem passenden T-Zell-Rezeptor.

So kann die Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat zur Vermeidung einer GvHD beitragen, zeigt jedoch aufgrund der Beeinträchtigung des Graft-versus-Leukämie-Effektes ebenso höhere Rezidivraten.

Des Weiteren wird zunehmend vermutet, dass neben den T-Zellen auch Zellen des angeborenen Immunsystems eine Rolle bei der Entstehung einer GvHD spielen.[6]

Der Ausdruck „Graft-versus-host-Reaktion“ stammt ursprünglich aus der Tiermedizin. Erstmals zeigte sich dieses Phänomen als bestrahlten Mäusen Milzzellen infundiert wurden. Obwohl sich die Mäuse von der Bestrahlung und der Aplasie erholen konnten, entwickelten sie Symptome wie Diarrhöe, Gewichtsverlust, Hautveränderungen und Leberabnormalitäten mit letalem Ausgang.[7]

Diese Beobachtung wurde von Billingham 1966 übernommen, der drei immunologische Grundvoraussetzungen definierte, die auch heute noch zutreffen.[8]

So muss das Transplantat immunkompetente Zellen enthalten und der Empfänger vom Transplantat als „fremd“ erkannt werden. Voraussetzung ist demnach das Vorhandensein von reifen T-Zellen im Knochenmark.[9] In klinischen Studien zeigte sich, dass die Ausprägung einer GvHD mit der Zahl der transplantierten T-Zellen korreliert.[10]

Zweite Voraussetzung ist, dass der Empfänger eine stark geschwächte Immunabwehr aufweist, sodass sein Immunsystem keinen Angriff auf das Transplantat ausführen kann.

Drittens exprimiert der Empfänger Gewebsantigene, die nicht im Spendertransplantat enthalten sind.

Die Symptome der GvHD äußern sich besonders in Darm, Leber, Lunge und auf der Haut.[11]

Ohne vorangegangene Immunsuppression tritt in den meisten Fällen die akute GvHD als Komplikation auf. Abhängig vom Grad der Histokompatibilität, dem Alter des Patienten, der Menge der transplantierten T-Zellen und der prophylaktischen Vorbehandlung variieren die Häufigkeiten von 10% bis zu über 80%.[12]

Zu den Risikofaktoren einer akuten GvHD gehören:

- Grad der HLA-Klasse I- und II-Identität zwischen Spender und Empfänger
- Geschlechts-Mismatch: weibliche Spenderin für männlichen Empfänger (T-Zellen erkennen Genprodukte des Y-Chromosoms)
- Weiblicher Spender mit vorangegangener Schwangerschaft
- Stammzellquelle: Blutstammzellen (PBSZ) > Knochenmark (KM) > Nabelschnurblut
- Anzahl der T-Lymphozyten im Transplantat bei HLA-mismatch Situation
- Keine Transplantataufreinigung
- Reduzierte immunsuppressive Prophylaxe: <80 % der Zieldosis von Methotrexat (MTX) oder Abfall des Cyclosporin (CyA)-Spiegels <200 ng/ml in den ersten Wochen nach Transplantation

- zunehmendes Alter des Empfängers und Spenders
- Ganzkörperbestrahlung
- Infektionen
- UV-Exposition

Das National Institute of Health unterscheidet aktuell die klassische akute GvHD bis zum 100.Tag nach SZT, die „late-onset“ akute GvHD, die nach 100 Tagen auftritt sowie die persistierende und rekurrende akute GvHD.

Sie betrifft die Haut, den Gastrointestinaltrakt und die Leber.

Auf der Haut zeigt sich ein makulopapulöses Erythem, das gegebenenfalls mit Blasenbildung und Epidermolyse einhergeht und häufig durch Juckreiz begleitet wird. Besonders betroffen sind hierbei lichtexponierte Hautareale wie Nacken, Dekolleté, Unterarme und Gesicht.

Ist der GI-Trakt betroffen leiden Kinder unter ausgeprägten blutig-schleimigen Durchfällen, die mit einem Flüssigkeits- und Elektrolytverlust sowie schmerzhaften abdominalen Krämpfen einhergehen. Durch den Flüssigkeitsverlust und die Translokation intestinaler Bakterien kann es bei den Betroffenen zu einer Sepsis im Blut kommen. Außerdem kann es zu Gerinnungsstörungen, sekundärer Anämie bis hin zu irreparabler Zerstörung der gesamten Mukosa und somit letalem Ausgang kommen.

Anzeichen einer Leberschädigung äußern sich klinisch in einem Ikterus durch den Anstieg des direkten Bilirubins. Es kommt zu einem Anstieg der alkalischen Phosphatase, Synthesestörungen mit Abfall des Serumalbumin und Gerinnungsparametern.

Dabei werden je nach Ausprägung und Anzahl der betroffenen Organe vier verschiedene Schweregrade der GvHD definiert.[13]

Zunächst wird der Schweregrad für jedes einzelne Organ ermittelt.[14]

	Haut	Leber	Darm
Schweregrad	Klinisches Bild	Billirubin mg/dl	Diarrhoe ml/Tag
1	Exanthem <25% der Körperoberfläche (KO)	2-3	500-1000
2	25-50% der KO	3,1-6	1000-1500
3	50% der KO	6,1-15	1500-2000
4	generalisierte Erythrodermie, oft Desquamation und Bulla	>15	>2000 oder schwere abdominelle Schmerzen und/oder Ileus

Tabelle 1: Schweregrad der einzelnen Organe zur Bestimmung einer aGvHD.

Die Tabelle zeigt die einzelnen Schweregrade für die Organe Haut, Leber und Darm zur Bestimmung des Grades der akuten GvHD.

Nach der Beurteilung der einzelnen Organe erfolgt die Einstufung des Gesamtschweregrades der GvHD (mod. nach Glucksberg).[14]

Grad	Haut	Leber	Darm	Karnofsky (%)
0	0	0	0	100
1 (leicht)	1-2 0	0 0-1	0 0-1	80
2 (moderat)	0 1-3 3	0-1 1 0	1 0-1 0	70
3 (schwer)	2-3	2-3	2-3	60
4 (lebensbedrohlich)	2-4	2-4	2-4	40-50

Tabelle 2: Einteilung des Gesamtschweregrades einer aGvHD.

Tabelle 2 zeigt den tatsächlichen Schweregrad, der durch die einzelnen Grade der Organe festgelegt wird.

Die chronische GvHD tritt gewöhnlich nach den ersten 100 Tagen nach der SZT auf und kann sich über Monate und Jahre erstrecken. Sie kann sich sowohl aus einer akuten Form heraus entwickeln (progressive Form), nach einem erkrankungsfreien Intervall auftreten (ruhige Form) oder auch als eigenständiges Krankheitsbild ohne vorangegangene Symptome (de novo) auftreten. [15]

Die Inzidenz der chronischen GvHD reicht von 30% bis hin zu 60%. [16] Sie betrifft vor allem die Haut und Schleimhäute mit chronischer Entzündung, Induration und Sklerosierung. Sie kann zeitweise durch virale und bakterielle sekundäre Infektionen begleitet werden und äußert sich in einem variablen Verlauf.

Die zelluläre Immunität wird durch spezifische Veränderungen beeinflusst. Es kommt zu einer Abnahme der Proliferation von B-Zellen, einer Beeinträchtigung der Antikörperproduktion gegen bestimmte Antigene, zur Reduktion und Funktionsbeeinträchtigung der CD4+ T-Zellen und einem Anstieg von unspezifischen Suppressor-Zellen.

Risikofaktoren, die das Auftreten einer chronischen GvHD wahrscheinlicher machen, sind:

- vorherige akute GvHD
- Grad der HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger
- Blutstammzellen als Stammzellquelle verglichen mit Knochenmark
- höheres Alter des Empfängers und des Spenders
- vorangegangene Infektion (Pneumonie, Gastroenteritis, CMV-Reaktivierung)

Die chronische GvHD unterscheidet zwei Schweregrade: limitiert oder komplex.[17]

Typ	Ausmaß der Erkrankung
limitiert	lokalisierte Hautbeteiligung, Leberdysfunktionen, oder beides
komplex	generalisierte Hautbeteiligung oder Leberdysfunktion plus eines der folgenden Symptome: -chronische, aggressive Hepatitis (nekrotisch oder zirrhotisch) - Augenbeteiligung - Beteiligung der Speicheldrüsen - Schleimhautbeteiligung- Beteiligung anderer Zielorgane

Tabelle 3: Einteilung der Schweregrade der cGvHD.

Die Tabelle unterscheidet die Schweregrade der chronischen GvHD (limitiert oder komplex) und beschreibt das dazugehörige Krankheitsbild.

Klinisch kommt es meist zu Hautveränderungen wie Lichen planus, Desquamation, Plaques, Dyspigmentation und Vitiligo, zudem Alopecia und Onychodysplasie.

Schwere Verläufe ähneln der Sklerodermie mit Indurationen, Gelenkkontrakturen, Atrophie und chronischen Hautulcerationen.

Zudem kann eine chronische Cholestase zur Leberzirrhose führen. Die Mukositis des GI-Traktes hat Gewichtsverlust zur Folge. Durch die Zerstörung exokriner Drüsen kommt es zum Sicca-Syndrom. Dieses hat Auswirkungen auf Haut, Augen, Mund, Atemwege und Ösophagus.

Ebenso kann das hämatopoetische System mit einer Thrombozytopenie betroffen sein.

Die Entstehung einer akuten oder chronischen GvHD sowie die Immunsuppression zur Prophylaxe einer GvHD erhöhen das Risiko des Empfängers an einer bakteriellen, viralen oder Pilzinfektion zu erkranken.[18]

Derzeit werden zur GVHD-Prophylaxe Ciclosporin A, Prednison, Methotrexat, FK506 und Mycophenolat Mofetil eingesetzt. Die Wahl der optimalen Prophylaxe wird von verschiedenen Zentren unterschiedlich gehandhabt. Die akute GVHD zeigt bei HLA- identischen Geschwistern eine Inzidenz von 10-40%. Dennoch gilt die Immunsuppression als Nachteil aller dieser Kombinationen, da es durch ihren generalisierten Effekt der Immunsuppression zu einer erhöhten Rate an lebensbedrohlichen Infektionen kommen kann und ebenfalls die immunologische Erkennung und Überwachung residualer Leukämiezellen durch das Transplantat negativ beeinflussen könnte.

Kommt es trotz vorangegangener Prophylaxe dennoch zu einer akuten GVHD, wird Decortin in steigender Dosis verabreicht. Ebenso kann die Verabreichung eines Antikörpers, der sich gegen den T-Zellrezeptor, den Interleukin-2-Rezeptor CD25 oder gegen das proinflammatorische Zytokin- α richtet, indiziert sein.

Dennoch ist der Verlauf stark vom Ausprägungsgrad der GVHD und vom Ansprechen auf Decortin abhängig. Steroidresistente Verläufe zeigen eine Mortalität von bis zu 80%.

1.3 Zytokine und GvHD / Abstoßungsreaktion

1.3.1 Zytokine allgemein

Zytokine sind von einer Zelle gebildete kleine, lösliche Proteine, die die Eigenschaften oder das Verhalten dieser oder einer anderen Zelle beeinflussen. Sie spielen bei der Immunantwort eine zentrale Rolle. Zytokine werden in unterschiedliche Gruppen wie Interleukine, Interferone, Hämatopoetine, Tumornekrosefaktor, Tumorstromafaktor und Chemokine eingeteilt. [19]

1.3.1.1 Interferon- γ

Interferon- γ ist ein Glykoprotein aus der Klasse der Zytokine. Th1-Zellen zeigen sich für die zelluläre Immunität verantwortlich und aktivieren Makrophagen. Dies führt zur Expression von IFN- γ . IFN- γ zeichnet sich durch seine

immunstimulierende, antivirale sowie antitumorale Wirkung aus. Es führt zur Differenzierung von B-Zellen sowie zur Synthese von IgG2a. Zudem verursacht es die Inaktivierung von T-Zellen und die Aktivierung von NK-Zellen durch seinen Einfluss auf den Anstieg der MHC I- und II-Rezeptoren auf Makrophagen und aktiviert diese. Somit trägt es zur Stimulation und Unterstützung der zellulären Abwehr bei und supprimiert die Aktivität von Th2-Zellen.

1.3.1.2 TNF- α

TNF- α wird ebenfalls hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert und kann bei der Aktivierung von Makrophagen mit IFN- γ kooperieren. Besonders gilt dies für die Induktion von reaktiven NO, das eine breite antimikrobielle Aktivität aufweist.

TNF- α kann zudem weitere Prozesse wie Apoptose, Zellproliferation und – differenzierung, sowie die Ausschüttung weiterer Zytokine auslösen. Durch den zytotoxischen Faktor ist es in der Lage Tumorzellen direkt abzutöten.

1.3.1.3 IL-6

Interleukin-6 gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine. Es spielt bei der angeborenen, unspezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle und vermittelt die spezifische und unspezifische Immunreaktion im Bezug auf Entzündungsprozesse.

1.3.1.4 TGF- β 1

Die humorale Immunität wird durch Th2-Zellen reguliert. Diese regen B-Zellen zur Proliferation an und es kommt zur Ausschüttung von TGF- β (Tumor Growth Factor). TGF- β 1 zählt zu den inhibitorischen Zytokinen und blockiert die Makrophagenaktivierung.

Th2-Zytokine werden üblicherweise bei starken Allergien und Antikörperreaktionen nachgewiesen.

1.3.1.5 IL-10

Th2-Zellen sezernieren ebenfalls IL-10. IL-10 induziert einen Anstieg der MHC II-Rezeptoren auf B-Zellen. Ebenso hemmt es die Wirkung der Th1-Zellen und die Freisetzung von Zytokinen auf Makrophagen.

Des Weiteren ist es an der Stimulierung des Wachstums von Makrophagen beteiligt.

Durch seine antiinflammatorische Wirkung schützt es den Organismus vor einer Selbstzerstörung durch eine übermäßige Immunantwort. Hierbei hemmt es die Produktion von proinflammatorischen Faktoren wie beispielsweise IFN- γ oder TNF- α .

1.3.2 Zytokine und GvHD

Trotz großer Fortschritte bleibt die GvHD die häufigste und schwerste Komplikation nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Sie kann als überschießende Manifestation eines normalen Entzündungsmechanismus angesehen werden, bei der Spenderlymphozyten auf fremde Antigene stoßen und eine Entzündungsreaktion fördern. Im Zusammenhang von hämatologischen Erkrankungen besteht ein schmaler Grat zwischen der schadhafte Konsequenz einer GvHD und dem positiven Effekt einer GvL.

T-Zellen sind immunkompetente Zellen. Wird demnach Gewebe von einem fremden Spender transplantiert, welches T-Zellen enthält (Blutprodukte, Knochenmark oder Organe), die vom Empfänger nicht eliminiert werden können, kann eine GvHD entstehen. So können beispielsweise Calcineurin-Inhibitoren, welche die Aktivierung von T-Zellen verhindern, das Anwachsen eines Transplantats unterstützen und weisen ebenso ein geringes GvHD-Vorkommen auf.

Die Übereinstimmung von major histocompatibility complex (MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex) und/oder minor histocompatibility antigens (Nebenhistokompatibilitätsantigenen) zwischen Spender und Empfänger spielt zudem eine große Rolle.

Im menschlichen Organismus liegt die MHC Region auf dem kurzen Arm auf Chromosom 6 und wird als HLA (human leukocyte antigen)-Region bezeichnet. Klasse I HLA Proteine werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während Klasse II Proteine auf hämatopoetischen Zellen vorkommen und zudem von anderen Zelltypen nach einer Entzündung oder Verletzung exprimiert werden können. Das Auftreten einer GvHD wird direkt mit einem HLA-Unterschied in Verbindung gebracht. Je mehr HLAs sich unterscheiden, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten einer GvHD.

Trotz HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger kommt es dennoch zum Auftreten einer GvHD. Die Wahrscheinlichkeiten reichen von 26% bis 32% bei Geschwistern und von 42% bis 52% bei nichtverwandten Spendern. Das Auftreten wird mit genetischen Unterschieden außerhalb der HLA-Lokalisation, den „minor“ histocompatibility antigens (HA) in Verbindung gebracht. Ebenso spielen Zytokingenpolymorphismen von Spender und Empfänger eine Rolle bei der Entstehung einer GvHD. Es zeigte sich, dass das Auftreten und Ausmaß einer GvHD mit einer erhöhten Synthese von pro-inflammatorischen Th1-Zytokinen korreliert, wohingegen anti-inflammatorische Th2-Zytokine das Risiko für eine GvHD senken. [20, 21]

Unter anderem werden Tumor Nekrose Faktor ($TNF-\alpha$), Interleukin 10 (IL-10) und Interferon- γ (IFN- γ) mit der Entstehung einer GvHD assoziiert.

Die akute GvHD wird von Spenderlymphozyten vermittelt, wenn diese auf hochgradig zerstörtes Empfängergewebe infolge der zugrundeliegenden Erkrankung, vorangegangener Infektionen oder der Konditionierung treffen. Die allophenen Spenderzellen fördern die Aktivierung und Proliferation von Entzündungszellen. Die akute GvHD spiegelt also eine überschießende Antwort eines normalen Entzündungsmechanismus wider, der Spender-T-Zellen sowie das angeborene und adaptierte Immunsystem und deren Mediatoren miteinschließt.

Die Dysregulation von Zytokinen unterscheidet 3 Phasen: 1. die Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen (APCs), 2. die Aktivierung, Proliferation,

Differenzierung und Migration von Spender-T-Zellen und 3. die Entzündung und Zerstörung von Zielgewebe.

Phase 1: Die Konditionierung

Die einer allogenen Stammzelltransplantation vorangehende Chemotherapie und Bestrahlung wird als Konditionierung bezeichnet und ist maßgeblich an der Entstehung einer GvHD beteiligt. Durch die Bestrahlung und die zugrunde liegende Krankheit wird Gewebe umfangreich geschädigt und inflammatorische Zytokine werden ausgeschüttet. Es kommt zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 sowie Chemokine wie CCL2-5 und CXCL9-11 und somit zur Expression von Adhäsionsmolekülen, MHC Antigenen und costimulierenden Molekülen auf Empfänger-APCs. Zudem werden die Schleimhäute des GI-Traktes durch die medikamentöse Konditionierung geschädigt, sodass Endotoxine und Lipopolysaccharide (LPS) durch den bakteriellen Zerfall freigesetzt werden. Das erhöhte Niveau von $\text{TNF-}\alpha$ beeinflusst klinisch den Schweregrad der Komplikationen und die Überlebenschancen nach einer Knochenmarktransplantation. [22, 23] Die Intensität des Konditionierungsregimes und der Schweregrad der Gewebeschädigung beeinflussen das Risiko einer GvHD. Eine Reduzierung der Intensität soll das Risiko einer GvHD senken, da das Empfängergewebe weniger stark geschädigt wird.

Phase 2: Die T-Zell Aktivierung

Die zweite Phase beinhaltet die Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Migration der T-Zellen des Spenders. Die T-Zell-Rezeptoren des Spenders erkennen Alloantigene auf APCs von Empfänger und Spender. Die Spender-T-Zellen erkennen bei direkter Präsentation entweder Peptide, die an Empfänger-MHC-Moleküle gebunden sind oder die fremden MHC Moleküle selbst. Bei der indirekten Präsentation werden MHC-Derivate erkannt. Durch die Antigen-Erkennung erhöht sich die Affinität zwischen T-Zell-costimulierenden Molekülen und ihren Liganden auf APCs und führt zur vollständigen T-Zell-Aktivierung.

T-Zellen setzen in aktivierter Form Zytokine frei. Diese werden als Th1 (IFN- γ , IL-2 und TNF- α) oder Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) sowie Th17 klassifiziert. Das Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2 spielt im Rahmen der Immunpathogenese der GvHD eine wichtige Rolle.

Die proinflammatorische Th1-Zytokine IL-2 und IFN- γ , die in dieser Phase überwiegen, werden von CD4+ und CD8+ T-Zellen gebildet.[24, 25]

IL-2 und IFN- γ zählen zu den entscheidenden Mediatoren einer akuten GvHD. Die Immunantwort gegen Alloantigene wird durch sie kontrolliert und verstärkt und zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen werden aktiviert. [26]

Ebenso regen sie Monozyten zur Produktion von IL-1 und TNF- α (proinflammatorische Zytokine) an. TNF- α , das bereits in Phase 1 zur Aktivierung der APCs beigetragen hat, verstärkt nun die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation in dieser zweiten Phase.

IFN- γ zeigt in vivo sowohl GvHD-mildernde als auch -fördernde Effekte. Hinsichtlich der Verstärkung der GvHD steigert es die Expression von Chemokin-Rezeptoren, MHC Proteinen und Adhäsions-Molekülen. Zudem sensibilisiert es Monozyten und Makrophagen für Stimuli wie LPS, die intrazelluläre Kaskaden beschleunigen. Des Weiteren schädigt es direkt die Zellen des GI-Trakts und der Haut.

IL-10 senkt das Risiko einer GvHD, indem es die Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle sowie antigenpräsentierender und costimulierender Moleküle in Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen und T-Zellen senkt.

Ein weiteres suppressives Zytokin, TGF- β , dämpft laut Studien das Risiko einer akuten GvHD, könnte jedoch eine chronische GvHD zur Folge haben.

Somit sind verschiedene Zytokine für die Pathogenese und Regulierung einer GvHD von Bedeutung. Zudem spielen Zeitpunkt und Wirkdauer eine entscheidende Rolle.

Phase 3: Der inflammatorische Mechanismus

In der dritten Phase werden verschiedene Effektoren in einer komplexen Kaskade aktiviert. Diese Mediatoren verstärken lokale Gewebeschäden und zerstören Zielgewebe. Diese Effektorphase involviert sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem sowie proinflammatorische Zellen und Zytokine. Es kommt zur Ausschüttung multipler Zytokine, die eine spezifische Zytotoxizität gegenüber dem Empfänger ausweisen. Die Übermittlung erfolgt durch CTL's (Cytotoxic T cells) via Fas/Fas Liganden (FasL) in der Leber und Perforin/Granzym-Übertragungsweg im GI-Trakt und auf der Haut[27, 28], NK-Zellen[29] und Stickstoffoxid[30]. Chemokine und Adhäsionsmoleküle führen die Spender-T-Zellen aus dem lymphatischen Gewebe zum Zielgewebe.

IL-2 aktiviert zusätzliche transplantierte mononukleare Zellen. Diese sezernieren zusätzlich inflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- α und IFN- γ bis es letztendlich zum Organversagen kommt.[31]

TNF- α wird sowohl von Spender- als auch von Empfänger-Zellen produziert und ist eine entscheidende Komponente in der Pathophysiologie der GvHD.

Es (1) aktiviert APCs und fördert die Antigenpräsentation, (2) rekrutiert durch inflammatorische Chemokine Effektorzellen zu den Zielorganen und (3) schädigt Gewebe direkt durch Apoptose und Nekrose.

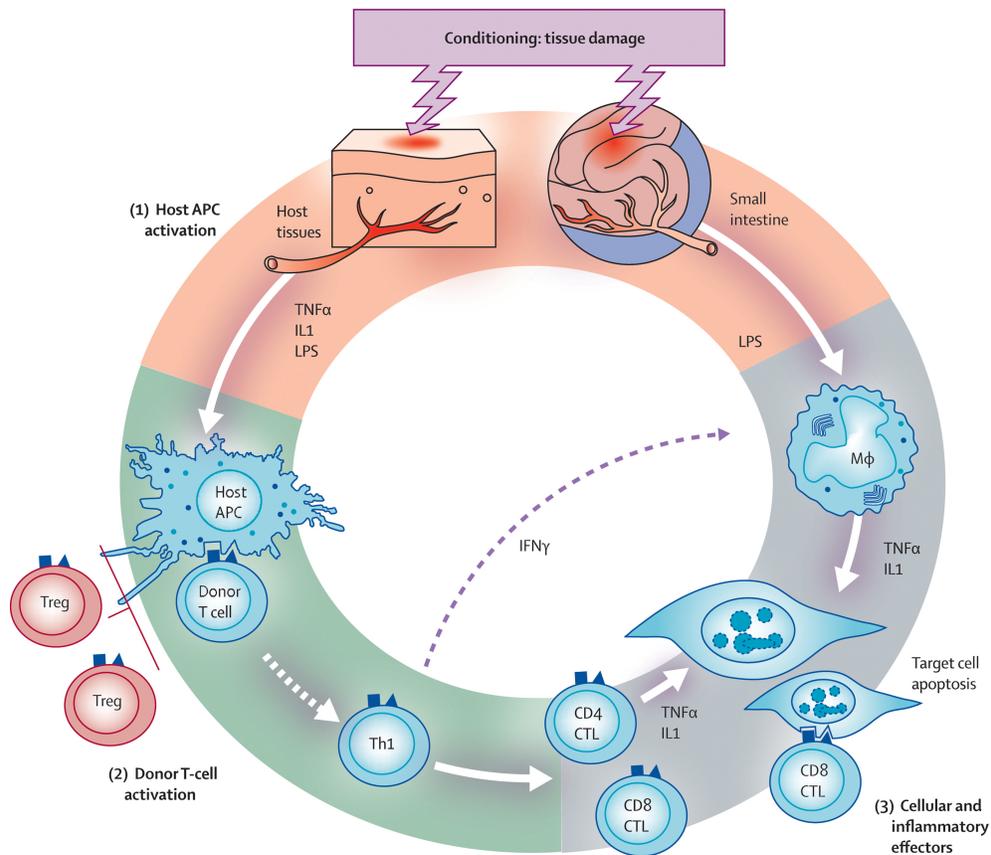


Abbildung 1: Die Immunpathophysiologie der GvHD: [11]

Die Abbildung zeigt die drei Phasen der Entstehung der aGvHD. Phase 1 entspricht der Konditionierung, Phase 2 zeigt die T-Zell-Aktivierung und Phase 3 den inflammatorischen Mechanismus.

1.4 Fragestellung

Zytokinen kommt in den komplexen Wirkungsmechanismen des Immunsystems als Immunmodulatoren eine entscheidende Rolle zu. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Zytokingenpolymorphismen einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf maligner Erkrankungen haben und im soliden Transplantatsetting eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Dissertation beschäftigen wir uns mit der Frage, ob und inwieweit Zytokingenpolymorphismen neben den bereits bekannten klinischen

Risikofaktoren für die Entstehung und den Verlauf einer Graft-versus-Host-Disease eine Rolle spielen.

Dafür wurden sowohl Zytokingenpolymorphismen der Spender als auch der Empfänger im Zeitraum von April 2013 bis September 2014 untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, genetisch determinierte Polymorphismen von den Zytokingenen TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-6 und IFN- γ unter Verwendung von sequenzspezifischen PCR nach ihrem Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf einer GvHD zu untersuchen. Da ebendiese Zytokine in der Immunpathophysiologie der Graft-versus-Host-Disease eine Rolle spielen, wurde untersucht, ob bei Entstehung dieser Erkrankung eine genetische Determinierung vorliegt.

Grundlegend beschäftigten wir uns mit folgenden Fragen:

Wie ist die generelle Verteilung der Zytokingenpolymorphismen bei den Patienten?
Besteht eine Korrelation der Zytokingenpolymorphismen mit der Grunderkrankung oder dem Outcome?

Spielt für das Outcome ein Polymorphismus des Spenders oder des Patienten selbst eine Rolle?

Gibt es Polymorphismen und /oder klinische Kriterien, die das Risiko für die Entwicklung einer akuten oder chronischen GvHD erhöhen?

Spielt eine Differenz der Zytokinpolymorphismen zwischen Spender für das Outcome und für die GvHD-Entwicklung eine Rolle?

Demnach könnten sich Zytokine als biologische Marker etablieren und zur Erkennung immunologischer Risikofaktoren herangezogen werden. Somit können diese Informationen für eine individualisierte Therapie herangezogen und die Prognose einzelner Patienten verbessert werden.

2 Material

2.1 Studiendesign

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Votum Nr. 288/11).

Die vorliegende Arbeit untersucht Kinder mit malignen Erkrankungen auf die Polymorphismen der TNF- α -, TGF- β 1-, IL-10-, IL-6- und IFN- γ -Gene. Aus Patientenakten und Arztbriefen wurden für jeden Patienten Stamm- und Verlaufsdaten erhoben:

Stammdaten:

- Geschlecht
- Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose
- Zeitpunkt der Probe (vor/ nach Stammzelltransplantation)
- Diagnose (Leukämie, Lymphom, sonstiges, solider Tumor, Hirntumor)
(unter der Diagnose „sonstiges“ sind folgende Erkrankungen zusammengefasst: Langerhans-Zell-Histiozytose, Granulomatose, Autoimmumentropathie, Myelodysplastisches Syndrom, Wiskott-Aldrich-Syndrom, Immundefekt, Kongenitale dyserythropoetische Anämie, Fanconie-Anämie, Schwere aplastische Anämie, Diamond-Blackfan-Anämie, Glanzmann-Thrombasthenie)

Verlaufsdaten:

- Relevante Daten zur SZT und Vorbehandlung
- Follow-Up in Tagen seit der Diagnose bis Remission / Rezidiv / Tod
- Outcome (Remission / Rezidiv / Tod)
- Auftreten und Grad sowie Lokalisation einer GvHD

2.2 Patienten

Diese Arbeit umfasst die Untersuchungen von 72 pädiatrischen Patienten, die in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburgs behandelt wurden.

Im Rahmen von Routineuntersuchungen wurden von Patienten im Zeitraum von April 2013 bis September 2014 EDTA-Blutproben verwendet. Aus diesen Proben wurde mittels des *GF-1 DNA Kit* der Firma *Vivantis*, Berlin, DNA isoliert. Bei den übrigen Proben wurde auf asservierte Proben zurückgegriffen. Diese wurden mittels Ficoll aufgearbeitet, um anschließend aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) DNA gewinnen zu können. Die Extraktion der DNA erfolgte aus bei -80°C gelagerten PBMCs.

2.3 Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Agarose-Gel-Elektrophorese	Midi-Kammer mit Elektrophorese	Renner, Konstanz
Automatische Pipette	Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik
Gefrierschränke	- 20°C - 80°C Hera freeze	Kirsch Heraeus, Hanau,
Mikroskop	Lichtmikroskop	Hund, Wetzlar
Meßküvette	Suprasuk Quarzglas	Hellma, Müllheim
Mikrowelle	AFK MWG 17	AFK, Mannheim
Zählkammer	Neubauer Zählkammer mit Deckglas	Superior Marienfeld
Odysse ® Infrared Imaging System	Odyssey CLx	Licor, Lincoln USA

Tabelle 4: Geräte, Bezeichnungen nach Herstellerangaben.

Photometer	Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterile Werkbank	HeraSafe	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Vortexgerät	Vortex REAX control	Heidolph, Nürnberg
Waage	EMB 200-2	Kern, Ballingen
Zentrifugen	Galaxy Mini Mikro 22 R, Rotiva 50 RS Mikro 200R Rotant a 460 RS	VWR Hettich, Tuttlingen Hettich, Tuttlingen Hettich, Tuttlingen

Fortsetzung Tabelle 4: Geräte, Bezeichnungen nach Herstellerangaben.

2.4 Laborbedarf

Artikel	Hersteller
'96 well' PCR Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen
Abdeckfolie (Silverseal)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Combitips advanced (0,1 ml und 2,5ml)	Eppendorf Biopur, Hamburg
Einmalhandschuhe	Bioworld, Meggen
Falcon Röhrchen (15ml und 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glaswaren (Meßzylinder, Bechergläser)	Schott, Mainz
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
PCR Thermo Strip	Biozym Scientific, Oldendorf
Pipetten 0,1-2,5µl, 0,5-10µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgläser	Schott, Mainz
Thermofolie (Adhesive Sealing Sheets)	Thermo Scientific
Tubes	NUNC, Roskilde, Dänemark

Tabelle 5: Laborzubehör, Bezeichnungen nach Herstellerangaben

2.5 Chemikalien, Enzyme, Kits und Primer

Artikel/Beschreibung	Hersteller
Agarose NEEQ Ultra Quality	Roth, Karlsruhe
DNA Ladder 100bp	New England Bio Labs, Frankfurt/M.
DNA Ladder 50bp	New England Bio Labs, Frankfurt/M.
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis
FicoLite-H (Human)	Linaris, Wertheim-Bettingen
Gel Loading Dye, Orange	New England Bio Labs, Frankfurt/M.
Kit zur DNA-Extraktion: <i>GF-1 Blut DNA Extration Kit</i> <ul style="list-style-type: none"> • Gel filtration(GF) -1 Column • Collection Tubes • Buffer BB • Proteinkinase K • RNase A • Wash Buffer 1 • Wash Buffer 2 • Elution Buffer 	Vivantis, Berlin
Mastermix	One Lambda, Inc, Los Angeles
Primer (TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ , IL-6 und IL-10)	One Lambda, Inc, Los Angeles
Phosphat gepufferte Salzlösung = PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma, Taufkirchen
RPMI – 1640 Kulturmedium	Sigma, Taufkirchen
Syto 60 fluorescent nucleic acid stain	Molecular Probes, Eugene USA
TAE Puffer (Tris-Acetate-EDTA-Buffer)	Sigma, Mainz
Taq Polymerase	Genaxxon Bioscience, Ulm
TBE-Puffer (0,45M Trissäure; 0,1 M EDTA)	Selbsterstellung
Wasser, steril	Sigma, Mainz

Tabelle 6: Chemikalien und sonstige Reagenzien, Bezeichnungen nach Herstellerangaben.

3 Methoden

3.1 DNA-Extraktion

Mit dem *GF-1 Blut DNA Extraktion Kit* von *Vivantis*, Berlin wurde die DNA-Isolierung nach venöser Blutentnahme aus Patientenproben durchgeführt. Nach Herstellerprotokoll wurden 200µl Vollblut mit 20µl Proteinkinase K und 200µl Buffer BB gevortext, lysiert und anschließend für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Daraufhin wurden 20µl RNase A addiert und die Probe für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 200µl Ethanol (96-100%) wurde die Probe durchmischt und in die dafür vorgesehene Säule (GF-1 (Gel filtration) Column) überführt. Die DNA, die sich an der Membran der Säule festsetzte, wurde durch zwei Waschpuffer (500µl) gereinigt und zentrifugiert (2× 1 Minute 5000g bzw. 1× 3 Minuten 14000g) und im Anschluss durch den Elutionspuffer (100µl) nach Inkubation (1Minute) von der Membran gelöst.

Die DNA-Extraktion der übrigen Proben erfolgte aus den bei -80°C gelagerten mononuklearen Zellen des peripheren Blutes. Diese wurden zunächst mittels Ficoll isoliert (Lymphozyten und Monozyten). Dabei wurden 2ml Blut mit 2ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt und langsam auf 4ml Ficoll geschichtet. Diese Kombination wurde anschließend für 20 Minuten zentrifugiert, um diese nach verschiedenen Dichten aufzuteilen (bei 800g bei 20°C) (3_II_R3). Aus der Interphase zwischen Serum und Ficoll wurde die Zellfraktion abgesaugt und das Serum für eine spätere Bearbeitung in ein Extragefäß abgefüllt. Um Rückstände der zytotoxischen Trennlösung zu entfernen, erfolgte ein zweimaliger Waschgang bei 300g für 5 Minuten (9_II_R9). Nach anschließender Bestimmung der Zellkonzentration mittels *Neubauer* Zählkammer wurden die gewonnenen Zellpellets bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

3.2 Photometrische Quantifizierung von DNA

Mittels photometrischer Messung wurde die gewonnene DNA quantifiziert. 2 μ l der DNA-haltigen Lösung wurden auf 98 μ l aqua ad inject gegeben. Bei 260nm/280nm wurde die Konzentration der DNA im UV Spektroskop bestimmt. Optimal liegt die Konzentration bei 25-200ng/ μ l.

Häufig liegt durch Proteine eine Verunreinigung der DNA vor. Durch die Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260nm und 280nm kann die Reinheit der DNA eingeschätzt werden. Liegt dieser Quotient über 1,8 ist die DNA nicht von Proteinen verunreinigt.

3.3 Polymerase chain reaction (PCR)

Um bestimmte DNA-Sequenzen zu vervielfältigen bedient man sich der Polymerase-Kettenreaktion oder kurz PCR (engl. polymerase chain reaction). Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten *in vitro*. [32] Die DNA-Polymerase synthetisiert, ähnlich der körpereigenen DNA-Replikation, einen komplementären Strang zu der gewünschten DNA-Sequenz, wodurch nach mehrmaliger Wiederholung Kopien des DNA-Abschnitts erstellt werden können. Da hierbei einzelne Schritte immer wieder wiederholt und Kopien von Kopien erstellt werden, spricht man von einer Kettenreaktion.

Das Genotypisierungskit (Cytokine Genotyping Tray, One Lambda, Inc., Los Angeles) beinhaltet sequenzspezifische DNA-Oligonukleotide als Primer zur Vervielfältigung von Tumor necrosis factor - α (TNF- α), Transforming growth factor - β 1 (TGF- β 1), Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin 6 (IL-6) und 10 (IL-10), sowie das humane β -Globulin Gen als Kontrolle der Integrität. Durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, der Taq Polymerase, erfolgt die Amplifikation. Dieses thermostabile Enzym wird aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) gewonnen und katalysiert

die Synthese von DNA-Polynukleotiden und kann somit für die DNA-Amplifikation verwendet werden[33, 34].

Die PCR beinhaltet die drei Teilschritte Denaturierung, Annealing und Polymerisation.

Die Denaturierung besteht aus der Erhitzung der doppelsträngigen DNA auf 96°C. Hier werden die bestehenden Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen und bieten somit freie DNA-Einzelstränge, an die sich die Primer anschließend anlagern können. Durch die Initialisierung, das längere Erhitzen der Produkte, wird sichergestellt, dass sowohl Primer als auch DNA vollständig voneinander getrennt sind.

Dem Schritt der Denaturierung folgt das Primerannealing (Primerhybridisierung). Hier werden die DNA-Einzelstränge auf 63°C abgekühlt und die Primer können sich an die DNA anlagern. Die Primer liegen im Überschuss vor, sind kleiner und somit auch wendiger und können sich daher schneller als der komplementäre DNA-Strang anlagern.[35] Eine zu niedrige Temperatur kann zu einer unspezifischen Bindung der Primer an das Template und somit zu unspezifischen Produkten führen. Eine zu hoch gewählte Temperatur verhindert durch die thermischen Bewegungen der Primer die Anlagerung der Primer an das Template. Deshalb sollte die Temperatur ca. 3-5°C unter der Schmelztemperatur liegen.

Abschließend synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend von den angelagerten Primern komplementäre Stränge zur DNA in Richtung 5'-Ende. Der gewünschte Abschnitt der DNA ist nun dupliziert und kann für einen neuen Zyklus verwendet werden. Da der Primer den Anfang eines neuen Einzelstrangs bildet, wird er bei einem erneuten Zyklus nicht wieder abgelöst.

PCR-Ansatz:

- 140µl dNTP-Buffer Mix (D-Mix)
- 1µl Taq-Polymerase
- 19µl extrahierte DNA
- 1µl destilliertes Wasser

- vorpipettierte Primerplatten zu je 2µl TNF-α, TGF-β1, IFN-γ, IL-6 und IL-10

Für jeden Durchlauf der Polymerasekettenreaktion wurde jeweils ein Master- bzw. D-Mix zu 140µl verwendet und mit 1µl Taq-Polymerase (5U/µl) angesetzt. Für die Negativkontrolle wurden hieraus 7µl und 1µl destilliertes Wasser verwendet. Dem übrigen D-Mix wurden 19µl extrahierte Patienten-DNA hinzugefügt und nach Durchmischung in die vorpipettierte Primerplatte verteilt. Der Ansatz für eine DNA-Probe besteht aus 16 Tubes, die nach folgendem Pipettierschema mit 2µl unterschiedlicher Primer angesetzt wurden:

1	2	3	4	5	6	7	8
Negativ Kontrolle	TNF-α Promoter -308A	TNF-α Promoter -308G	TGF-β1 Codon 10T	TGF-β1 Codon 10 C	TGF-β1 Codon 25C	TGF-β1 Codon 25G	IL-10 Promoter -1082A, -819T
9	10	11	12	13	14	15	16
IL-10 Promoter -1082G, -819 C	IL-10 Promoter -1082A, -819 C	IL-10 Promoter -819T, -592A	IL-10 Promoter -819C, -592C	IL-6 Promoter -174C	IL-6 Promoter -174G	IFN-γ Intron1 +874T	IFN-γ Intron1 +874C

Tabelle 7: Pipettierschema der Primer.

Nach Aufkleben einer Thermofolie und anschließendem Zentrifugieren folgt die Amplifikation im Thermocycler nach folgenden Parametern:

1.) Denaturierung:

1. 96°C für 130 Sekunden
2. 63°C für 60 Sekunden

2.) Annealing:

1. 96°C für 10 Sekunden
2. 63°C für 60 Sekunden

3.) Polymerisation:

1. 96°C für 10 Sekunden
2. 59°C für 50 Sekunden
3. 72°C für 30 Sekunden

4.) Abkühlen und Holding bei 4°C bis der Thermocycler geöffnet wird

Einstellung: Temp Mode: Standard; Deckeltemperatur 105°C

Anschließend erfolgt die Analyse der Proben mit Hilfe eines Agarosegels.

3.4 Primersequenzen

Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 8 zusammengefasst:

Zytokin	Primer	Primersequenz
TNF- α	-308G	5'-GAGGGGCATGQGGACGG-3'
	-308A	5'-CCCGTC~CATGCCCTC-3'
TGF- β 1	Codon 10C	5'-GCTGCTGCCGCTGCTGC-3'
	Codon 10T	5'-GCTGCTGTGCTGCTGCT-3'
	Codon 25G	5'-GCCTGGCCGGCCGGCCG-3'
	Codon 25C	5'-GCCTGGCCCGCCGGCCG-3'
IL-10	-1082G	5'-TTCTTTGGGAGGGGGAAG-3'
	-1082A	5'-ACTTCCCCTTCCCAAAGAA-3'
	-819C	5'-CAGGTGATGTAACATCTCTGTGC-3'
	-819T	5'-GCACAGAGATATTACATCACCTGT-3'
	-592C	5'-CCGCCTGTCCTGTAGGAA-3'
	-592A	5'-TTCCTACAGTACAGGCGGG-3'

Tabelle 8: Primersequenzen [36]

Zytokin	Primer	Primersequenz
IL-6	-174C	5'-GAGCTTCTCTTTTCGTTCC-3'
	-174G	5'-CCCTAGTTGTGTCTTGCC-3'
IFN- γ	+874T	5'-GCTGTCATAATAATATTCAGAC-3'
	+874A	5'-CGAGCTTTAAAAGATAGTTCC-3'

Fortsetzung Tabelle 8: Primersequenzen.[36]

3.5 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese werden die PCR Produkte aufgetrennt. Dieses Verfahren beruht darauf, ionische Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Beweglichkeit im elektrischen Feld aufzutrennen. Dabei werden kleine, negativ geladene Teilchen schneller beschleunigt als große, positiv geladene. Zudem verlangsamt eine erhöhte Viskosität die Wanderungsgeschwindigkeit, während eine erhöhte Feldstärke diese erhöht[37].

Für die Herstellung eines 1,5%-igen Agarose Gels werden zunächst 100ml des TAE Puffer Konzentrats mit 900ml destilliertem Wasser vorverdünnt. Neben 300ml vorverdünnten Puffer benötigt man 4,5g Agarose, die im Puffer aufgelöst und ca. 10 Minuten aufgekocht werden bis eine klare Lösung entsteht. Dieser werden 6 μ l Syto 62 als Farbstoff zugegeben, vermischt und das Agarose-TAE-Gemisch in eine Gelkammer eingefüllt.

In diese Gelkammer werden 3 Kämme a 34 Taschen von 0,2cm eingesetzt, die jeweils ein Volumen von 10 μ l fassen können. Das Gel sollte eine Schichtdicke von ca. 0,5 cm aufweisen, härtet bei Raumtemperatur ca. 30 Minuten aus und wird anschließend in ein mit TAE-Puffer gefülltes Gelelektrophorese-Gerät eingesetzt.

Die PCR-Produkte werden mit 2 μ l Ladepuffer (Gel Loading Dye Orange) gemischt, zentrifugiert und in die Geltaschen aufgetragen.

Zudem wird eine benachbarte Gelfasche mit 10 μ l DNA-Leiter (100bp DNA Ladder) gefüllt, der parallel zum PCR Produkt mitläuft, um die Größe der einzelnen Banden bestimmen zu können.

Die Grundeinstellungen der Elektrophorese betragen bei Gleichspannung 150V, 500mA und 150W.

Es kommt hierbei zu einer Auftrennung der DNA-Produkte, da sich kleinere Teilstücke schneller durch das Gel bewegen können als größere.

Nach ca. 60 Minuten wird das Gel aus dem Elektrophorese-Gerät genommen, auf den Licor Odyssey Scanner (Licor, Lincoln USA) gelegt und eingescannt.

Der Scann wird unter folgenden Einstellungen durchgeführt: DNA Gel, Resolution 169 μ m, Quality: lowest, Intensity 700 bei 2.0, Focus Offset 2,0mm.

Anschließend werden die Bilder mittels Odyssey Software (Licor, Lincoln USA) ausgewertet und archiviert.

Durch das spezifische Bandenmuster können nun die Proben den Allelen direkt zugeordnet werden.

Die interne Kontrollbande des β -Globulin Gens (obere Bande) dient gemeinsam mit der Primerbande, die sich am weitesten entfernt von den Gelfaschen befindet, als Größenmarker. Jede Bande zwischen der internen Kontrollbande und der Primerfront stellt eine positive Typisierungsbande dar, die für die spezifischen Zytokin-Polymorphismen relevant ist.

Beim Auftreten einer positiven Typisierungsbande kann das Produkt der Kontrollbande gänzlich fehlen oder schwach ausgeprägt sein. Dies ist auf Unterschiede der Konzentration und Schmelztemperatur bei den spezifischen Primerpaaren und dem internen Kontroll-Primerpaar zurückzuführen.

Ein Schema für die Gelauswertung wird in Abbildung 2 dargestellt.

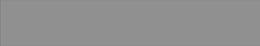
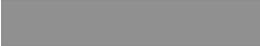
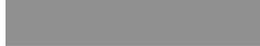
	Positiv-Reaktion	Negativ-Reaktion	Keine Verstärkung
Geltasche			
Interne Kontrollbande (ca. 750bp)			
Positive Typisierungsbande (zwischen 125 und 300bp)			
Primerbande (0bp)			

Abbildung 2: Darstellung eines schematischen Bandenmusters zur Gelauswertung.

Die Abbildung zeigt schematisch die Möglichkeiten der Bandenmuster bei der Gelauswertung. In der Horizontalen werden die einzelnen Möglichkeiten dargestellt. Die Vertikale zeigt die Banden, die analysiert werden. Zeigt sich neben der Primerbande bei 0bp sowohl eine positive Primerbande sowie eine interne Typisierungsbande sprechen wir von einer Positiv-Reaktion. Bleibt jedoch die positive Typisierungsbande aus, eine interne Kontrollbande tritt jedoch auf, handelt es sich um eine Negativ-Reaktion. Wird keine der beiden Banden dargestellt fand keine Verstärkung statt.

3.6 Auswertung der Ergebnisse anhand eines Beispiels

3.6.1 Einführung in die Auswertung anhand des TNF- α -SNP

Anhand der Bandenkonstellation von TNF- α kann man Rückschlüsse auf den Genotyp und seine Expressionsrate ziehen. Folgende Abbildung zeigt schematisch die Auswertungsmaske für den TNF- α -SNP. Sobald sich zwischen interner Kontrolle und Primerfront eine Bande zeigt, geht man von einer positiven Typisierungsbande aus.

	TNF- α Promotor - 308 A (125 bp)	TNF- α Promotor - 308 G (125 bp)	TNF- α Promotor -308 A (125 bp)	TNF- α Promoto r -308 G (125 bp)	TNF- α Promoto r -308 A (125 bp)	TNF- α Promotor -308 G (125 bp)
Geltasc he						
Interne Kontroll bande						
Typisier ungsba nde	 Negativ	 Positiv	 Positiv	 Positiv	 Positiv	 Negativ
Primerb ande						
Genotyp	G/G (niedrig)		G/A (hoch)		A/A (hoch)	

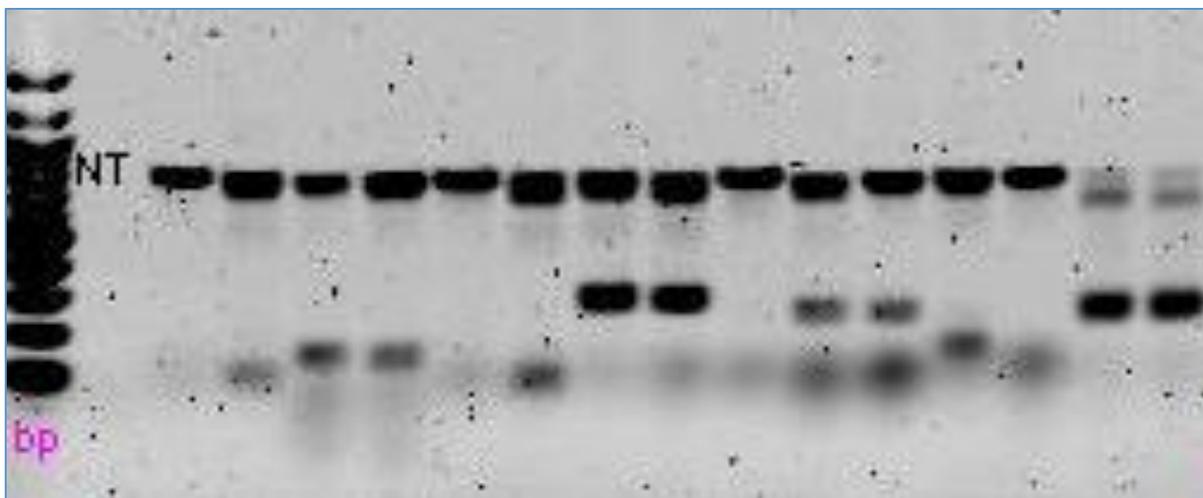
Abbildung 3: Bandenkonstellation der TNF- α Polymorphismen.

Abbildung 3 zeigt die möglichen Konstellationen für TNF- α . Entsteht keine Bande bei in der Promoter -308A Region, jedoch in der Promoter -308G Region bei 125bp handelt es sich um den SNP G/G, der mit einer niedrigen Expressionsrate assoziiert ist. Zeigen sich in beiden Regionen Banden handelt es sich um G/A, der für eine hohe Expressionsrate steht. Bleibt bei einer positiven Bande der Promoterregion -308A die Bande in der Region -308G aus, handelt es sich um den Polymorphismus A/A, der ebenfalls mit einer hohen Expressionsrate assoziiert wird. Die Auswertung von TNF- α wird analog bei den übrigen SNPs durchgeführt.

	bp	750	125	125
		Neg Ctrl	TNF- α Promotor -308 A	TNF- α Promotor -308 G
TNF- α	G/G (low)			
TNF- α	G/A (high)			
TNF- α	A/A (high)			

Abbildung 4: Bandenkonstellation TNF- α .

Die Abbildung zeigt ebenfalls die Möglichkeiten von TNF- α in Abhängigkeit von der Entstehung und dem Ausbleiben einer positiven Typisierungsbände. Bei 750bp steht ausserdem die Negativkontrolle.



B	NK	TNF	TNF	T	TNF	TNF	T	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-6	IL-6	IFN-	IFN-
P		- α	- α	N	- β 1	- β 1	N	10	10	10	10	10	-	174	γ	γ
		-308	-308	F	10C	25C	F	-	-	-	-	-	174	G	+87	+87
		A	G	-			-	108	108	108	81	819	C		4T	4A
				β 1			β 1	2A, -	2G,	2A, -	9T	C, -				
				10			25	819	-	819	, -	592				
				T			G	T	819	C	59	C				
									C		2A					

Abbildung 5: Auswertung von TNF- α .

Die Abbildung zeigt die Auswertung von TNF- α in der Gelelektrophorese. Die Region von TNF- α ist gelb gekennzeichnet.

Das Ergebnis des Patienten in der Abbildung 5 zeigt eine fehlende Bande an Position 308A bei 125 bp sowie eine Bande an Position 308G bei 125bp. Hierbei handelt es sich um den homozygoten G/G Genotyp, der mit einer niedrigen Expositionsrate einhergeht.

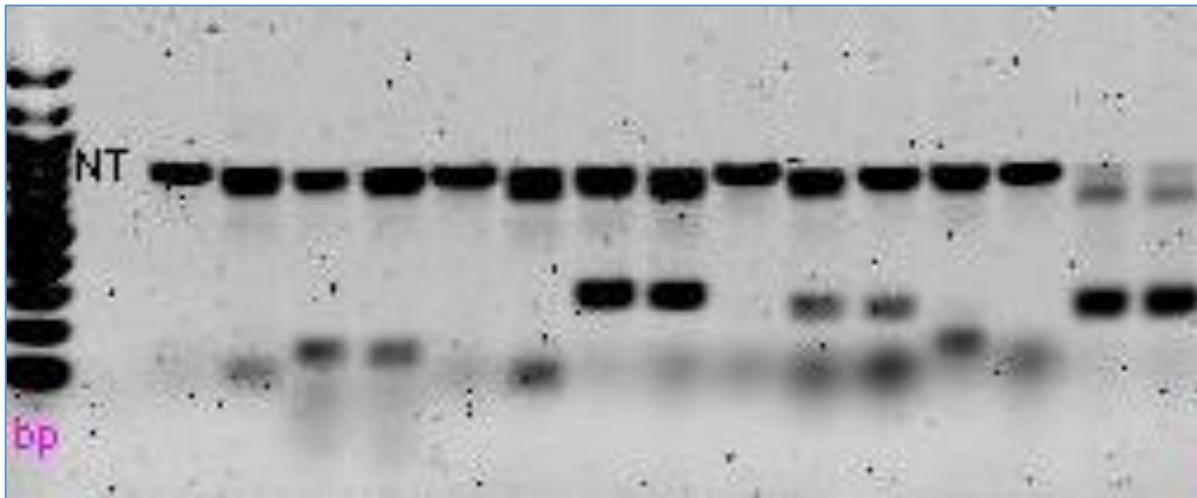
3.6.2 Auswertung des TGF- β 1-SNP

Analog zur Analyse des TNF- α -SNP wurde das Zytokin TGF- β 1 untersucht

	bp	750	175	175	125	125
		Neg Ctrl	TGF- β 1 codon 10T	TGF- β 1 codon 10C	TGF- β 1 codon 25C	TGF- β 1 codon 25G
TGF- β 1	T/T G/G (high)					
TGF- β 1	T/C G/G (high)					
TGF- β 1	T/C G/C (intermediate)					
TGF- β 1	C/C G/G (intermediate)					
TGF- β 1	T/T G/C (intermediate)					
TGF- β 1	C/C G/C (low)					
TGF- β 1	C/C C/C (low)					
TGF- β 1	T/T C/C (low)					
TGF- β 1	T/C C/C (low)					

Abbildung 6: Bandenkonstellation von TGF- β 1:

Diese Abbildung zeigt analog die Kombinationsmöglichkeiten von TGF- β 1 mit den jeweiligen Expressionsraten sowie die Negativkontrolle.



BP	NK	T	TNF	TNF	TNF	T	TNF	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-6	IL-6	IF	IFN-
		N	- α	- β 1	- β 1	N	- β 1	10	10	10	10	10	-	174	N-	γ
		F	-308	10T	10C	F	25G	-	-	-	-	-	174	G	γ	+87
		- α	G			-		108	108	10	819	819	C		+8	4A
		-				β 1		2A, -	2G,	82	T, -	C, -			74	
		30				25		819	-	A,	592	592			T	
		8				C		T	819	-	A	C				
		A							C	81						
										9C						

Abbildung 7: Auswertung von TGF- β 1

Die Abbildung zeigt die Auswertung von TNF- β 1 in der Gelelektrophorese. Die Region von TNF- β 1 ist gelb gekennzeichnet.

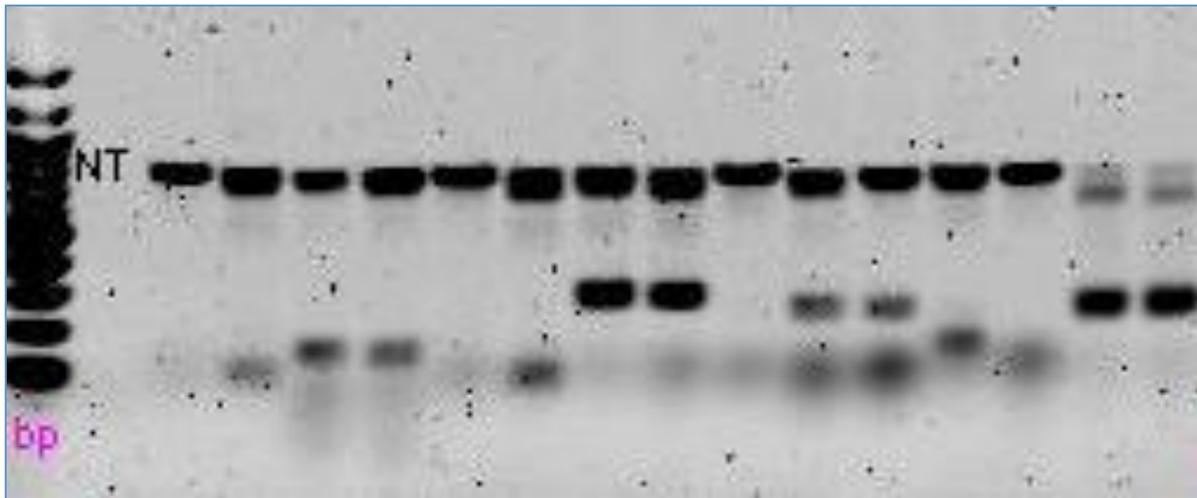
Das Beispiel in Abbildung 7 zeigt je eine Bande an den Positionen TNF- β 1 10T und 10C bei 175bp, sowie an der Position TNF- β 1 25G bei 125bp. An Position TNF- β 1 25C wurde im Agarosegel keine Bande bei 125bp dargestellt. Diese Konstellation resultiert in einem T/C G/G Genotypen, der mit einer hohen Zytokinexpression korreliert.

3.6.3 Auswertung des IL-10-SNP

	bp	750	300	300	300	250	250
		Neg Ctrl	IL-10 promoter -1082A, -819T	IL-10 promoter -1082G, -819C	IL-10 promoter -1082A, -819C	IL-10 promoter -819T, - 592A	IL-10 promoter -819C, - 592C
IL-10	GCC/GCC (high)						
IL-10	GCC/ACC (intermediate)						
IL-10	GCC/ATA (intermediate)						
IL-10	ACC/ACC (low)						
IL-10	ACC/ATA (low)						
IL-10	ATA/ATA (low)						

Abbildung 8: Bandenkonstellation von IL-10

Diese Abbildung zeigt analog die Kombinationsmöglichkeiten von IL-10 mit den jeweiligen Expressionsraten sowie die Negativkontrolle.



BP	N	TNF	TNF	TNF	TNF	T	TNF	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-6	IL-6	IF	IFN-
	K	- α	- α	- β 1	- β 1	N	- β 1	10	10	10	10	10	-	174	N-	γ
		-308	-308	10T	10C	F	25G	-	-	-	-	-	174	G	γ	+87
		A	G			-		108	10	108	819	819	C		+8	4A
						β 1		2A, -	82	2A, -	T, -	C, -			74	
						25		819	G,	819	592	592			T	
						C		T	-	C	A	C				
									81							
									9C							

Abbildung 9: Auswertung von IL-10.

Die Abbildung zeigt die Auswertung von IL-10 in der Gelelektrophorese. Die Region für IL-10 ist gelb gekennzeichnet.

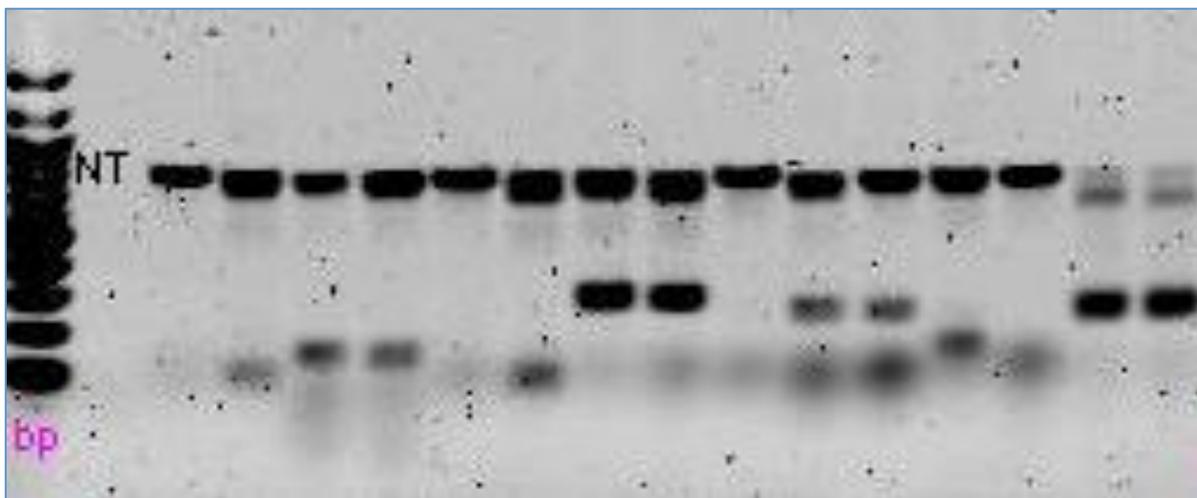
Das Patientenbeispiel weist im Agarosegel bei 300bp je eine Bande in der Promoterregion IL-10 -1082A, -819T und -1082G, -819C sowie -819T, -592A und 819C, -592C bei 250bp auf. Dabei handelt es sich um den intermediär exprimierten Zytokintypen GCC/ATA.

3.6.4 Auswertung des IL-6-SNP

	bp	750	175	175
		Neg Ctrl	IL-6 promoter - 174C	IL-6 promoter 174G
IL-6	G/G (high)			
IL-6	G/C (high)			
IL-6	C/C (low)			

Abbildung 10: Bandenkonstellation von IL-6.

Die Abbildung zeigt die Auswertung von IL-6 mit den jeweiligen Expressionsraten sowie die Negativkontrolle.



BP	N	TNF	TNF	TNF	TNF	TNF	T	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-	IL-6	IFN-	IFN-
	K	- α	- α	- β 1	- β 1	- β 1	N	10	10	10	10	10	6	174	γ	γ
		-308	-308	10T	10C	25C	F	-	-	-	-	-	-	G	+87	+87
		A	G				-	108	108	10	819	819	17	4C	4T	4A
							β 1	2A, -	2G, -	82	T, -	C, -				
							25	819	-	A,	592	592				
							G	T	819	-	A	C				
									C	81						
										9C						

Abbildung 11: Auswertung von IL-6.

Die Region für die Auswertung von IL-6 ist gelb gekennzeichnet.

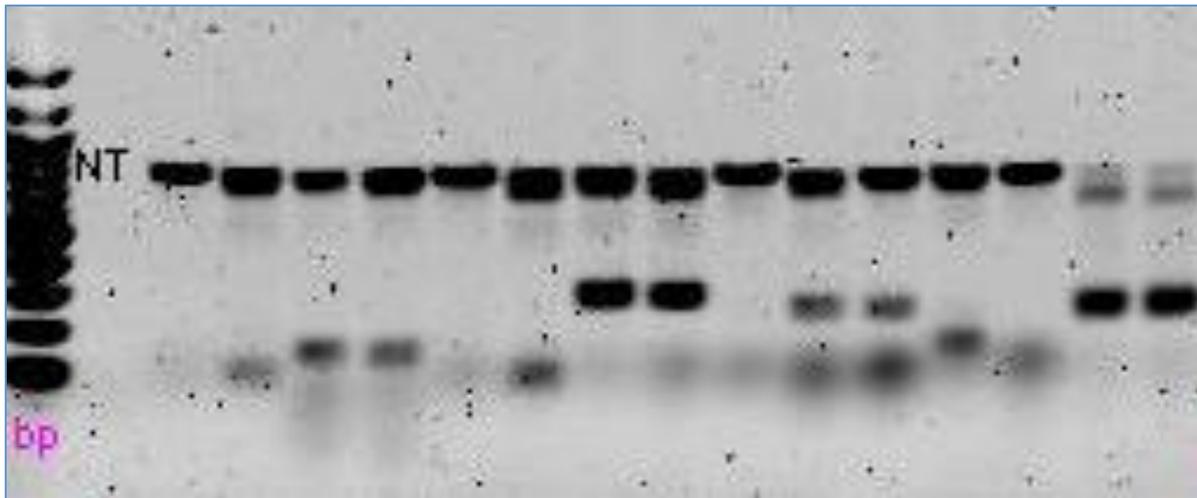
Die Markierung zeigt das Ergebnis der Elektrophorese des Zytokins IL-6, das durch Banden an den Positionen -174C und 174G charakterisiert ist. Im Agarosegel zeigt sich in der Region IL-6 174C und 174G bei 175bp je eine Bande. Somit ergibt sich bei dem Patienten der Genotyp G/C, der mit einer hohen Zytokinexpression assoziiert ist. An Position -174G wird deutlich, dass die Banden durchaus unterschiedlich deutlich ausgeprägt sein können.

3.6.6 Auswertung des IFN- γ -SNP

	bp	750	250	250
		Neg Ctrl	IFN- γ intron 1 +874T	IFN- γ intron 1 +874A
IFN- γ	T/T (high)			
IFN- γ	T/A (intermediate)			
IFN- γ	A/A (low)			

Abbildung 12: Bandenkonstellation von IFN- γ .

Die Abbildung zeigt die Möglichkeiten für die IFN- γ -Bandenkonstellationen sowie die Negativkontrolle.



BP	NK	TNF - α -308 A	T N F - α - 30 8 G	TNF - β 1 10T	TNF - β 1 10C	T N F - β 1 25 C	TNF - β 1 25G	IL- 10 - 108 2A, - 819 T	IL- 10 - 10 82 G, - 81 9C	IL- 10 - 108 2A, - 819 C	IL- 10 - 819 T, - 592 A	IL- 10 - 819 C, - 592 C	IL-6 - 174 C	IL- 6 17 4 G	IFN- γ +87 4T	IFN- γ +87 4A
----	----	--------------------------------	--	---------------------------	---------------------------	--	---------------------------	--	---	--	---	---	-----------------------	--------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Abbildung 13: Auswertung von IFN- γ .

In Abbildung 13 ist der Bereich für die Auswertung von IFN- γ gelb gekennzeichnet.

In der Abbildung wird durch die Gelelektrophorese für die Region des IFN- γ -Zytokins sowohl im Bereich +874T als auch im Bereich +874A eine Bande sichtbar. Zudem zeigt sich, dass in Gegenwart eines Zytokinallels das Produkt der internen Kontrolle schwächer ausgeprägt sein kann oder ganz fehlen kann. Aus der Bandenkonstellation im Beispiel ergibt sich der Genotyp T/A mit einer intermediären Expressionsrate.

4 Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Imme Haubitz (emeritierte Bioinformatikerin am Institut für Klinische Epidemiologie und Biometrie der Julius-Maximilians-Universität) durchgeführt.

Zur Analyse der Altersverteilung sowie für die Korrelation zwischen Diagnose und Latenzzeit wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewendet.

Die Konditionierung wurde mit dem Chi-Quadrat-Test und der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis analysiert. Diese wurde auch zur Analyse der Altersdiskrepanz zwischen Patient und Spender sowie der Verwandtschaft und der Zytokindiskrepanz angewendet.

Die Diagnose und Verwandtschaft zum Spender sowie die Übereinstimmung der HLA-Merkmale und die daraus resultierende GVHD wurde nach dem exaktem Test nach Metha und Patel berechnet.

Zur Analyse des Einflusses des Geschlechts, des Sex Mismatches oder der Prophylaxe auf die Entstehung einer GvHD kam ebenfalls der Chi-Quadrat-Test zum Einsatz.

Die Korrelationen der klinischen Parameter wie Alter und Verwandtschaft der Spender mit der Entstehung einer GvHD wurden mit dem Log-Rank-Test analysiert.

Für den Zusammenhang bestimmter Zytokinpolymorphismen mit der Entstehung einer akuten oder chronischen GvHD sowie mit der Anzahl an von einer GvHD betroffenen Lokalisationen wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewendet. Ausserdem kamen der Chi-Quadrat-Test sowie die Rangvarianzanalyse nach Kuskal und Wallis zum Einsatz.

Die Überlebensraten der Patienten werden nach Kaplan und Meier geschätzt und die Rezidivfreiheitsrate aller Patienten wird im Log-Rank-Test analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 Patientencharakteristika

5.1.1 Patientencharakteristika allgemein

5.1.1.1 Empfänger

Die folgenden Ergebnisse wurden im Rahmen der Behandlung von 72 pädiatrischen Patienten im Alter von 0 bis 26 Jahren erfasst, die im Zeitraum vom 11.10.2004 bis zum 17.08.2014 an der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg eine allogene Stammzelltransplantation erhielten.

Die Studie beschreibt 41 männliche und 31 weibliche Patienten im Alter von 0,49 bis 26 vollendeten Lebensjahren. Das mittlere Alter betrug $9,89 \pm 6,42$ Jahre (mit einem 68%-CI von 2,85 bis 16,16 Jahren).

Einen Altersunterschied zwischen den Geschlechtern gab es nicht.

Die mittlere Zeitspanne zwischen Ernst diagnose und Stammzelltransplantation lag zwischen acht und neun Monaten (68%-CI = 0.34 bis 4.09 Jahre).

Alle Kinder erhielten eine allogene Stammzelltransplantation und wurden auf ihre Zytokinpolymorphismen untersucht.

39 Patienten waren an Leukämie erkrankt, 4 hatten Lymphome, 5 solide Tumore, 1 Kind einen Hirntumor und 23 wurden aufgrund einer hämatologischen (wie zum Beispiel dem myelodysplastischen Syndrom (MDS)) oder einer anderen nicht malignen Erkrankung transplantiert. Zu diesen Erkrankungen zählen neben dem MDS, welches in neun Fällen diagnostiziert wurde, die Lagerhans-Zell-Histiozytose (LCH), die Granulomatose, die Autoimmunentropathie, Immundefekte, die kongenitale dyserythropoetische Anämie (CDA) und die Fanconie-Anämie. Ausserdem traten die schwere aplastische Anämie (SAA), die Diamond-Blackfan-Anämie (DBA), das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) und die Glanzmann-Thrombasthenie auf. Diese Diagnosen werden im Folgenden in der Kategorie „sonstige“ zusammengefasst.

Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt vor der Transplantation in verschiedenen Stadien der Erkrankung. 36 Kinder befanden sich in Vollremission (complete remission), 12 in partieller Remission (partial remission), 10 zeigten eine stabile Erkrankung (stable disease) und 14 eine Progression der Erkrankung (progressive disease).

64 Kinder erhielten ihre erste allogene Stammzelltransplantation, 7 wurden zum zweiten Mal transplantiert und bei einem Kind wurde bereits die dritte Stammzelltransplantation durchgeführt.

Zwischen den Geschlechtern und verschiedenen Altersgruppen zeigte sich kein Unterschied im Auftreten der einzelnen Diagnosen. Ebenso erwies sich die Zeit zwischen Erstdiagnose und Stammzelltransplantation im Vergleich zwischen den Geschlechtern als unauffällig.

Die Konditionierung der Patienten erfolgte nach den aktuellen Richtlinien und Protokollen (s.u). Von den 64 Patienten mit erster SZT wurden 30 (47%) bestrahlt, von denen mit einer früheren SZT keiner.

5.1.1.2 Spender

Für die Stammzelltransplantationen konnten 55 HLA-identische Spender gefunden werden. Bei HLA-identischen Spendern stimmten 10 von 10 HLA-Merkmalen überein. 10 Spender erwiesen sich als haploidentisch mit ihrem Empfänger. Hier handelte es sich um die Väter (n=4) und Mütter (n=6) der Empfänger.

Bei 7 Kindern konnte nur ein mismatch, also ein HLA-nicht übereinstimmender Spender gefunden werden. Hier stimmten 8 oder 9 von 10 HLA-Merkmalen überein.

Bei 22 Spendern handelte es sich um die Geschwister der erkrankten Kinder und 40 Spender zeigten keine Verwandtschaft mit ihrem Empfänger.

77,78% (n=56) Spender waren bereits über 18 Jahre alt, 11 im Alter von 10-18 Jahren, 3 zwischen 5 und 10 Jahren und nur zwei Spender unter 5 Jahren alt.

Von 40 männlichen und 32 weiblichen Spendern wurden insgesamt 41 an einen gleichgeschlechtlichen Patienten oder Patientin transplantiert.

Die Stammzellen wurden überwiegend peripher gewonnen, (n=55; 76,39%), die übrigen Stammzellen stammten aus dem Knochenmark.

Bei den Spendern zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Geschlechter der Spender sowie bezüglich des sex mismatch bei Mädchen und Jungen.

	Patienten allgemein	Leukämie	Lymphom	sonstige	Solider Tumor	Hirntumor
Patientencharakteristika allgemein						
Anzahl	72	39	4	23	5	1
Geschlecht (m/f)	41/31	23/16	1/3	15/8	1/4	1/0
Alter	9,89±6,42					
Status vor allogener Stammzelltransplantation						
CR	36	27	3	3	2	1
PR	12	8	1	0	3	0
SD	10	1	0	9	0	0
PD	14	3	0	11	0	0
Spender						
Geschwister	22	9	0	9	3	1
Mutter	6	2	0	2	2	0
Vater	4	4	0	0	0	0
Nicht verwandt	40	23	4	13	0	0
Ort der Stammzellgewinnung						
PB/KM	55/17	29/10	4/0	18/5	3/2	1/0
Graftmanipulation						
keine	49	28	2	16	2	1
CD34+	6	3	0	1	2	0
CD3/CD19-Depletion	11	5	2	4	0	0
T-Zell-Rab/CD19- Depletion	3	2	0	0	1	0
partielle T-Zell-Depletion	3	1	0	2	0	0

Tabelle 9: Patientencharakteristika allgemein.

	Patienten allgemein	Leukämie	Lymphom	sonstige	Solider Tumor	Hirntumor
HLA-Match						
Ident/haplo/mismatch	55/10/7	27/7/5	3/0/1	20/2/1	4/1/0	1/0/0
Sexmismatch						
nein/ja	41/31	18/21	2/2	15/8	5/0	1/0
Frühere Stammzelltransplantation						
nein/1/2	64/7/1	35/4/0	4/0/0	21/1/1	4/1/0	0/1/0
Konditionierung						
Flu/Bu/Mel/+	21	7	1	11	1	1
Flu/Busulf	1	0	0	1	0	0
Mel/Cyc/Bu	22	7	2	11	2	0
Mel/Eto	20	18	0	0	2	0
Flu/Treos	1	1	0	0	0	0
Platin/Eto	0	0	0	0	0	0
Thiot./Mel	4	4	0	0	0	0
andere	3	1	1	1	0	0
Bestrahlung						
ja/nein	30/42	25/13	2/2	3/21	0/5	0/1

Fortsetzung Tabelle 9: Patientencharakteristika allgemein: Die Grafik beschreibt die allgemeinen Patientencharakteristika.

Die Unterteilung horizontal erfolgt nach Patienten allgemein=alle Patienten; Patienten mit der Diagnose Leukämie; Patienten mit der Diagnose Lymphom; „sonstige“=Patienten mit den Diagnosen Langerhans-Zell-Histiozytose, Granulomatose, Autoimmumentropathie, Myelodysplastisches Syndrom, WAS, Immundefekt, Kongenitale dyserythropoetische Anämie, Fanconie-Anämie, schwere aplastische Anämie, Diamond-Black-Anämie und Glanzmann-Thrombasthenie; Patienten mit soliden Tumor; Patienten mit Hirntumor. Die vertikale Unterteilung erfolgt nach allgemeinen Patientencharakteristika wie gesamte Anzahl, Geschlecht und Alter; Status vor Stammzelltransplantation: CR=Complete Remission, PR=Partial Remission, SD= Stable Disease, PD= Progressive Disease; Verwandtschaft der Spender mit ihrem Empfänger: Geschwisterkinder, Elternteil (Mutter oder Vater) und möglichst passende Fremdspender; Ort der Stammzellgewinnung: PB=Peripheres Blut, KM=Knochenmark; Graftmanipulation: keine Manipulation, CD34+, CD3/CD19-Depletion, T-Zell_Rab/CD19-Depletion, partielle T-zell-Depletion; die Übereinstimmung der HLA-Merkmale (HLA-Match): indent= identische HLA-Merkmale, haplo= Eltern sind Spender, mismatch= 8 oder 9 von 10 Übereinstimmungen der HLA-Merkmale; früher stattgefundenen Stammzelltransplantationen (0/1/2); Konditionierung mit Flu/Bu/Mel/+, Fli/Bulsuf, Mel/Cyc/Bu, Mel/Eto, Flu/Treos, Platin/Eto, Thiot./Mel; stattgefundenen Bestrahlung (ja/nein).

5.1.2 GvHD und Patientencharakteristika

Bei 71% der Patienten trat eine GvHD auf.

Insgesamt 51 Patienten entwickelten eine GvHD, davon erlitten 14 Kinder eine chronische und 37 eine akute GvHD. 10 Kinder waren von beidem betroffen.

Die akute GvHD äußerte sich in 26 Fällen in der mildesten Ausprägung (Grad 1), in 17 Fällen trat ein Grad 2 auf und 4 Kinder erlitten eine akute GvHD im 3. Grad.

Von den 14 Kinder, die von einer chronischen GvHD betroffen waren, zeigten vier eine lokalisierte Form, fünf eine limitierte und insgesamt fünf eine extensive cGvHD.

	Patienten allgemein	Leukämie	Lymphom	sonstige	Solide Tumore	Hirntumor
Akute GvHD						
ja/nein	47/25	27/12	1/3	17/6	1/4	1/0
Grad der aGvHD						
0	25	12	3	6	4	0
1	26	13	1	10	1	1
2	17	12	0	5	0	0
3	4	2	0	2	0	0
4	0	0	0	0	0	0
Chronische GvHD						
ja/nein	14/58	9/30	1/3	3/20	0/5	1/0
Grad der cGvHD						
1-lokal	4	1	0	2	0	1
2-limitiert	5	4	0	1	0	0
3-extensiv	5	4	1	0	0	0

Tabelle 10: Entstehung einer GvHD.

Die Tabelle zeigt die Entstehung der akuten und chronischen GvHD im Bezug zur jeweiligen Diagnose. Horizontal werden zunächst alle Patienten allgemein beschrieben und anschließend nach den jeweiligen Diagnosen unterteilt.

In der Vertikalen wird die Entstehung der akuten und chronischen GvHD beschrieben. Die Einteilung der akuten GvHD erfolgt nach definierten Graden 0-4, die Einteilung der chronischen GvHD erfolgt nach den Graden lokal=1 Organ betroffen, limitiert= 2 Organe betroffen, extensiv=3 oder mehr Organe betroffen

35 Kinder zeigten Symptome einer GvHD an einer Lokalisation des Körpers, 10 an zwei Lokalisationen, zwei an drei Lokalisationen und vier an vier Lokalisationen. Am Häufigsten (66,67%) war die Haut betroffen, gefolgt von der Leber (13,89%). Lunge, Darm, ZNS, Gefäße, Gelenke und Augen waren insgesamt zu 26,4% betroffen.

Die Beobachtungszeit bis zur Entstehung einer chronischen GvHD oder bis zur letzten Kontrolle (last seen) ohne Auftreten einer GvHD aller 72 Patienten lag zwischen 2,46 und 20,74 Jahren. Der durchschnittliche cGvHD-Beginn lag bei 0,333 +/- 0,074 Jahren und der Mittelwert lag bei 0,328 Jahren.

		Anzahl insgesamt	Fälle mit aGvHD
GvHD-Prophylaxe einmalig	MTX	22	16
	ATG	16	8
	OKT3/Campath//	8	3
	ATG+MTX	26	20
GvHD-Prophylaxe	CSA	62	
	MMF	9	
	others	1	

Tabelle 11: Durchführung der GvHD Prophylaxe.

In den horizontalen Spalten werden je die behandelten Fälle insgesamt sowie die Fälle mit einer entstandenen akuten GvHD dargestellt.

In der Vertikalen wird in den Zeilen nach der jeweiligen GvHD-Prophylaxe (einmalig o. generell) unterschieden.

Bei einer Prophylaxe mit MTX oder MTX und ATG trat zu 75% eine akute GvHD auf, bei der Verwendung von ATG oder OKT/Campath als einmalige GvHD-Prophylaxe kam es bei 45,83% zu einer akuten GvHD ($p=0,015$).

Bei den Kindern im Alter unter einem Jahr trat keine GvHD auf, bei den älteren jedoch zu 74% (51/69). Zudem trat bei den männlichen Kindern häufiger eine aGvHD Grad 2 oder 3 auf.

Vor Beginn der SZT wurden von 72 Patienten 30 bestrahlt. Ein Drittel der bestrahlten Patienten litt anschließend unter einer chronischen GvHD. Fast zwei Drittel (63,33%) der bestrahlten Kinder waren von einer akuten GvHD betroffen. Bei den unbestrahlten Kindern (42) blieben über 90% ohne eine chronische GvHD (p=0,012), über 70% litten jedoch unter einer akuten GvHD. Zudem trug ein Geschlechts-Mismatch zur Entstehung einer chronischen GvHD bei (p=0,017).

		HLA						p
		ident		haplo		mismatch		
		(n = 55)		(n = 10)		(n = 7)		
		n	%	n	%	n	%	
n Lokalisation	keine	15	27.27%	5	50.00%	1	14.29%	0.045*mp
	1	30	54.55%	2	20.00%	3	42.86%	
	2	8	14.55%	1	10.00%	1	14.29%	
	3	1	1.82%	0	0.00%	1	14.29%	
	4	1	1.82%	2	20.00%	1	14.29%	
Lokalisation Lunge	ja	0	0.00%	2	20.00%	2	28.57%	0.0023 **mp
	nein	55	100.00%	8	80.00%	5	71.43%	
Lokalisation ZNS	ja	0	0.00%	0	0.00%	3	42.86%	0.00059 ***mp
	nein	55	100.00%	10	100.00%	4	57.14%	
einm.Prophylaxe	MTX	21	38.18%	1	10.00%	0	0.00%	0.000036***mp
	ATG	14	25.45%	0	0.00%	2	28.57%	
	OKT3/Campath	2	3.64%	6	60.00%	0	0.00%	
	ATG+MTX	18	32.73%	3	30.00%	5	71.43%	
Prophylaxe	CSA	51	92.73%	4	40.00%	7	100.00%	0.00037 ***mp
	MMF	3	5.45%	6	60.00%	0	0.00%	
	others	1	1.82%	0	0.00%	0	0.00%	

Tabelle 12: HLA und die Lokalisation der GvHD sowie Prophylaxe.

Die Tabelle zeigt in der Horizontalen die Übereinstimmung der HLA-Merkmale (identisch/haploidentisch= Eltern sind Spender/ mismatch= 8 oder 9/10 Übereinstimmungen).

In Abhängigkeit dazu werden zunächst die von einer GvHD betroffenen Lokalisationen sowie ZNS- und Lungenbefall dargestellt.

Anschließend wird die einmalige Prophylaxe und die Prophylaxe im Bezug auf die Übereinstimmung der HLA-Merkmale aufgezeigt.

Es wurde stets versucht, Spender zu finden, die in möglichst vielen Humanen-Leukozyten-Antigenen (HLAs) mit ihrem Empfänger übereinstimmen. Es zeigt sich bei HLA-identischen Spendern die höchste Anzahl an Kindern, die an keiner oder nur einer Lokalisation betroffen waren. Haploidentische Transplantationen waren hinsichtlich der GvHD-Freiheit oder dem Befall von nur einer Lokalisation die zweitbeste Option. Am schlechtesten schnitten die SZT mit einem mismatch ab. Hier kam es am häufigsten zum Befall einer Lokalisation.

Die Prophylaxe bei HLA-identischen Spender und Empfänger wurde einmalig hauptsächlich (38,18%) mit MTX oder der Kombination MTX mit ATG (32,73%) durchgeführt. Anschließend wurde überwiegend eine CSA(92,73%)-Prophylaxe durchgeführt.

Bei der HLA-haploidentischen SZT wurde die Prophylaxe zu 60% mit OKT3/Campath (einmalig) und MMF durchgeführt.

71,43% der HLA-mismatch-SZT erhielten eine einmalige Prophylaxe mit ATG und MTX, die übrigen Patienten wurden nur mit ATG einmalig prophylaktisch vorbehandelt.

Die generelle Prophylaxe wurde immer mit CSA durchgeführt.

5.1.3 Rezidiv

Von insgesamt 72 transplantierten Patienten blieben im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren insgesamt 67 im ersten Jahr und 54 weitere 4 Jahre ohne ein Rezidiv.

Von den 39 Kindern, die an Leukämie erkrankt waren blieben 36 im ersten Jahr und 28 bis 5 Jahre nach der Behandlung rezidivfrei.

Kinder, die innerhalb der ersten 9 Monate nach Erstdiagnose transplantiert wurden, hatten eine bessere Prognose als Kinder mit einer längeren Latenz ($p=0,024$).

Ebenso zeigten Kinder, die bereits die zweite Stammzelltransplantation durchliefen eine schlechtere Prognose und erlitten häufiger ein Rezidiv ($p=0,058$).

In den Fällen, die eine Graftmanipulation erforderten kam es häufiger zu Rezidiven. 65% der Kinder blieben ohne ein Rezidiv, wohingegen der Prozentsatz ohne Graftmanipulation bei 89% lag ($p=0,0035$). Insgesamt wurde bei 68% der Kinder keine Graftmanipulation durchgeführt. Von den insgesamt 23 Kindern, die eine Graftmanipulation erhielten waren 11 an Leukämie erkrankt, zwei Kinder hatten ein Lymphom, drei einen soliden Tumor und sieben können der Kategorie „sonstige“ zugeordnet werden. Diese erhielten lediglich die Stammzellen ihrer Spender nach vorangegangener Graftmanipulation.

Dabei befanden sich 12 Kinder in „Complete Remission“ und 4 in „Partial Remission“.

6 Kinder, die graftmanipuliert wurden, befanden sich im Ausgangsstatus der „Progressive Disease“ und lediglich eines in „Stable Disease“. Welche Graftmanipulation durchgeführt wurde zeigt Tabelle 17.

Ausgangstatus	Anzahl (gesamt 23)	CD 34	CD3/CD19- Depletion	T-Zell- Rab/CD19- Depletion	Part. T-Zell- Depletion
CR	12	2	6	3	1
PR	4	3	1	0	0
SD	1	0	0	0	0
PD	6	1	3	0	2

Tabelle 13: Graftmanipulation und Ausgangsstatus.

Die Tabelle zeigt die unterschiedlichen Möglichkeiten der Graftmanipulation in Abhängigkeit vom Ausgangsstatus (CR=Complete Remission, PR=Partial Remission, SD=Stable Disease, PD=Progressive Disease)

HLA-identische Stammzelltransplantate zeigten verglichen mit Mismatch-Transplantaten (MM, haplo) eine deutlich bessere Prognose.

Abbildung 14 zeigt die Rezidivfreiheitsrate. Haploidentische Transplantate von Eltern zeigten hier die schlechteste Rezidivfreiheit.

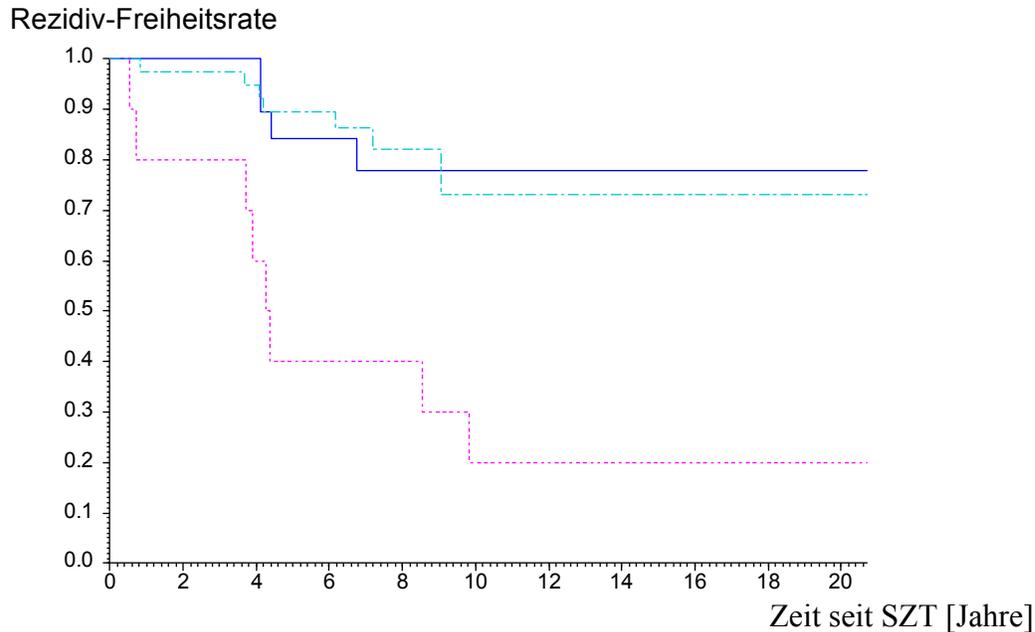


Abbildung 14: Rezidiv-Freiheitsrate nach SZT.

Prozentsatz der zum jeweiligen Zeitpunkt, der auf der x-Achse abzulesen ist, noch ohne Rezidiv lebenden Patienten, differenziert nach Verwandtschaft des Spenders mit dem Patienten.. — = Geschwister (1), - - - = Eltern (2), . - . - . = nicht verwandt (3). Paarweiser Gruppenvergleich: log-rank-Test

Gruppe 1 mit 2 ergibt $p = 0.0018^{**}$

Gruppe 1 mit 3 ergibt $p = 0.97$

Gruppe 2 mit 3 ergibt $p = 0.00070^{***}$

Auf längere Sicht zeigten die Kinder, die eine Stammzelltransplantation von einem Geschwisterkind erhielten, die höchste Rezidivfreiheitsrate, gefolgt von den Kindern mit einem Fremdspender. Kinder, die mit einem Transplantat eines Elternteils behandelt wurden zeigten ein vergleichsweise signifikant deutlich schlechteres Outcome. Auf haploidentische Transplantate wird in verzweifelten Fällen zurückgegriffen, wenn kein identischer Spender gefunden werden kann, eine Stammzelltransplantation jedoch indiziert ist.

Haploidentische Transplantate zeigten daher auch die schlechteste Rezidivfreiheitsrate, die HLA-identischen Transplantate schnitten am besten ab. Über 92% mit HLA-identischem Spender blieben in den 5 Jahren Beobachtungszeitraum ohne ein Rezidiv, bei den haploidentisch transplantierten Kindern waren es nur 30% ($p=0,000006$).

5.2 Überleben

Die Überlebensrate (in Abbildung 4 dargestellt) aller 72 Patienten betrug nach 5 Jahren 89,3%.

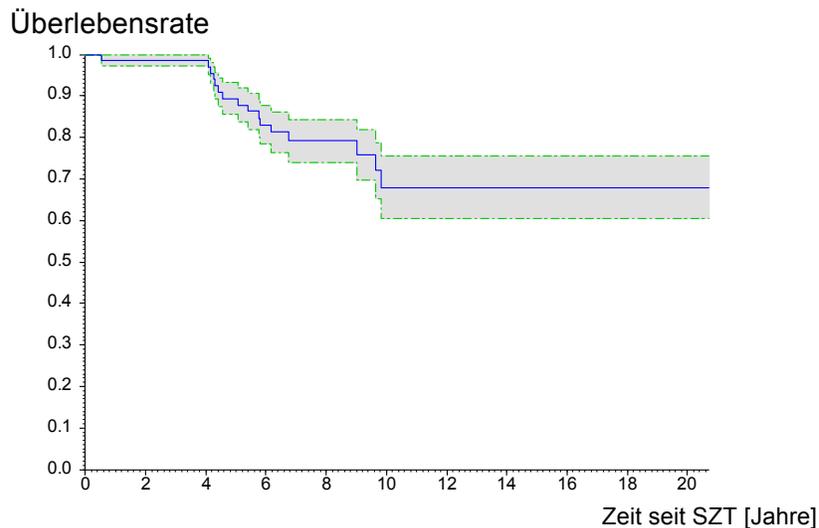


Abbildung 15: Überleben nach allogener Stammzell-Transplantation (SZT).

Prozentsatz der, zum jeweiligen Zeitpunkt, der auf der x-Achse abzulesen ist, noch lebenden Patienten. Die mittlere Linie ist die Freiheitsrate, die beiden äußeren Linien begrenzen den 95%-Vertrauensbereich der Überlebensrate nach oben und unten.

Kinder, die ihre erste Stammzelltransplantation erhielten zeigten eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,032$).

Handelte es sich hierbei um einen HLA-identischen Spender ergab sich, wie Abbildung 18 zeigt, neben der höheren Rezidivfreiheitsrate auch eine bessere Überlebensrate.

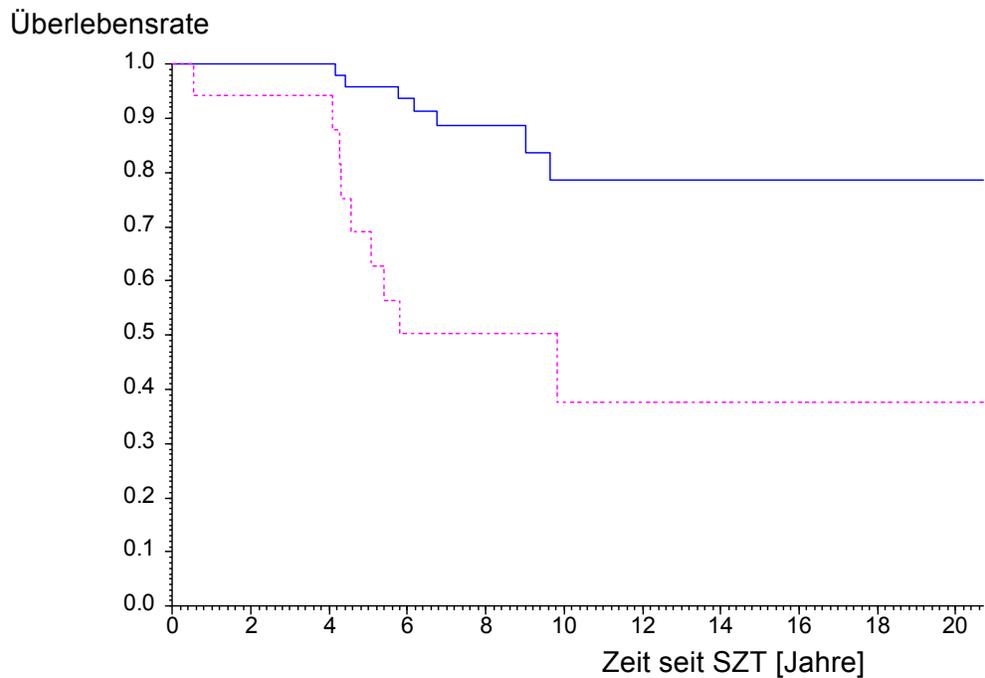


Abbildung 16: Überlebensrate nach SZT.

Prozentsatz der zum jeweiligen Zeitpunkt, der auf der x-Achse abzulesen ist, noch lebenden Patienten, differenziert nach HLA ident. — = ja, - - - = nein.

Analog zur Entstehung von Rezidiven zeigte sich die schlechteste Überlebensrate wenn Eltern als Spender fungierten. In diesen meist verzweifelten Fällen, werden auch haploide Spender in Erwägung gezogen.

5.3 Zytokinpolymorphismen

5.3.1. Zytokinpolymorphismen allgemein

Die Empfänger und Spender wurden bezüglich ihrer Genpolymorphismen der Zytokine TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6 sowie IFN- γ untersucht.

In der Tabelle 14 wird die allgemeine Verteilung der Zytokinpolymorphismen der Patienten und Spender dargestellt, die sich durch das Erscheinen oder Ausbleiben von Banden an den Positionen der verschiedenen Codons ergibt.

Für einzelne Zytokine (TGF- β , IL-10) gibt es verschiedene Polymorphismen, die jeweils zunächst in ihre Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Codons aufgeteilt werden.

Aus den Kombinationsmöglichkeiten von TGF- β (1) und (2) wird TGF- β gebildet. Für TGF- β (1) gibt es die Kombinationsmöglichkeiten T/T, T/C und C/C. Für TGF- β (2) ergeben sich die Möglichkeiten G/G, G/C und C/C. Demnach können sich für TGF- β folgende Kombinationen ergeben(Tabelle 13):

TGF- β 1	T/T	T/C	C/C
TGF- β 2			
G/G	T/T G/G	T/C G/G	C/C G/G
G/C	T/T G/C	T/C G/C	C/C G/C
C/C	T/T C/C	T/C C/C	C/C C/C

Tabelle 14: Bildung der Möglichkeiten der Zytokinpolymorphismen für TGF- β .

In der ersten Zeile werden die Möglichkeiten für TGF- β 1, in der Vertikalen für TGF- β 2 aufgelistet. Kombiniert ergeben die beiden Spalten die verschiedenen Möglichkeiten der Zytokinpolymorphismen für TGF- β

Selbiges gilt für IL-10 mit den Kombinationsmöglichkeiten IL-10 (1), (2) und (3).

Für IL-10 (1) ergeben sich die Möglichkeiten A/A, A/G und G/G, für IL-10 (2) C/C, C/T und T/T sowie für IL-10 (3) C/C, C/A und A/A.

Kombiniert ergibt sich also beispielsweise für einen Patienten mit IL-10 (1)= A/A, IL-10 (2)= C/C und IL-10 (3)= C/C der Zytokinpolymorphismus ACC/ACC.

Folgende Kombinationen können sich für IL-10 ergeben:

ACC/ACC

ACC/ATA

ATA/ATA
 GCC/ACC
 GCC/ATA
 GCC/GCC

IL-10(2) und IL-10(3) waren zu 100% verbunden. Wurde bei IL-10(2) C/C analysiert, zeigte sich C/C als IL-10(3). Ebenso trat bei dem Ergebnis IL-10(2)=C/T immer C/A als IL-10(3) auf sowie bei IL-10(2)= T/T immer IL-10(3)=A/A.

Daher stimmen die Ergebnisse für IL-10 (2) und (3) im Folgenden überein, werden aber dennoch separat aufgeführt.

Das generelle Vorkommen und die Verteilung der Zytokinpolymorphismen von Spendern und Empfängern werden in Tabelle 15 auf der folgenden Seite dargestellt.

		n	%	n	%
		Patient		Spender	
TNF α	G/G	14	28.57	20	28.17
	G/A	19	38.78	28	39.44
	A/A	16	32.65	23	32.39
	<i>fehlende Angabe</i>	23	–	1	–
TGF β (1)	T/T	21	43.75	21	30.43
	T/C	22	45.83	37	53.62
	C/C	5	10.42	11	15.94
	<i>fehlende Angabe</i>	24	–	3	–
TGF β (2)	G/G	28	58.33	25	36.23
	G/C	15	31.25	41	59.42
	C/C	5	10.42	3	4.35
	<i>fehlende Angabe</i>	24	–	3	–

Tabelle 15: Verteilung der Zytokinpolymorphismen allgemein.

		n	%	n	%
		Patient		Spender	
TGF β	T/T G/G	11	22.92	11	15.94
	T/T G/C	6	12.50	10	14.49
	T/T C/C	4	8.33	0	
	T/C G/G	15	31.25	12	17.39
	T/C G/C	7	14.58	24	34.78
	T/C C/C	0		1	1.45
	C/C G/G	2	4.17	2	2.90
	C/C G/C	2	4.17	7	10.14
	C/C C/C	1	2.08	2	2.90
	<i>fehlende Angabe</i>	24	–	3	–
IL10 (1)	A/A	17	36.17	20	29.85
	A/G	22	46.81	32	47.76
	G/G	8	17.02	15	22.39
	<i>fehlende Angabe</i>	25	–	5	–
IL10 (2)	C/C	23	48.94	29	43.28
	C/T	15	31.91	25	37.31
	T/T	9	19.15	13	19.40
	<i>fehlende Angabe</i>	25	–	5	–
IL10 (3)	C/C	23	48.94	29	43.28
	C/A	15	31.91	25	37.31
	A/A	9	19.15	13	19.40
	<i>fehlende Angabe</i>	25	–	5	–
IL10	ACC/ACC	2	4.26	1	1.49
	ACC/ATA	6	12.77	6	8.96
	ATA/ATA	9	19.15	13	19.40
	GCC/ACC	13	27.66	13	19.40
	GCC/ATA	9	19.15	19	28.36
	GCC/GCC	8	17.02	15	22.39
	<i>fehlende Angabe</i>	25	–	5	–

Fortsetzung Tabelle 15: Verteilung der Zytokinpolymorphismen allgemein

		n	%	n	%
		Patient		Spender	
IL6	G/G	7	14.58	3	4.48
	G/C	19	39.58	40	59.70
	C/C	22	45.83	24	35.82
	<i>fehlende Angabe</i>	24	–	5	–
IFN γ	T/T	6	12.24	10	14.29
	T/A	21	42.86	33	47.14
	A/A	22	44.90	27	38.57
	<i>fehlende Angabe</i>	23	–	2	–

Fortsetzung Tabelle 15: Verteilung der Zytokinpolymorphismen allgemein.

Die Tabelle beschreibt die Zytokinpolymorphismen der Spender und Empfänger. Die Zytokine TGF- β und IL-10 werden zunächst in den einzelnen Kombinationsmöglichkeiten (1),(2) und ggf. (3) und anschließend für das jeweilige Zytokin gesamt dargestellt (n=72). Fehlende Angaben ergaben sich durch das Fehlen einzelner Proben zum Analyse-Zeitraum oder das Ausbleiben einer aussagekräftigen Bandenkonstellation und somit Interpretation der Proben.

5.3.2 Unterschiede der Zytokinpolymorphismen zwischen Empfänger und Patient

Aufgrund der unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten (Codons) der einzelnen Zytokinpolymorphismen können zwischen Spender und Empfänger Unterschiede eben dieser Kombinationen auftreten.

Bekommt beispielsweise ein Patient mit der TNF- α -Kombination G/G ein Transplantat von einem Spender mit der Kombination A/A, ergeben sich zwei Unterschiede. Bekommt derselbe Patient ein Transplantat eines Spenders mit der Kombination A/G, gibt es nur einen Unterschied. Hat der Spender ebenfalls die Kombination G/G stimmen Spender und Empfänger in ihren Zytokinpolymorphismen überein.

Bis zu zwei Unterschiede zwischen Spender und Empfänger können für TNF- α und TGF- β (1) und (2) auftreten.

Für TNF- α stimmten zu 47,92% die Zytokinpolymorphismen überein.

Eine 54,35%ige Übereinstimmung zeigte sich für TGF- β (1) und TGF- β (2) stimmte zu 39,13% zwischen Spender und Empfänger überein.

Demnach können sich für TGF- β insgesamt 4 Unterschiede zeigen. Hier gab es zu 28,26% Übereinstimmungen.

Insgesamt 6 Unterschiede können für IL-10 auftreten. Einzeln betrachtet gab es für IL-10(1) zu 48,89% keine Unterschiede. Da IL-10 (2) und (3) zu 100% zusammenhängen, zeigten sich für beide Zytokine zu 64,44% Übereinstimmung zwischen Empfänger und Spender. IL-10 stimmte zu 40% zwischen Spender und Empfänger überein.

Die beiden übrigen Zytokine IL-6 und IFN- γ können ebenfalls bis zu zwei Unterschiede aufweisen. Bei IL-6 gab es zu 50% Übereinstimmung der Zytokinpolymorphismen.

IFN- γ stimmt zu 56,25% überein.

In Tabelle 16 werden die Unterschiede der Zytokinpolymorphismen zwischen Patient und Spender dargestellt. Diese stimmen, aufgrund des Bestrebens einen passenden Spender zu finden, in der Mehrzahl überein oder weisen nur wenige Unterschiede auf.

Die maximale Anzahl an möglichen Unterschieden der Zytokinpolymorphismen erreichte nur in einem Fall über 10%.

Zahl Unterschiede bei		n	%
TNF- α	0	23	47.92
	1	21	43.75
	2	4	8.33
TGF- β (1)	0	25	54.35
	1	17	36.96
	2	4	8.70
TGF- β (2)	0	18	39.13
	1	24	52.17
	2	4	8.70
TGF- β	0	13	28.26
	1	14	30.43
	2	15	32.61
	3	3	6.52
	4	1	2.17
IL-10 (1)	0	22	48.89
	1	21	46.67
	2	2	4.44
IL-10 (2)	0	29	64.44
	1	13	28.89
	2	3	6.67
IL-10 (3)	0	29	64.44
	1	13	28.89
	2	3	6.67
IL-10	0	18	40.00
	1	11	24.44
	2	4	8.89
	3	9	20.00
	5	1	2.22
	6	2	4.44
IL-6	0	22	50.00
	1	19	43.18
	2	3	6.82
IFN- γ	0	27	56.25
	1	16	33.33
	2	5	10.42

Tabelle 16: Unterschiede der Zytokinpolymorphismen zwischen Empfänger und Spender.

Die Tabelle zeigt die Anzahl n und den Prozentsatz der aufgetretenen Unterschiede zwischen Empfänger und Spender. Aufgrund der einzelnen Kombinationsmöglichkeiten können bei TGF- β bis zu 4 und bei IL-10 bis zu 6 Unterschiede auftreten. Aufgrund

fehlender Angaben zu den Zytokinpolymorphismen wurden die Prozentsätze auf die vorhandenen Angaben bezogen.

5.3.3 Geschlecht, Alter und Zytokinpolymorphismen

Geschlecht und Alter der Patienten hingen nicht mit dem Auftreten der einzelnen Zytokinpolymorphismen zusammen.

5.3.4 Bereits durchgeführte SZT und Zytokine

Kinder, die bereits früher eine Stammzelltransplantation erhalten hatten, unterschieden sich bezüglich ihrer Zytokine nicht von den Patienten, die zum ersten Mal transplantiert wurden. Demnach konnten wir keine Risikokonstellation für die Entstehung eines Rezidivs, welches eine erneute SZT notwendig macht, ermitteln.

5.3.5 Spender, Stammzellherkunft und Zytokine

Zwischen dem Alter der Spender und den Zytokinen gab es keinen Zusammenhang. Spender und Empfänger werden unabhängig von den Zytokinpolymorphismen, aber nach der Übereinstimmung der HLA-Merkmale ausgewählt.

Auch das Geschlecht der Spender spielte bei der Diskrepanz der Zytokine keine Rolle.

Wer als Spender infrage kommt wird anhand der Übereinstimmung der HLA-Merkmale und der individuellen Risikosituation sowie dem Vorhandensein von Spendern entschieden. So kann das Transplantat sowohl von Geschwistern, Eltern

oder Fremdspendern gewonnen werden. Diese können zu ihrem Empfänger trotz Übereinstimmung möglichst vieler HLA-Merkmale Diskrepanzen hinsichtlich ihrer Zytokinpolymorphismen aufweisen. Hier gab es jedoch keine signifikanten Diskrepanzen der Zytokinpolymorphismen hinsichtlich der Übereinstimmung der HLA-Merkmale (identisch, haplo, mismatch).

Als ebenso unauffällig erwiesen sich die Zytokinpolymorphismen bezüglich der Verwandtschaft der Spender zum Empfänger.

5.3.6 Einfluss der Zytokinpolymorphismen auf die Entstehung einer GvHD

Die Entstehung einer GvHD generell hing kaum vom Auftreten bestimmter Zytokinpolymorphismen des Patienten und überhaupt nicht von denen des Spenders ab. Es findet sich jedoch eine deutliche Abhängigkeit von der Diskrepanz der Zytokine des Patienten und des Spenders, welche in Tabelle 16 dargestellt wird.

GvHD		n	MW	ST	p _U
Diskrepanz					
IL-10 (1)	ja	31	0.516	0.570	0.55 (n.s)
	nein	14	0.643	0.633	
IL-10 (2)	ja	31	0.258	0.514	0.0061**
	nein	14	0.786	0.699	
IL-10 (3)	ja	31	0.258	0.514	0.0061**
	nein	14	0.786	0.699	
IL-10	ja	31	1.032	1.378	0.039*
	nein	14	2.214	1.888	
IL-6	ja	33	0.455	0.617	0.023*
	nein	11	0.909	0.539	

Tabelle 17: GvHD und Zytokin-Diskrepanz der signifikanten Polymorphismen (IL-10 und IL-6) zwischen Patienten und Spendern.

Besteht keine Diskrepanz beträgt der Mittelwert MW=0, maximal kann er den Wert der möglichen Kombinationen betragen (2 Möglichkeiten für TNF- α , TGF- β (1),(2), IL-10(1), IL-10(2), IL-10(3), IL-6 und IFN- γ ; 4 Möglichkeiten für TGF- β und 6 Möglichkeiten für IL-10.

Die Abhängigkeit zwischen der Entstehung einer GvHD und Zytokindiskrepanzen zwischen Spender und Empfänger zeigte sich bei IL-10 und IL-6.

Hier sind die Korrelationen negativ, d. h. je mehr Zytokin-Diskrepanzen auftraten, desto weniger Lokalisationen waren generell von einer GvHD betroffen (s.IL-10).

Je verschiedener IL-6 zwischen Patient und Spender war, desto geringer war der Schweregrad einer aGvHD ($p=0,046$). Ein ähnlicher Zusammenhang fand sich zwischen IL-10 (2) und IL-10 (3) und einer aGvHD ($p=0,063$).

Zugleich zeigte eine geringe Übereinstimmung von IL-6 jedoch auch einen erhöhten Schweregrad einer cGvHD ($p=0,076$).

5.3.6.1 TNF- α

Für TNF- α des Empfängers konnte kein signifikanter Zusammenhang zur Entstehung einer GvHD generell nachgewiesen werden.

Kinder, die eine Stammzelltransplantation eines Spenders mit TNF- α A/A erhielten blieben hingegen besonders häufig (95,65%) frei von einer cGvHD ($p=0,042$), G/A und G/G schnitten vergleichsweise (mit 75 bzw. 70% cGvHD-Freiheit) schlechter ab.

5.3.6.2 TGF- β

Weder bei der Analyse der Zytokinpolymorphismen der Spender noch bei der Empfänger konnten signifikante Zusammenhänge zum Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD aufgezeigt werden.

5.3.6.3 IL-10

Die Auswertung des Zusammenhangs von IL-10 und der Entstehung einer chronischen GvHD zeigt jedoch deutliche Abhängigkeiten. Bei einer geringeren Diskrepanz der IL-10 Zytokine zeigte sich ein vermehrtes Auftreten einer cGvHD ($p=0,039$).

Dass Patienten, die in ihren Zytokinpolymorphismen von IL-10(2) und demnach auch IL-10(3) mit ihrem Spender Übereinstimmungen hatten, ein vermehrtes Auftreten einer cGvHD aufwiesen, zeigt sich in Abbildung 17.

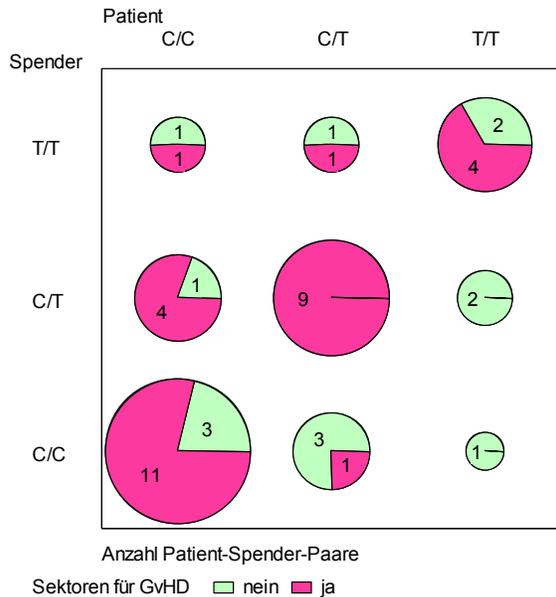


Abbildung 17: GvHD und IL-10 (2)-Diskrepanzen.

Abbildung 17 zeigt die Entstehung einer GvHD in Abhängigkeit von der Übereinstimmung der Zytokinpolymorphismen von IL-10 (2) zwischen Spender und Empfänger.

Bei der Kombination Spender C/C und Patient C/C waren von elf Fällen sieben Patienten mit einer Lokalisation von einer cGvHD betroffen. Einmal trat der Befall zweier und in drei Fällen von vier Lokalisationen auf.

Von den insgesamt neun cGvHD-Fällen der Kombination Spender C/T und Empfänger C/T litten sechs Patienten unter dem Befall einer, zwei Patienten unter dem Befall zweier und ein Patient unter dem Befall von drei Lokalisationen.

Für die Patienten mit IL-10(2)= T/T, deren Spender ebenfalls T/T aufwies, ergab sich in drei Fällen eine Lokalisation und in einem Fall vier Lokalisationen mit cGvHD-Befall (Abbildung 15).

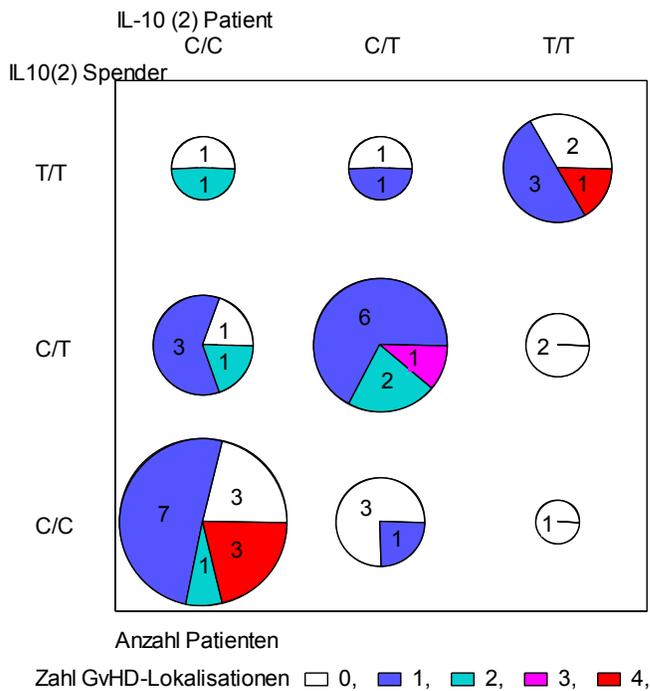


Abbildung 18: Zahl der cGvHD-Lokalisationen bei IL-10 (2) der Patienten und Spender.

Die Abbildung zeigt die Anzahl, der von einer cGvHD betroffenenen Lokalisationen in Abhängigkeit der Übereinstimmungen von IL-10(2) zwischen Spender und Empfänger.

Hinsichtlich der Entstehung einer chronischen GvHD blieben Patienten mit der IL-10(1) Kombination A/A und A/G zu 88 bzw. 91% frei von einer chronischen GvHD, wohingegen die Hälfte der Patienten mit G/G eine cGvHD erlitt ($p=0,048$). Die Kombination G/G gilt als „high producer“ des antiinflammatorischen Zytokins.

Für IL-10 handelt es sich bei den Kombinationen ACC/ACC, ACC/ATA sowie ATA/ATA um sog. „low producer“.

Eine mittlere Expressionsrate zeigen GCC/ACC und GCC/ATA. GCC/GCC hingegen wird als „high producer“ geführt. Die sog. „high producer“ sorgen für eine erhöhte Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine, wohingegen die „low producer“ eine geringe Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine aufweisen.

5.3.6.4 IL-6

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Zytokin-Diskrepanz von IL-6 zwischen Spender und Empfänger bei der Entstehung einer cGvHD. Je geringer die Diskrepanz der Polymorphismen, desto häufiger kam es generell zu einer cGvHD ($p=0,023$).

Selbiges konnte für die akute GvHD nachgewiesen werden ($p=0,019$).

Patienten mit IL-6-Zytokinen G/C (94,74%) oder C/C (86,36%) blieben meist frei von einer cGvHD, 57,14% mit IL-6 G/G litten jedoch unter einer cGvHD ($p=0,016$).

Die Genotypen G/C und G/G stehen für eine hohe Expressionsrate des proinflammatorischen Zytokins, wohingegen C/C zu den „low producers“ gehört.

Eine erhöhte Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins sorgt für eine überschießende Entzündungsantwort und chronische Entzündungen.

Je unterschiedlicher IL-6 der Patienten und Spender war, desto geringer war außerdem der Schweregrad einer aGvHD ($p_r= 0.046$). Ein ähnlicher Zusammenhang fand sich zwischen IL-10 (2) bzw. IL-10 (3) und einer aGvHD ($p = 0,063$).

Je verschiedener aber IL-6 der Patienten und Spender war, desto höher war der Schweregrad einer cGvHD ($p = 0,076$).

5.3.6.5 IFN- γ

Die Auswertung der Polymorphismen von IFN- γ zeigte keine Signifikanz bezüglich des Auftretens einer akuten oder chronischen GvHD.

6 Diskussion

6.1 Einführende Bemerkungen

Leukämien und maligne Tumoren sind seltene Erkrankungen im Kindesalter. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 1760 Kinder unter 15 Jahren. Trotz vieler Studien und Theorien konnte bisher nicht immer eine eindeutige Ursache für die Entstehung maligner Erkrankungen gefunden werden. Die Prognose konnte in den letzten Jahrzehnten durch Therapieoptimierungsstudien stetig verbessert werden, jedoch wird die verbesserte Prognose teilweise durch eine Vielzahl an Nebenwirkungen, wie beispielsweise der Entstehung einer Graft-versus-Host-Disease nach allogener SZT, erkauft, die den Therapieerfolg limitieren.

Daher ist es wichtig, die Zusammenhänge der Stammzelltransplantation mit der Entstehung einer Graft-versus-Host-Disease zu verstehen, um derselben vorbeugen zu können, da diese Krankheit unbehandelt zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führen kann sowie zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität und sozialen Rehabilitation. Neben klinischen Parametern werden verschiedene genetische Prädispositionen wie beispielsweise Zytokinpolymorphismen für die Entstehung einer GvHD in Betracht gezogen. Deshalb haben wir Zytokinpolymorphismen, die einen regulatorischen Einfluss auf die Entstehung dieser Erkrankung sowie Entzündungsprozesse im Allgemeinen und deren Zusammenhang mit einer GvHD getestet.

6.2 (Bekannt) klinische Parameter und Risikofaktoren für die Entstehung einer GvHD

Es zeigte sich bereits in verschiedenen Studien, dass unterschiedliche klinische Patientenmerkmale den Verlauf und die Prognose sowie das Risiko für die Entstehung einer GvHD beeinflussen.

Zunächst erhöhen HLA-Unterschiede zwischen Spender und Empfänger das Risiko für die Entstehung einer GvHD [38]. Auch in unserem Patientenkollektiv blieben Patienten mit einer HLA-identischen Stammzelltransplantation häufiger frei

von einer GvHD als haploidentische oder mismatch Transplantate. Daher wurde stets versucht einen verwandten oder nicht verwandten HLA-identischen Spender zu finden.

Zudem erhöhen Patienten- und Spenderalter[39, 40] , sowie vorherige Stammzelltransplantationen das Risiko einer GvHD.[38] Die stammzelltransplantierten Kinder unserer Kohorte unter einem Jahr erkrankten nicht an einer GvHD, wohingegen bei den älteren Patienten zu 74% eine chronische und/oder akute GvHD auftrat ($p=0,022$). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei den Kindern unter einem Jahr um lediglich drei Patienten handelte. Das Spenderalter hingegen spielte in unseren Untersuchungen keine Rolle hinsichtlich der Entstehung und des Verlaufs einer GvHD generell. Hinsichtlich der Entstehung einer GvHD allgemein in Abhängigkeit zu bereits durchgeführten SZT blieb unsere Kohorte ebenfalls unauffällig.

Handelt es sich bei der Stammzelltransplantation um eine weibliche Spenderin und einen männlichen Empfänger wird das Risiko der Patienten an einer GvHD zu erkranken weiter erhöht. Grund hierfür sind Y-Chromosom assoziierte Minor-Antigene. Im Fall einer Alloimmunisierung der Spenderin durch eine vorausgegangene Schwangerschaft steigt das Risiko einer GvHD ebenfalls.[39, 41] In unserem Patientenkollektiv trat lediglich bei den männlichen Patienten häufiger eine aGvHD Grad 2 oder 3 auf ($p=0,025$). Die Zusammenhänge mit einer vorangegangenen Schwangerschaft einer Spenderin wurden von uns nicht untersucht.

Des Weiteren beeinflussen Erkrankungsstadium zum Zeitpunkt der Transplantation und Diagnose das Auftreten einer GvHD.[42, 43] Kann über einen längeren Zeitraum kein identischer Spender gefunden werden, eine SZT ist jedoch unbedingt erforderlich, wurde auch auf weniger passende Spender (haplo, mismatch) zurückgegriffen. Diese zeigen aufgrund der geringeren Übereinstimmung und der Notwendigkeit eine SZT eine schlechtere Prognose bezüglich der Entstehung einer GvHD.

Außerdem erlitten Kinder, die bereits eine SZT erhalten hatten, häufiger ein Rezidiv und wir konnten somit bekannte Daten bestätigen, dass vorausgegangene SZT das Risiko ein Rezidiv zu erleiden erhöhen. [38]

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Ausprägung und Häufigkeit einer GvHD auch mit der vermehrten Synthese von proinflammatorischen Th1-Zytokinen assoziiert wird, während antiinflammatorische Th2-Zytokine die GvHD vermindern.[20, 44]

6.3 Zytokinpolymorphismen

Aufgrund der bereits dargestellten möglichen Zusammenhänge haben wir bestimmte Zytokinpolymorphismen analysiert.

Die Entstehung und das Ausmaß der Graft-versus-Host-Disease wurden bereits mit bestimmten Zytokinen in Verbindung gebracht. [45] Da verschiedene Polymorphismen mit einer unterschiedlichen Expressionsrate assoziiert sind, kann das Spender- und Empfänger-Zytokinprofil von Blut und Gewebe mit dem Transplantatergebnis assoziiert werden. Eine Th1-Antwort ist bei der soliden Organtransplantation im Allgemeinen mit der Transplantatabstoßung verbunden während eine Th2-Antwort zu Toleranz und stabilem Transplantatüberleben führen kann. [46]

Vor allem T-Zellen und dendritische Zellen spielen auch in der Pathophysiologie der GvHD eine Rolle. TH1-Zellen wirken proinflammatorisch und werden wiederum von TH2-Zellen supprimiert.

Die Ergebnisse von bereits veröffentlichten Studien deuten darauf hin, dass die Synergisten TNF α - und IFN- γ (proinflammatorische Zytokine) direkt an Gewebeschäden während der Graft-versus-Host-Krankheit bei der allogenen Transplantation beim Menschen beteiligt sind.[47]

TNF- α und IFN- γ gehören zur TH1-Antwort und lösen Entzündungsprozesse aus.

Ebenso gehört das proinflammatorische IL-6 zur angeborenen, unspezifischen Immunantwort und gilt als Vermittler zwischen der unspezifischen und spezifischen Immunantwort im Bezug auf Entzündungsprozesse.

Diverse Studien zeigten bereits, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-1 und IL-8 während der Konditionierung die Pathogenese transplantatbedingter Komplikationen, einschließlich GvHD, beeinflussen.[48]

TGF- β wirkt stark kontextabhängig und kann auf Grund seiner antiproliferativen, proapoptotischen und antiangiogenetischen Wirkung als Tumorsuppressor wirken. Allerdings kann sich die Reaktion der Krebszellen auf TGF- β im Laufe der Krebserkrankung ändern und die Progression der Krebserkrankung fördern, indem es die Krebszellen durch seine immunsuppressive Wirkung vor dem Immunsystem schützt. Die TGF- β Moleküle beeinflussen u.a. die Steuerung von Zellwachstum und -differenzierung bei reparativen Prozessen sowie bei der Einleitung von Entzündungen durch chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen und Fibroblasten.

IL-10 moduliert Entzündungsgeschehen, indem es durch seine antiinflammatorische Wirkung eine überschießende Immunantwort verhindert.

Somit scheinen TNF- α , IFN- γ , TGF- β sowie IL-6 und IL-10 einen Einfluss auf die Modulation von Entzündungsprozessen und auf die Entstehung einer GvHD zu haben.

Die unterschiedliche Expressionsrate der verschiedenen Zytokinpolymorphismen kann ein Schlüssel für die Entstehung einer GvHD sein. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage in wie weit bestimmte Zytokinpolymorphismen der Empfänger und Spender einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf einer Graft-versus-Host-Disease haben.

Die genannten SNPs zeigen einen Einfluss auf die Menge der ausgeschütteten Zytokine, die die Entstehung einer GvHD fördern oder unterdrücken können. So kann vermutet werden, dass die Entstehung bzw. das Ausmaß einer Entzündung genetisch beeinflusst wird.

Beispielsweise korreliert der SNP von TNF- α G/G mit einer niedrigen Expressionsrate, wohingegen die SNPs G/A und A/A mit einer hohen Expressionsrate verbunden sind. Wird vermehrt TNF- α , also ein proinflammatorisches Zytokin ausgeschüttet, ist dies mit einer stärkeren Entzündungsreaktion verbunden als eine niedrige Expressionsrate.

Ebenso kann eine antiinflammatorische Zytokinexpression Antwort auf einen vorangegangenen Entzündungsprozess sein oder eine Entzündungsreaktion vor deren Entstehung unterdrücken.

6.3.1 TNF- α

TNF α ist ein multifunktionales proinflammatorisches Zytokin, das in der systemischen inflammatorischen Immunantwort eine Rolle spielt. TNF- α kann Apoptose induzieren, Einfluss auf die Differenzierung von Zellen nehmen, Entzündungen auslösen und moduliert virale Replikationen.

Aufgrund seiner Eigenschaften wird angenommen, dass die Dysregulation von TNF- α , zum Beispiel bei einer vermehrten Expression Einfluss auf die Entstehung vieler menschlicher Krankheiten haben kann, auch auf die Entstehung maligner Tumoren.[49]

Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass TNF- α mit einer Abstoßungsreaktion bei Organtransplantationen korreliert.[50]

Im untersuchten Patientenkollektiv konnte kein Zusammenhang zwischen dem TNF- α Polymorphismus und der Prognose gefunden werden. Es zeigte sich jedoch, dass Kinder, die eine Stammzelltransplantation von einem Spender mit A/A-Genotyp erhielten besonders häufig frei von einer chronischen Graft-versus-Host-Disease blieben. Der Genotyp A/A ist mit einer hohen Expressionsrate assoziiert. TNF- α kann die Ausschüttung anderer Zytokine und Cortisol anregen. Daher könnte man hypothesieren, dass durch eine hohe Expressionrate des Spenders und durch die anschließend vermehrte Ausschüttung von Cortisol eine

GvHD verhindert werden kann. Cortisol wirkt als wichtiger Suppressor einer überschießenden TH1-Entzündungsreaktion.

Zudem führt TNF- α im weiteren Verlauf einer Entzündungsreaktion zur Bildung und Ausschüttung von IL-1 und IL-6 und durch autokrine Rückkopplung zur weiteren Freisetzung von TNF- α . IL-1 induziert die Freisetzung von TNF- α und IL-6 sowie die eigene Freisetzung. Unter bestimmten Bedingungen führt IL-6 anschließend zur negativen Rückkopplung von IL-1 und TNF- α .

Dennoch muss kritisch beachtet werden, dass die überwiegende Datenmenge vor allem die proinflammatorische Wirkung hervorhebt und die Entstehung einer GvHD bestätigt. So wurde festgestellt, dass der TNF- α -Pegel bei der Entstehung der akuten sowie chronischen GvHD erhöht und mit IL-6 hauptsächlich an der Gewebsschädigung während einer Allotransplantation beteiligt ist. Interessanterweise schienen diese Zytokine synergistisch zu interagieren, um eine klinische GvHD zu induzieren, was darauf hindeutet, dass keines dieser Zytokine allein funktioniert.[51]

Da den Ergebnissen dieser Arbeit nur geringe Patientendaten zugrunde liegen, ist die Aussagekraft der Ergebnisse limitiert. Daher sollten die Ergebnisse dieser Arbeit in einem größeren Patientenkollektiv kontrolliert und deren Gültigkeit getestet werden.

6.3.2 TGF- β

Der Transforming growth factor beta existiert in drei Isoformen. Es kontrolliert unter anderem die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen, kann aber auch als negativer, autokriner Wachstumsfaktor wirken und Apoptose induzieren. Somit nimmt es eine duale Funktion als Tumorsuppressor und Tumorpromoter ein[52] und spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen. Es wurde bereits gezeigt, dass bestimmte Genpolymorphismen von TGF- β keinen Einfluss auf die Entstehung einer akuten lymphatischen Leukämie haben.[53] Die

vorliegende Arbeit bestätigt, dass in dem von uns untersuchten Patientenklientel kein Zusammenhang zwischen bestimmten Zytokinpolymorphismen und dem Auftreten der einzelnen Diagnosen besteht.

Bereits veröffentlichte Daten zeigen, dass ein hochexprimierter Genotyp von TGF- β mit einer erhöhten Inzidenz von GvHD in allogenen SZT-Empfängern assoziiert ist. Es kann mehrere Möglichkeiten geben, in denen TGF- β dieses Ergebnis beeinflussen könnte, da es von einer Vielzahl von Zellen produziert wird und mehrere Eigenschaften aufweist, abhängig von seiner Konzentration und dem Typ der Zielzelle. Seine Eigenschaften sind sowohl proinflammatorisch als auch immunsuppressiv zur Förderung der Fibrose. Eine weitere Untersuchung, wie TGF- β -Allele für GvHD prädisponieren könnten, kann sowohl für ein besseres Verständnis der GvHD-Pathogenese als auch einen prognostischen Indikator für die GvHD-Prophylaxe liefern.[54]

In der von uns untersuchten Patientenkohorte zeigte sich kein Zusammenhang bestimmter TGF- β -Polymorphismen mit dem Auftreten bestimmter Erkrankungen oder der Entstehung einer Graft-versus-Host-Disease. Somit konnten wir auch keinen Zytokinpolymorphismus und Expressionsrate von TGF- β ausmachen, die mit der Entstehung der einzelnen Diagnosen oder der Inzidenz einer GvHD in Verbindung gebracht werden konnte. So kann ein hoher Pegel von TGF- β je nach Zusammenspiel mit anderen Zytokinen und anderen Umständen eine unterschiedliche Wirkungsweise entfalten.

Aufgrund der Dualität von TGF- β ist der Einfluss dieses Zytokins stark kontextabhängig, so kann eine schlechte Prognose nicht mit einer hohen oder niedrigen Expressionsrate sondern mit einer Regulationsstörung in Verbindung gebracht werden.[55]

6.3.3 IFN- γ

Interferon gamma wird ausschließlich von T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert. Es wirkt antiviral, immunmodulatorisch und antitumorös.[56]

Aufgrund seiner proinflammatorischen Wirkung kann es die Tumorprogression beeinflussen. [57, 58] In einer Vielzahl von Studien wurde bereits festgestellt, dass der IFN- γ -Polymorphismus mit einer erhöhten Krebsrate einhergeht. So wurde es sowohl im Zusammenhang mit Cervix- [59]als auch Mammakarzinomen genannt. [57] Es zeigte sich, dass IFN- γ das Risiko einer Erkrankung signifikant erhöht. Jedoch gibt es ebenso konträre Ergebnisse. So konnte festgestellt werden, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen IFN- γ Polymorphismus und dem Auftreten verschiedener Tumoren gibt. [60]

Ebenso konnte im untersuchten Patientenkollektiv kein Zusammenhang zwischen dem IFN- γ Polymorphismus und dem Auftreten sowie der Prognose verschiedener Tumorerkrankungen bei Kindern nachgewiesen werden.

6.3.4 IL-6

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von T-Zellen und Makrophagen ausgeschüttet wird und die Entzündungsreaktionen eines Organismus reguliert. Es wirkt sowohl bei lokalen oder akuten Infektionen über die Stimulation der Expression von Akute-Phase-Proteinen und inhibiert die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IFN- γ). Seine proinflammatorische Wirkung zeigt es bei chronischen intrazellulären Infektionen oder Tumorerkrankungen.[61]

Zudem konnte bereits nachgewiesen werden, dass IL-6 bei soliden Tumoren im fortgeschrittenen Stadium mit einer schlechteren Prognose korreliert und das Tumorwachstum unterstützt. [62-64]

In unserem Patienten- und Spenderkollektiv zeigte sich, dass eine geringere Diskrepanz der IL-6-Polymorphismen zwischen Spender und Empfänger zu einem vermehrten Auftreten einer akuten und chronischen GvHD führten.

Des Weiteren blieben Empfänger mit G/C- und C/C-Genotypen meist frei von einer chronischen GvHD, wohingegen Empfänger des G/G-Genotypes eine chronische GvHD erlitten. G/C und G/G sind mit einer hohen Expressionsrate assoziiert. C/C zeigt eine niedrige Expressionsrate. Somit konnten bestehende Daten teilweise von uns bestätigt werden und können somit als geltend angesehen werden. Der SNP C/C weist eine geringe Expression des proinflammatorischen Zytokins auf und zeigt demnach auch eine geringe Inzidenz einer GvHD. Zugleich zeigt G/G eine hohe Expressionsrate und Patienten mit dem SNP G/G eine vermehrtes Auftreten einer cGvHD.

Lediglich G/C zeigte in unserer Patientenkohorte trotz einer hohen Expressionsrate meist keine GvHD. Dies lässt sich dadurch erklären, dass IL-6 alleine nicht für die Entstehung einer GvHD steht, sondern im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen wirkt.

Außerdem kann IL-6 wie bereits beschrieben auch an einer negativen Rückkopplung anderer proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 und TNF- α beteiligt sein.

Es zeigte sich bei einer erhöhten Anzahl an Unterschieden des IL-6-Polymorphismus zwischen Spender und Empfänger zwar ein geringerer Schweregrad einer akuten GvHD, jedoch ein höherer Schweregrad einer chronischen GvHD. Dies kann jedoch durch unterschiedliche Expressionsraten erklärt werden. Zwar zeigen die Patienten Unterschiede zu ihrem Spender hinsichtlich des IL-6-Zytokinpolymorphismus, sollten jedoch in Abhängigkeit ihrer SNPs und dessen Expressionsrate bewertet werden.

6.3.5 IL-10

Interleukin 10 wird primär von Monozyten, aber auch TH2-Zellen und Makrophagen gebildet. Es wird oft als Gegenspieler von TNF- α beschrieben und wirkt antiinflammatorisch.

Aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass die Rolle von IL-10 bei der Entstehung von Tumoren weniger sicher geworden ist. IL-10 spielt für T-Helfer-Funktionen, die T-Zell-Immunüberwachung sowie für die Suppression Krebs-assoziiierter Entzündungen eine Rolle. Durch die Förderung der tumorspezifischen Immunüberwachung gilt IL-10 als Schlüsselzytokin in der Tumorbekämpfung.[65] Auch in der untersuchten Patientenkohorte zeigte sich eine Korrelation der Diagnose und des Status vor Stammzelltransplantation mit der Verteilung von IL-10.

Es zeigten sich die wenigsten Unterschiede, wenn Geschwister als Spender fungierten, wohingegen haploidentische Spender die meisten Unterschiede aufwiesen.

Proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-1 können zur Pathogenese einer GvHD beitragen. Im Gegensatz dazu bleibt die Rolle des immunoregulatorischen Zytokins zweideutig.[66-68]

Daten aus mehreren Studien weisen darauf hin, dass die Schwere der klinischen GvHD mit dem Serum-IL-10 korreliert.[69]

IL-10 und sein Rezeptor gehören zu den Schlüsselregulatoren der Immunantwort und werden mit der Verhinderung und Kontrolle der Komplikationen einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation, insbesondere der Graft-versus-Host-Disease, in Verbindung gebracht.[70]

Die Variation in der Promotorregion des Interleukin-10 (IL-10) -Gens wurde bereits mit dem Risiko einer GVHD [71, 72] und dem Risiko einer transplantationsbedingten Mortalität assoziiert.

Das IL-10 / 592 A Allel des Empfängers wurde mit weniger schweren GVHD und verbessertem Überleben assoziiert.[73]

In der von uns untersuchten Patientenkohorte blieben Patienten mit IL-10 (1)=A/A und A/G meist frei von einer chronischen GVHD, wohingegen Patienten mit IL-10 (1)=G/G zur Hälfte eine cGVHD erlitten. Somit wurden bereits veröffentlichte Studien in unserer Patientenkohorte bestätigt.

Dieser Effekt erklärt sich durch die Tatsache, dass GCC mit einer hohen Expressionsrate korreliert, wohingegen ACC und ATA mit einer niedrigen bzw. mittleren Expressionsrate korreliert.[74, 75]

Es konnten ebenso hohe Pegel antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 oder TGF- β mit einer GVHD in Verbindung gebracht werden. Ebenso wurde bereits von einer Assoziation von IL-10 mit einer erhöhten Mortalität nach SZT berichtet.

Die Hauptfunktion von IL-10 scheint die Begrenzung und Regulierung von entzündlichen Reaktionen zu sein.[76] Somit könnten hohe Niveaus von IL-10, die während einer GVHD gemessen werden, aufgetreten sein, um die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu hemmen. Ob die immunsuppressive Wirkung von IL-10 für GVHD vorteilhaft ist oder nicht, ist umstritten, weil eine hohe IL-10-Produktion zu einer funktionellen Immunschwäche und damit zur Entwicklung schwerer Komplikationen führen kann.[77]

Wir konnten keine Assoziation einer GVHD generell mit dem Vorkommen bestimmter Zytokinpolymorphismen der Spender oder Empfänger herstellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der von uns untersuchten Kohorte eine Abhängigkeit einer cGVHD und der Diskrepanz von IL-10 zwischen Spender und Empfänger. Die Korrelation zwischen der Zytokindiskrepanz und der Anzahl der betroffenen Lokalisationen war negativ. Bei IL-10-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger kam es häufiger zur Entstehung einer GVHD sowie zum Befall mehrerer Lokalisationen. Auch hier müssen neben den Zytokinunterschieden die Expressionsraten der SNPs beachtet werden und können eine Erklärung für die Entstehung einer GVHD bieten.

6.3.6 Zytokinpolymorphismen allgemein

Hinsichtlich der Entstehung eines Rezidivs zeigten die von uns bestimmten Zytokinpolymorphismen in der Kohorte keinen Einfluss. Lediglich eine längere Latenz und bereits durchgeführte hämatopoetische Stammzeltransplantationen waren klinische Faktoren, die mit einer verschlechterten Prognose der Patienten assoziiert werden konnten. Hier kann die Erklärung in der Progredienz der Erkrankung oder dem erhöhten Schweregrad gefunden werden.

In den letzten Jahren zeigten mehrere Gruppen den prädiktiven Wert bestimmter Polymorphismen für pro- und antiinflammatorische Zytokine, die das Transplantat-Ergebnis beeinflussen, und zwar sowohl mit verwandten als auch mit nicht verwandten HSCT. [78-80] Allerdings ist die veröffentlichte Datenmenge nicht einheitlich und reflektiert die Heterogenität der Transplantatkohorten in Bezug auf das Alter des Empfängers, den Krankheitsstatus, die Art der Spende, die Stammzellenherkunft oder ähnlichem. Darüber hinaus wurden die meisten der veröffentlichten Studien mit erwachsenen Empfänger-Spender-Paaren und nur sehr wenige bei Kindern durchgeführt.[81, 82]

Dennoch zeigen die untersuchten SNPs einen Einfluss auf die ausgeschüttete Zytokinmenge und könnten somit die Entstehung einer GvHD beeinflussen. Es wird angenommen, dass die von uns untersuchten Zytokine in ihren unterschiedlichen Expressionsraten dazu beitragen, die Progression einer GvHD auf unterschiedliche Weise zu beeinflussen.

Vor allem das Gleichgewicht zwischen Zytokinen scheint bei der Kontrolle der GvHD eine wichtige Rolle zu spielen. So können antiinflammatorische Zytokine in hohen Mengen eine Entzündungsreaktion initial verhindern oder im Verlauf einer GvHD als Reaktion auf ein proinflammatorisches Geschehen auftreten. Ebenso müssen proinflammatorische Zytokine nicht zwangsläufig eine GvHD verursachen, sondern können ihre eigene Produktion durch negative Rückkopplung reduzieren.

Die untersuchten Zytokine und deren Regulation zeigen aber einen Einfluss auf die Entstehung einer GvHD und wirken synergetisch in einem komplexen Zusammenspiel.

Im komplexen Zusammenspiel der immunologischen und nichtimmunologischen Faktoren, die in das Geschehen der GvHD und der Transplantatabstoßung involviert sind, könnte die genetische Komponente möglicherweise aber auch wenig Einfluss auf den klinischen Verlauf haben. Der Einfluss der Genpolymorphismen könnte im Vergleich zu anderen entscheidenden Faktoren bei der Stammzelltransplantation durch diese maskiert werden. Beispielsweise wird der Einfluss der Polymorphismen auf die Plasmaspiegel von IL-6 und TNF-alpha auch durch das Geschlecht, das Alter und den body mass index (BMI) beeinflusst.

Die Abhängigkeit der Zytokinexpression von Genpolymorphismen wurde im Zusammenhang vieler Studien untersucht. Die untersuchten Zytokine sind zum Teil multifunktional und haben nicht rein pro- oder antiinflammatorische Eigenschaften. Daher müssen sie in einem komplexen Mechanismus betrachtet werden. Ihre Wirkungsweise könnte in Abhängigkeit der immunologischen Mechanismen, die durch den jeweiligen Fall aktiviert wurden, unterschiedlich sein. Zytokine arbeiten in einem komplexen Zusammenspiel, regulieren sich selbst und andere Zytokine durch Aufbauen eines Netzwerks an interagierenden Mediatoren. Diese Tatsachen muss beachtet werden, wenn der Einfluss der Zytokine auf komplexe Zusammenhänge, wie die Entstehung einer GvHD interpretiert wird.

Daher ist es sinnvoll, die komplexen Wirkungsmechanismen der einzelnen Zytokine hinsichtlich ihrer genetisch determinierten Expressionrate zu untersuchen, um schwerwiegende Nebenwirkungen der Stammzelltransplantation wie die GvHD besser absehen und behandeln zu können und somit die Therapie und die Prognose der Patienten zu verbessern.

7 Zusammenfassung

Maligne Tumoren und Leukämien stellen nach Unfällen die zweithäufigste Todesursache bei Kindern dar. In der Therapie dieser Erkrankungen nimmt die allogene Stammzelltransplantation eine zentrale Rolle ein. Trotz verbesserter Therapieoptionen wird der Erfolg durch Nebenwirkungen wie z.B. der Graft-versus-Host-Disease limitiert. Diese entsteht bei der Übertragung immunkompetenter T-Lymphozyten im Transplantat, die Antigenstrukturen gesunder Gewebe des Empfängers als fremd erkennen. Durch den Antigenkontakt mit dem Empfängergewebe werden T-Zellen aktiviert, können sich proliferieren und es kommt zum immunologischen Angriff auf gesundes Gewebe. Die genaue Pathogenese einer chronischen GvHD bleibt jedoch unklar.

Pro- und antiinflammatorische Zytokine spielen eine Schlüsselrolle in den komplexen Wirkungsmechanismen des Immunsystems. Da deren Produktionsprofil viele Infektions-, Autoimmun- oder Tumorerkrankungen und deren Verlauf beeinflusst, wird vermutet, dass diese neben klinischen Faktoren auch einen Einfluss auf die Entstehung einer GvHD haben. Genetisch determinierte Zytokingenpolymorphismen werden mit unterschiedlichen Wirkungsweisen in Verbindung gebracht. Daher haben wir untersucht, ob und in welcher Form Zusammenhänge mit dem Vorkommen bestimmter Zytokingenpolymorphismen und dem Auftreten und dem Verlauf einer Graft-versus-Host-Disease bestehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 72 pädiatrische Patienten, die eine allogene Stammzelltransplantation erhielten, auf die Spender- und Empfänger-Zytokinpolymorphismen $TNF-\alpha$, $TGF-\beta 1$, IL-10, IL-6 und $IFN-\gamma$ untersucht. Die Patienten wurden im Zeitraum von April 2013 bis September 2014 in der Kinderklinik des Universitätsklinikum Würzburgs routinemäßig behandelt oder es wurde auf archivierte Proben zurückgegriffen. Die Proben wurden mittels DNA-Extraktion, sequenzspezifischer PCR und Gelelektrophorese analysiert und auf deren Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf maligner Erkrankungen sowie auf die Entstehung einer GvHD untersucht.

Im Vergleich der Verteilung der Zytokinpolymorphismen der an Leukämie erkrankten Kinder mit einer gesunden Kohorte konnte im Zuge dieser Studie ein signifikanter Unterschied der Verteilung von IL-10 festgestellt werden. Für andere maligne Erkrankungen fand sich ein Unterschied bezüglich der IL-10- und TGF- β -Zytokinpolymorphismen. Bezüglich der Entstehung einer GvHD konnten wir für die Zytokine TGF- β , TNF- α und IFN- γ keine Zusammenhänge feststellen. Eine GvHD generell konnte nicht mit bestimmten Zytokingenpolymorphismen in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer cGvHD und der Diskrepanz der IL-10- und IL-6 – Polymorphismen zwischen Spender und Empfänger. Je mehr Unterschiede von IL-6 auftraten, desto höher war der Grad einer cGvHD. Zusätzlich hatte ein Unterschied der IL-10- (und IL-6)-Polymorphismen einen Einfluss auf die Entstehung einer cGvHD und die Anzahl der betroffenen Organe. Hier waren die Korrelationen negativ. Je geringer die Übereinstimmung der Zytokinpolymorphismen zwischen Empfänger und Spender waren, desto häufiger kam es zum Vorkommen einer cGvHD sowie dem Befall mehrerer Lokalisationen.

Auch wenn die Wirkungsweise der Zytokine in einem komplexen Mechanismus betrachtet werden muss, wird mit dieser Arbeit bestätigt, dass bestimmte pro- oder antiinflammatorische Zytokine und deren Expressionsrate einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf einer GvHD zu haben scheinen. Die untersuchten Zytokine sind zum Teil multifunktional und wirken nicht rein pro- oder antiinflammatorisch. Ihre Wirkungsweise könnte in Abhängigkeit der immunologischen Mechanismen, die durch den jeweiligen Fall aktiviert wurden, unterschiedlich sein.

Daher ist es sinnvoll, die einzelnen Zytokine hinsichtlich ihrer genetisch determinierten Expressionrate in einer größeren Kohorte zu untersuchen, um schwerwiegende Nebenwirkungen der Stammzelltransplantation wie die GvHD besser absehen und behandeln zu können.

8 Summary

Malignant tumors and leukemia remain the second most common cause of death after accidents in childhood. Allogeneic stem cell transplantation plays a central role in the therapy of these diseases. Despite improved therapy options, success is limited by side effects such as e.g. the graft versus host disease. The graft versus host disease is a result of the transmission of immunocompetent T lymphocytes in the transplant, which recognize the antigen structures of healthy tissues of the recipient as foreign.

T-cells are activated and can proliferate by the antigenic contact with the recipient tissue and an immunological attack on healthy tissue occurs. Yet, the exact pathogenesis of the formation of a chronic GvHD remains unclear.

Pro and anti-inflammatory cytokines play a key role in the complex mechanisms of action of the immune system. Since their production profile affects many infectious, autoimmune or tumor diseases as well as their progression, it is assumed that this has, in addition to clinical factors, also an influence on the formation of a GvHD. Genetically determined cytokine polymorphisms are associated with different modes of action. Therefore we investigated whether and in what form there are correlations with the occurrence of certain cytokine polymorphisms and the occurrence and course of a graft-versus-host disease.

Within the scope of this work, 72 pediatric patients who received allogeneic stem cell transplantations were examined for the donor and recipient cytokine polymorphisms TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-6 and IFN- γ . These patients were routinely treated in the Children's Hospital of the University of Würzburg in the period from April 2013 to September 2014, or archived samples drawn upon. We analyzed the samples by means of DNA extraction, sequence-specific PCR and gel electrophoresis and investigated their influence on the development and course of malignant diseases as well as on the development of a GvHD.

In the course of this study, a significant difference in the distribution of IL-10 cytokine polymorphisms between children suffering from leukemia and a healthy cohort was found. For other malignant diseases, there was a difference in IL-10 and TGF- β cytokine polymorphisms.

Regarding the development of a GvHD, we could not find any correlations for the cytokines TGF- β , TNF- α and IFN- γ .

A GvHD generally could not be associated with specific cytokine polymorphisms. In contrast, there was a link between the incidence of cGvHD and the discrepancy between IL-10 and IL-6 polymorphisms between donor and recipient. The more differences of IL-6 occurred, the higher the degree of cGvHD.

In addition, a difference in IL-10 (and IL-6) polymorphisms had an effect on the formation of cGvHD and the number of organs affected. Here the correlations were negative. The lower the consistency of the cytokine polymorphisms between recipient and donor, the more frequently a cGvHD occurred as well as an infestation of several localizations.

Although the cytokines must be viewed in a complex mechanism, this work confirms that certain pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines and their expression rate seem to have an influence on the development and course of GvHD. The investigated cytokines are partly multifunctional and do not act purely pro or anti-inflammatory. Their mode of action might be different depending on the immunological mechanisms activated in the particular case.

Therefore, it is useful to study the complex mechanisms of action of the individual cytokines regarding to their genetically determined expression rate in order to be able to better understand and treat serious side effects of stem cell transplantation such as the GvHD.

9 Anhang

Es wurden keine Daten angehängt.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Immunpathophysiologie der GvHD: [11]	25
Abbildung 2: Darstellung eines schematischen Bandenmusters zur Gelauswertung.	38
Abbildung 3: Bandenkonstellation der TNF- α Polymorphismen.	39
Abbildung 4: Bandenkonstellation TNF- α	40
Abbildung 5: Auswertung von TNF- α	40
Abbildung 6: Bandenkonstellation von TGF- β 1:	41
Abbildung 7: Auswertung von TGF- β 1.....	42
Abbildung 8: Bandenkonstellation von IL-10	43
Abbildung 9: Auswertung von IL-10.....	44
Abbildung 10: Bandenkonstellation von IL-6.	45
Abbildung 11: Auswertung von IL-6.....	45
Abbildung 12: Bandenkonstellation von IFN- γ	46
Abbildung 13: Auswertung von IFN- γ	47
Abbildung 14: Rezidiv-Freiheitsrate nach SZT.	58
Abbildung 15: Überleben nach allogener Stammzell-Transplantation (SZT).....	59
Abbildung 16: Überlebensrate nach SZT.....	60
Abbildung 17: GvHD und IL-10 (2)-Diskrepanzen.	70
Abbildung 18: Zahl der cGvHD-Lokalisationen bei IL-10 (2) der Patienten und Spender.	71

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregrad der einzelnen Organe zur Bestimmung einer aGvHD.	15
Tabelle 2: Einteilung des Gesamtschweregrades einer aGvHD:.....	15
Tabelle 3: Einteilung der Schweregrade der cGvHD.	17
Tabelle 4: Geräte.	28
Fortsetzung Tabelle 4: Geräte.	29
Tabelle 5: Laborzubehör.....	29
Tabelle 6: Chemikalien und sonstige Reagenzien, Bezeichnungen nach Herstellerangaben.	34
Tabelle 7: Pipettierschema der Primer.	34
Tabelle 8: Primersequenzen [36].....	35
Fortsetzung Tabelle 8: Primersequenzen.[36].....	36
Tabelle 9: Patientencharakteristika allgemein.	51

Fortsetzung Tabelle 9: Patientencharakteristika allgemein: Die Grafik beschreibt die allgemeinen Patientencharakteristika.	52
Tabelle 10: Entstehung einer GvHD:	53
Tabelle 11: Durchführung der GvHD Prophylaxe.	54
Tabelle 12: HLA und die Lokalisation der GvHD sowie Prophylaxe.	55
Tabelle 13: Graftmanipulation und Ausgangsstatus.	57
Tabelle 14: Bildung der Möglichkeiten der Zytokinpolymorphismen für TGF- β	61
Tabelle 15: Verteilung der Zytokinpolymorphismen allgemein.	62
Fortsetzung Tabelle 15: Verteilung der Zytokinpolymorphismen allgemein.	63
Fortsetzung Tabelle 15: Verteilung der Zytokinpolymorphismen allgemein.	64
Tabelle 16: Unterschiede der Zytokinpolymorphismen zwischen Empfänger und Spender.	68
Tabelle 17: GvHD und Zytokin-Diskrepanz der signifikanten Polymorphismen (IL-10 und IL-6) zwischen Patienten und Spendern.	70

12 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P., et al. *Annual Report 2016 German Childhood Cancer Registry GCCR*. 2016 [cited 2017 14.02.]; Available from: http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/22605/0/17aa97a18ea4a834424f1eb1a46e6ada9829b582/jb2016_s.pdf.
2. Gutjahr, P., *Tumorgenetik*, in *Krebs bei Kindern und Jugendlichen: Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie*. 2004, Gutjahr, Peter. p. 10-14.
3. Creutzig, U., et al., *Krebserkrankungen bei Kindern*. Deutsches Ärzteblatt, 2003(13).
4. Dr. Speer, C.D.G., M., *Pädiatrie*. Vol. 3. 2000. 663.
5. Vowels, M.R., et al., *Searches for matched and closely matched related and unrelated bone marrow donors undertaken in a single paediatric unit*. J Paediatr Child Health, 1992. **28**(5): p. 379-82.
6. Schwab, L., et al., *Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage*. Nat Med, 2014. **20**(6): p. 648-54.
7. van Bekkum, D.W., M.J. de Vries, and D. van der Waay, *Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras*. J Natl Cancer Inst, 1967. **38**(2): p. 223-31.
8. Billingham, R.E., *The biology of graft-versus-host reactions*. Harvey Lect, 1966. **62**: p. 21-78.
9. Korngold, R. and J. Sprent, *T cell subsets and graft-versus-host disease*. Transplantation, 1987. **44**(3): p. 335-9.

10. Kernan, N.A., et al., *Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease*. *Blood*, 1986. **68**(3): p. 770-3.
11. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. *Lancet*, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
12. Deeg, H.J. and P.J. Henslee-Downey, *Management of acute graft-versus-host disease*. *Bone Marrow Transplant*, 1990. **6**(1): p. 1-8.
13. Martino, R., et al., *Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation*. *International Bone Marrow Transplant Registry*. *Bone Marrow Transplant*, 1999. **24**(3): p. 283-7.
14. Glucksberg, H., et al., *Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors*. *Transplantation*, 1974. **18**(4): p. 295-304.
15. Sullivan, K.M., et al., *Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression*. *Blood*, 1981. **57**(2): p. 267-76.
16. Ferrara, J.L. and H.J. Deeg, *Graft-versus-host disease*. *N Engl J Med*, 1991. **324**(10): p. 667-74.
17. Shulman, H.M., et al., *Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients*. *Am J Med*, 1980. **69**(2): p. 204-17.
18. Ringden, O., et al., *Strong antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease in allogeneic marrow transplant recipients having acute leukemia treated with methotrexate and cyclosporine*. *The Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)*. *Transplant Proc*, 1997. **29**(1-2): p. 733-4.
19. Murphy, K.M., P. Travers, and M. Walport, in *Janeway Immunologie*. 2014, Springer Spektrum.
20. Dickinson, A.M., et al., *Cytokine involvement in predicting clinical graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients*. *Bone Marrow Transplant*, 1994. **13**(1): p. 65-70.
21. Krenger, W. and J.L. Ferrara, *Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm*. *Immunol Res*, 1996. **15**(1): p. 50-73.
22. Holler, E., et al., *Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation*. *Blood*, 1990. **75**(4): p. 1011-6.
23. Remberger, M., O. Ringden, and L. Markling, *TNF alpha levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop acute GVHD*. *Bone Marrow Transplant*, 1995. **15**(1): p. 99-104.
24. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
25. Seder, R.A. and G.G. Le Gros, *The functional role of CD8+ T helper type 2 cells*. *J Exp Med*, 1995. **181**(1): p. 5-7.

26. Jacobsohn, D.A. and G.B. Vogelsang, *Acute graft versus host disease*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 35.
27. Baker, M.B., et al., *The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2645-56.
28. Braun, M.Y., et al., *Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 657-61.
29. Ferrara, J., et al., *Cutaneous acute graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens in a murine model: histologic analysis and correlation to clinical disease*. J Invest Dermatol, 1986. **86**(4): p. 371-5.
30. Schobersberger, W., et al., *Induction of inducible nitric oxide synthase expression by neopterin in vascular smooth muscle cells*. FEBS Lett, 1995. **377**(3): p. 461-4.
31. Antin, J.H. and J.L. Ferrara, *Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease*. Blood, 1992. **80**(12): p. 2964-8.
32. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
33. Shaffer, A.L., W. Wojnar, and W. Nelson, *Amplification, detection, and automated sequencing of gibbon interleukin-2 mRNA by Thermus aquaticus DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction*. Anal Biochem, 1990. **190**(2): p. 292-6.
34. Jones, M.D., *Reverse transcription of mRNA by Thermus aquaticus DNA polymerase followed by polymerase chain reaction amplification*. Methods Enzymol, 1993. **218**: p. 413-9.
35. Horn, F.M., I.; Schneider, N.; Grillhösl, C.; Berghold, S.; Lindenmeier, G., *Biochemie des Menschen*. Vol. 3. 2002,2005: Georg Thieme Verlag KG.
36. Perrey, C., et al., *ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms*. Transpl Immunol, 1999. **7**(2): p. 127-8.
37. Adkins, S. and M. Burmeister, *Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations*. Anal Biochem, 1996. **240**(1): p. 17-23.
38. Vargas-Diez, E., et al., *Analysis of risk factors for acute cutaneous graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation*. Br J Dermatol, 2003. **148**(6): p. 1129-34.
39. Nash, R.A., et al., *Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate*. Blood, 1992. **80**(7): p. 1838-45.
40. Adams, K.M., et al., *Risk factors for syngeneic graft-versus-host disease after adult hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1894-7.
41. Atkinson, K., et al., *Female marrow donors increase the risk of acute graft-versus-host disease: effect of donor age and parity and analysis of cell subpopulations in the donor marrow inoculum*. Br J Haematol, 1986. **63**(2): p. 231-9.

42. Bacigalupo, A., et al., *Multivariate analysis of risk factors for survival and relapse in chronic granulocytic leukemia following allogeneic marrow transplantation: impact of disease related variables (Sokal score)*. Bone Marrow Transplant, 1993. **12**(5): p. 443-8.
43. Gale, R.P., et al., *Risk factors for acute graft-versus-host disease*. Br J Haematol, 1987. **67**(4): p. 397-406.
44. Krenger, W., et al., *Transplantation of polarized type 2 donor T cells reduces mortality caused by experimental graft-versus-host disease*. Transplantation, 1996. **62**(9): p. 1278-85.
45. Kebelmann-Betzing, C., et al., *Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all*. Cytokine, 2001. **13**(1): p. 39-50.
46. Amirzargar, A., et al., *TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients*. Transplant Proc, 2005. **37**(7): p. 2985-7.
47. Dickinson, A.M., et al., *Demonstration of direct involvement of cytokines in graft-versus-host reactions using an in vitro human skin explant model*. Bone Marrow Transplant, 1991. **7**(3): p. 209-16.
48. Holler, E., et al., *Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2000. **25**(3): p. 237-41.
49. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
50. Sankaran, D., et al., *Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation*. Kidney Int, 1999. **56**(1): p. 281-8.
51. Imamura, M., et al., *Cytokines involved in graft-versus-host disease*. Hokkaido Igaku Zasshi, 1994. **69**(6): p. 1348-53.
52. Bachman, K.E. and B.H. Park, *Dual nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter*. Curr Opin Oncol, 2005. **17**(1): p. 49-54.
53. Dai, L., et al., *A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF-beta and receptor genes*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(7): p. 819-23.
54. Leffell, M.S., et al., *Association between TGF-beta expression and severe GVHD in allogeneic bone marrow transplantation*. Transplant Proc, 2001. **33**(1-2): p. 485-6.
55. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
56. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
57. Oldford, S.A., et al., *Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients*. Int Immunol, 2006. **18**(11): p. 1591-602.
58. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.

59. Mi, Y.Y., et al., *Interferon gamma +874 T/A polymorphism contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis based on 17 case-control studies*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(7): p. 4461-7.
60. Ge, Y.Z., et al., *Lack of association between interferon gamma +874 T/A polymorphism and cancer risk: an updated meta-analysis*. Tumour Biol, 2014. **35**(7): p. 6405-14.
61. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
62. Berek, J.S., et al., *Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(4): p. 1038-42; discussion 1042-3.
63. Zhang, G.J. and I. Adachi, *Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma*. Anticancer Res, 1999. **19**(2B): p. 1427-32.
64. Belluco, C., et al., *Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(2): p. 133-8.
65. Dennis, K.L., et al., *Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(6): p. 637-45.
66. Blazar, B.R., et al., *Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow grafts*. Blood, 1995. **85**(3): p. 842-51.
67. Rowe, V., et al., *Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 2006. **108**(7): p. 2485-92.
68. Lin, M.T., et al., *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): p. 2201-10.
69. Hempel, L., et al., *High interleukin-10 serum levels are associated with fatal outcome in patients after bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1997. **20**(5): p. 365-8.
70. Kim, D.H., et al., *IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. Transplantation, 2005. **79**(11): p. 1615-22.
71. Cavet, J., et al., *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): p. 3941-6.
72. Socie, G., et al., *Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Transplantation, 2001. **72**(4): p. 699-706.
73. Lin, M.T., et al., *Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation:*

- synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor beta genotype of donor.* Blood, 2005. **106**(12): p. 3995-4001.
74. Turner, D.M., et al., *An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter.* Eur J Immunogenet, 1997. **24**(1): p. 1-8.
 75. Kurreeman, F.A., et al., *Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level.* Hum Mol Genet, 2004. **13**(16): p. 1755-62.
 76. Levings, M.K., et al., *IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells.* J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5530-9.
 77. Visentainer, J.E., et al., *Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation.* Exp Hematol, 2003. **31**(11): p. 1044-50.
 78. Keen, L.J., et al., *Interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha region haplotypes predict transplant-related mortality after unrelated donor stem cell transplantation.* Blood, 2004. **103**(9): p. 3599-602.
 79. Middleton, P.G., et al., *Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants.* Blood, 1998. **92**(10): p. 3943-8.
 80. Ambruzova, Z., et al., *Association of IL6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(4): p. 227-35.
 81. Hattori, H., et al., *Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2002. **30**(10): p. 665-71.
 82. Goyal, R.K., et al., *Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms are associated with severity of acute graft-versus-host disease following matched unrelated donor bone marrow transplantation in children: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study.* Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(7): p. 927-936 e1.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Professor Dr. Christian Speer angefertigt. Ich möchte mich für die Möglichkeit an seiner Klinik zu promovieren herzlich bedanken.

Zudem danke ich Professor Dr. Paul-Gerhardt Schlegel, der mir die Bereitstellung der technischen und materiellen Voraussetzungen für meine Arbeit ermöglicht und außerdem mit hilfreichen Anregungen und konstruktiver Kritik zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Verena Wiegering für die Unterstützung und Geduld während der Laborarbeit und der Erstellung dieser Arbeit. Ohne ihre vertrauensvolle Umgangsweise, stetige Hilfe und zahlreichen Vorarbeiten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Trotz der Herausforderungen des Klinikalltags konnte ich mich mit meinen Fragen und Anliegen jederzeit an sie wenden.

Weiterhin möchte ich mich bei der medizinisch-technischen Assistentin Frau Barbara Bünning für ihre Unterstützung bei den praktischen Arbeiten in der experimentellen Phase bedanken.

Frau Dr. Imme Haubitz danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit stets unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und haben. Ich danke meiner Familie für ihr fortwährendes Verständnis und emotionalen Rückhalt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Einfluss der Zytokingenpolymorphismen bei allogenen transplantierten Kindern auf das Vorliegen einer Graft-versus-Host-Disease“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 27.03.2018

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Influence of cytokine polymorphisms in allogeneic transplanted children on the presence of graft-versus-host disease" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, March 27th, 2018