

Aus der Klinik für Innere Medizin 1  
Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Einfluss des Killer-Cell Immunoglobulin-like Rezeptor 2DS1 (KIR2DS1)- und HLA-C-Status  
auf das Therapieansprechen von aggressiven B-Zell-Lymphomen – Post-hoc-Analyse der  
UNFOLDER-Studie

Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes  
2026

vorgelegt von Nicholas Johannes Fuchs  
geb. am 16.06.1994 in Fürth

## Inhaltsverzeichnis

|   |               |
|---|---------------|
| <b>1. Zusammenfassung.....</b>                                    | <b>- 5 -</b>  |
| <b>Summary.....</b>   | <b>- 5 -</b>  |
| <b>2. Einleitung .....</b>  | <b>- 7 -</b>  |
| <b>2.1. Aggressives B-Zell Non-Hodgkin Lymphom.....</b>           | <b>- 7 -</b>  |
| 2.1.1. Definition.....  | - 7 -         |
| 2.1.2. Epidemiologie.....   | - 7 -         |
| 2.1.3. Stadieneinteilung.....                                     | - 8 -         |
| 2.1.4. Risikofaktoren.....  | - 9 -         |
| 2.1.5. Prognose.....  | - 10 -        |
| <b>2.2. Immunchemotherapie .....</b>                              | <b>- 11 -</b> |
| 2.2.1. CHOP-Chemotherapie .....                                   | - 11 -        |
| 2.2.1.1. Cyclophosphamid.....                                     | - 11 -        |
| 2.2.1.2. Doxorubicin .....  | - 11 -        |
| 2.2.1.3. Vincristin .....   | - 11 -        |
| 2.2.1.4. Prednison .....  | - 11 -        |
| 2.2.2. Immuntherapie mit Rituximab .....                          | - 12 -        |
| 2.2.2.1. Der B-Zell-Oberflächenmarker CD20.....                   | - 12 -        |
| 2.2.2.2. Struktur des B-Zell Oberflächenmarkers CD20 .....        | - 12 -        |
| 2.2.2.3. Rituximab .....  | - 13 -        |
| 2.2.2.4. Antikörper-anhängige zellvermittelte Zytotoxizität ..... | - 14 -        |
| 2.2.2.5. Komplement-abhängige Zytotoxizität.....                  | - 14 -        |
| 2.2.2.6. Indirekte Toxizität .....                                | - 15 -        |
| 2.2.2.7. Antikörper-abhängige zellvermittelte Phagozytose.....    | - 15 -        |
| <b>2.3. NK-Zellen .....</b>                                       | <b>- 16 -</b> |
| 2.3.1 Fc-Gamma-Rezeptor (FcγR) .....                              | - 16 -        |
| 2.3.1.1. Bedeutung von Fc-Gamma-Rezeptoren auf NK-Zellen .....    | - 16 -        |
| 2.3.2. Killing Mechanismen von NK-Zellen .....                    | - 16 -        |
| 2.3.2.1. Todesrezeptorliganden .....                              | - 17 -        |
| 2.3.2.2. Lytische Granula.....                                    | - 17 -        |
| 2.3.2.3. Interferon-γ .....                                       | - 17 -        |
| 2.3.3. NK-Zell-Rezeptoren.....                                    | - 18 -        |
| 2.3.4. Missing-self und NK-Zell-Toleranz .....                    | - 19 -        |
| <b>2.4. Killer-Cell Immunglobulin-like Rezeptoren .....</b>       | <b>- 20 -</b> |

# INHALTSVERZEICHNIS

---

|   |             |
|---|-------------|
| <b>2.5. Klinische Bedeutung des KIR-Status in der Onkologie</b> .....   | <b>22</b> - |
| <b>2.6. Hypothese aus RICOVER-60 und CLL8</b> .....   | <b>22</b> - |
| <b>2.7. Fragestellung</b> .....   | <b>23</b> - |
| <b>3. Material und Methoden</b> .....   | <b>24</b> - |
| <b>3.1. Material und Laborgeräte</b> .....  | <b>24</b> - |
| 3.1.1. Primer .....   | 25 -        |
| <b>3.2. Klinische Therapiestudie UNFOLDER</b> .....   | <b>26</b> - |
| 3.2.1. Fragestellung der UNFOLDER-Therapiestudie .....  | 26 -        |
| 3.2.2. Patientenkollektiv und Studiendesign .....   | 27 -        |
| 3.2.3. Studiendesign .....  | 27 -        |
| 3.2.4. Vorphase-Therapie und Chemotherapie .....  | 28 -        |
| 3.2.5. Immuntherapie mit Rituximab .....  | 29 -        |
| 3.2.6. Konsolidierende Strahlentherapie.....  | 30 -        |
| 3.2.7. Intervention der Studie im Verlauf.....  | 30 -        |
| 3.2.8. Patientenkollektiv und Probenasservierung.....   | 31 -        |
| 3.2.9. Genehmigungen .....  | 31 -        |
| <b>3.3. Methoden</b> .....  | <b>32</b> - |
| 3.3.1. DNS-Isolation .....  | 32 -        |
| 3.3.2. Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration .....  | 33 -        |
| 3.3.3. Real-time-PCR zur Bestimmung des KIR-Genotyps .....  | 33 -        |
| 3.3.3.1. Erstellung Masterplatte.....   | 33 -        |
| 3.3.3.2. Mastermix .....  | 34 -        |
| 3.3.3.3. Erstellung Primermix .....   | 34 -        |
| 3.3.3.4. PCR-Platte .....   | 34 -        |
| 3.3.3.5. PCR-Protokoll .....  | 35 -        |
| 3.3.3.6. Schmelzpunktbestimmung.....  | 36 -        |
| 3.3.3.7. Sequenzspezifische Fluoreszenzsonden.....  | 37 -        |
| 3.3.4. SNP-Assay zur Bestimmung des HLA-C Status .....  | 37 -        |
| 3.3.4.1. PCR-Reaktionsbedingungen .....   | 38 -        |
| <b>3.4. Statistische Auswertung</b> .....   | <b>39</b> - |
| <b>4. Ergebnisse</b> .....  | <b>40</b> - |
| <b>4.1. Ergebnisse der UNFOLDER-Therapiestudie</b> .....  | <b>40</b> - |
| <b>4.2. Baseline-Charakteristika aller Patientinnen und Patienten der UNFOLDER-Studie und Charakteristika der untersuchten Population</b> ..... | <b>41</b> - |

|   |               |
|---|---------------|
| <b>4.3. Durchgeführte Therapie im UNFOLDER- und untersuchten Kollektiv .....</b>                  | <b>- 42 -</b> |
| <b>4.4. Verteilung von KIR2DS1 und HLA-C .....</b>  | <b>- 44 -</b> |
| 4.4.1 Assoziationen der Baseline-Charakteristika mit KIR2DS1 und HLA-C2/C2 .....                  | - 44 -        |
| 4.4.2. PMBCL-Subgruppe und Verteilung von KIR2DS1 und HLA-C .....                                 | - 45 -        |
| <b>4.5. Outcome-Assoziationen .....</b>   | <b>- 48 -</b> |
| 4.5.1. KIR2DS1 .....  | - 48 -        |
| 4.5.2. HLA-C .....  | - 48 -        |
| 4.5.3. KIR2DS1/HLA-C .....  | - 49 -        |
| 4.5.4. PMBCL-Subgruppe .....  | - 53 -        |
| 4.5.5. Subgruppenanalyse von Patientinnen und Patienten ohne Randomisierung zur Bestrahlung ..... | - 62 -        |
| <b>5. Diskussion .....</b>  | <b>- 66 -</b> |
| <b>6. Anhang .....</b>  | <b>- 70 -</b> |
| <b>6.1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>- 70 -</b> |
| <b>6.2. Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>- 72 -</b> |
| <b>6.3. Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>- 73 -</b> |
| <b>6.4. Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>- 75 -</b> |
| <b>6.5. Danksagung .....</b>  | <b>- 82 -</b> |
| <b>7. Lebenslauf .....</b>  | <b>- 83 -</b> |

## 1. Zusammenfassung

Non-Hodgkin-Lymphome gehören zu den häufig vorkommenden Tumorerkrankungen des lymphatischen Systems. Eine Hauptentität stellen hierbei die aggressiven B-Zell-Lymphome dar. Trotz intensiver Forschung werden aggressive B-Zell-Lymphome seit Jahren mit einer Immunchemotherapie, bestehend aus Rituximab, einem monoklonalen CD20-Antikörper, und CHOP (Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin und Prednison) bzw. R-Pola-CHP (Rituximab, Polatuzumab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin und Prednison) behandelt. Eine Bestrahlung wird in Abhängigkeit des Initialbefalls und der metabolischen Verlaufsuntersuchungen angeschlossen. Obwohl ein kurativer Therapieansatz besteht, entwickeln viele Patientinnen und Patienten, vor allem in höheren Krankheitsstadien, ein Rezidiv.

Die Wirkung von monoklonalen Antikörpern, und insbesondere von Rituximab, wird u.a. durch die Aktivierung von natürlichen Killer (NK)-Zellen erreicht, was als antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) bezeichnet wird. Killer-Cell Immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR) sind ein polymorphes, NK-Zell-spezifisches Rezeptorsystem, mit dem NK-Zellen eine veränderte Expression der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle der Klasse I körpereigener Zellen erkennen (sog. Missing-self Principle). So beeinflussen KIR- und humane Leukozytenantigen (HLA)- spezifische Interaktionen maßgeblich die NK-Zell-Effektorfunktion (sog. NK-Zell-Toleranz). Vorausgehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe weisen auf einen Einfluss des KIR2DS1/HLA-C-Genotyps auf die individuelle Wirksamkeit einer Rituximabtherapie hin. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die am RICOVER-60- und CLL8-Kollektiv abgeleiteten Hypothesen, dass KIR/HLA-Interaktionen einen unabhängigen Risikofaktor für das Überleben darstellen und Einfluss auf die individuelle Wirksamkeit einer Rituximab-Therapie nehmen, am UNFOLDER-Kollektiv zu überprüfen.

In der UNFOLDER-Therapiestudie wurden 700 Patientinnen und Patienten im Alter von 18 bis 60 Jahren mit nicht vorbehandeltem aggressiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom mit altersadjustiertem Internationalen Prognostischem Index (aaPI) 0 und Lymphknotenkonglomerat >7,5 cm (Bulk) oder aaPI 1 in einem 2x2-armigen Design zu sechsmal R-CHOP-14 bzw. sechsmal R-CHOP-21 und anschließender Bestrahlung bzw. keiner Bestrahlung randomisiert.

Aus Blutproben von 414 Teilnehmenden der UNFOLDER-Studie wurden der KIR2DS1- und HLA-C-Status bestimmt und mit den klinischen Endpunkten der Studie (Event-free Survival, Progression-free Survival und Overall Survival) korreliert.

In der vorliegenden Post-hoc-Analyse des UNFOLDER-Kollektivs konnten im gesamten Studienkollektiv, anders als in RICOVER-60 und CLL8, keine signifikanten Outcome-Assoziationen des KIR2DS1-, des HLA-C- und des kombinierten KIR2DS1/HLA-C2/C2-Status gefunden werden. Der in der RICOVER-60- und CLL8-Studie als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf Rituximab identifizierte KIR2DS1/HLA-C2/C2-Status war für das UNFOLDER-Kollektiv lediglich nicht signifikant mit einem kürzeren ereignisfreien Überleben (EFS) assoziiert (Hazard Ratio (HR): 1.3; 95 %-Konfidenzintervall (CI): 0.64–2.76).

In der Subgruppe von Patientinnen und Patienten ohne Bestrahlungsindikation hingegen (n = 131), zeigten HLA-C2-homozygote Patientinnen und Patienten gegenüber jenen mit HLA-C1/C1 oder HLA-C1/C2, wie in RICOVER-60 und CLL8, ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben (PFS) ( $p = 0.045$ ). Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Studien und legt nahe, dass der Einfluss einzelner KIR/HLA-Konstellationen möglicherweise nur in spezifischen klinischen Kontexten detektierbar ist. Analysen der PMBCL-Subgruppe ergaben darüber hinaus Hinweise auf eine potenzielle prognostische Relevanz des KIR2DS1-Status, wobei diese Ergebnisse aufgrund sehr geringer Fallzahlen mit entsprechender Zurückhaltung zu interpretieren sind.

Trotz vorhandener Trends lässt sich die Hypothese einer KIR2DS1/HLA-C-abhängigen Modulation der Rituximab-Wirksamkeit anhand der vorliegenden Daten weder bestätigen noch ausschließen.

Womöglich ist der Nutzen einer Rituximab-Therapie in limitierten Krankheitsstadien zu gering, um anhand von Events statistisch signifikante Unterschiede in der jeweiligen Wirksamkeit von einzelnen Therapiebestandteilen festzustellen. Die Ergebnisse unterstreichen jedoch die Notwendigkeit, weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven mit höheren Event-Raten durchzuführen, um die Hypothese einer KIR2DS1/HLA-C-bedingten Wirksamkeit von Rituximab zu überprüfen.

## Summary

B-cell lymphoma rank among the most common tumor entities. Aggressive B-cell lymphoma represents a main entity. Despite intensive research aggressive B-cell lymphomas are currently still treated with immunochemotherapy consisting of the anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab and the chemotherapy regimen CHOP (Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisone) or R-Pola-CHP (Rituximab, Polatuzumab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin und Prednison). Depending on initial tumor stage and metabolic follow-up assessments, immunochemotherapy is followed by radiotherapy. Although a curative approach exists, many patients show recurrence particularly in advanced stages of disease.

The effect of monoclonal antibodies like Rituximab is carried out in part by the activation of natural killer (NK)-cells, which is known as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) represent a subset of polymorphic, NK-cell-specific receptors. Via KIRs, NK-cells may detect an altered class I major histocompatibility complex (MHC-I)-expression on endogenous cells in a process called missing-self principle. Particular KIR- and human leucocyte antigen (HLA)- specific interactions can fundamentally change the effector function of NK-cells (NK-cell tolerance). Previous investigations of our research group suggest an impact of specific KIR/HLA-genotypes, in particular KIR2DS1 and HLA-C, on the efficacy of Rituximab-therapy. The aim of this thesis is to review the hypotheses derived from the RICOVER-60- and CLL8-trials, namely that KIR/HLA-interactions constitute an independent risk factor for survival and influence the individual efficacy of Rituximab therapy, by a post-hoc analysis of the UNFOLDER-trial.

In the UNFOLDER-trial, 700 younger patients (18-60 years) with previously untreated aggressive B-cell lymphoma and age adjusted International Prognostic Index (aaIPI) 0 with bulk (tumor mass > 7,5 cm) or aaIPI of 1 were randomly assigned in a 2x2-factorial design to receive six cycles of R-CHOP-14 or R-CHOP-21 with or without consecutive radiotherapy.

The KIR2DS1- und HLA-C-status were determined from blood samples of 414 participants of the UNFOLDER-trial and correlated with the clinical endpoints of the trial (event-free survival, progression-free survival, and overall survival).

## SUMMARY

---

In the present post hoc analysis of the UNFOLDER cohort, no significant associations between outcome and KIR2DS1 status, HLA-C status, or the combined KIR2DS1/HLA-C2/C2 status were observed in the overall study population, in contrast to the findings reported in the RICOVER-60 and CLL8 studies. The KIR2DS1/HLA-C2/C2 status, which had been identified as a predictive marker for response to rituximab in the RICOVER-60 and CLL8 trials, was only non-significantly associated with shorter event-free survival (EFS) in the UNFOLDER cohort (hazard ratio [HR], 1.3; 95% confidence interval [CI], 0.64–2.76).

In contrast, within the subgroup of patients without an indication for radiotherapy (n = 131), HLA-C2–homozygous patients exhibited a significantly shorter progression-free survival (PFS) compared with those carrying HLA-C1/C1 or HLA-C1/C2, consistent with observations from the RICOVER-60 and CLL8 trials (p = 0.045). This finding is in line with results from previous studies and suggests that the impact of specific KIR/HLA constellations may be detectable only in particular clinical contexts. Furthermore, analyses of the PMBCL subgroup provided indications of a potential prognostic relevance of KIR2DS1 status; however, these results should be interpreted with caution due to the very small sample size.

Despite the presence of observable trends, the hypothesis of a KIR2DS1/HLA-C–dependent modulation of rituximab efficacy can neither be confirmed nor rejected on the basis of the available data.

This may indicate that, in limited-stage disease, the overall benefit of rituximab therapy is too small to allow statistically significant differences in the efficacy of individual treatment components to be detected based on clinical events. Nevertheless, the results emphasize the need for further investigations in larger patient cohorts with higher event rates in order to adequately evaluate the hypothesis of KIR2DS1/HLA-C–mediated effects on rituximab efficacy.

## 2. Einleitung

### 2.1. Aggressives B-Zell Non-Hodgkin Lymphom

#### 2.1.1. Definition

Aggressive B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome bilden eine äußerst heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen, ausgehend von murenen Zellen der B-Zell-Reihe des lymphatischen Systems. Eingeteilt werden B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome nach der World Health Organization (WHO)-Klassifikation [68]. Unbehandelt sind sie häufig durch einen raschen Progress der Erkrankung tödlich. Bei zeitnaher Therapieeinleitung stehen allerdings in der Regel kurativ intendierte Behandlungsoptionen zur Verfügung [63].

#### 2.1.2. Epidemiologie

Rund 95 % der systemischen Lymphome entstehen aus B-Zellen, da diese während der Keimzentrumsreaktion durch somatische Hypermutation und Klassenwechsel-Rekombination intensiven und mutagenen genetischen Umbauprozessen ausgesetzt sind, die bei T-Zellen nicht stattfinden. Das folliculäre Lymphom und das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) machen dabei einen Anteil von über 60 % aller Lymphome aus [68].

Von der für das Jahr 2019 prognostizierten Inzidenz von 1.762.450 Krebserkrankungen in den USA entfallen 74.200 auf Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Mit einem Anteil von 19.970 Todesfällen stellen Patientinnen und Patienten mit NHL einen erheblichen Anteil (3,3 %) an der Gesamtheit aller Krebstoten von 606.880 im gleichen Zeitraum und gleicher Population dar [52]. Die lebenslange Wahrscheinlichkeit an einem NHL zu erkranken, liegt 2019 in den USA für Männer bei 2,4 %, für Frauen bei 1,9 %. NHL bilden dort bei Frauen und bei Männern die siebthäufigste Entität aller für 2019 geschätzten Neuerkrankungen an malignen Neoplasien [64].

### 2.1.3. Stadieneinteilung

B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome werden nach Ann-Arbor in vier Krankheitsstadien klassifiziert (siehe Tabelle 1) [10]. Unterschieden wird zwischen einem primär nodalen und einem primär extranodalen Befall. Jedes Stadium erhält den Zusatz A bei komplettem Fehlen, bzw. den Zusatz B bei Vorhandensein von mindestens einem der folgenden drei Symptome: 1. unerklärbarer Gewichtsverlust >10 % des Körpergewichts in den letzten 6 Monaten, 2. nicht erklärbares Fieber >38 °C, 3. nicht erklärbarer Nachtschweiß mit notwendigem Wäschewechsel [10].

Neben der Anamnese, den beiden Performance-Status Karnowsky-Index und dem Index der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG-Status) sowie der körperlichen Untersuchung von lymphatischen Organen, wie Lymphknoten, Tonsillen und Milz, wird zur Diagnostik eine computertomographische (CT)-Untersuchung der Halsregion, des Thorax und des Abdomens durchgeführt [20,38]. Meist handelt es sich dabei um ein CT in Kombination mit einer Positronenemissionstomographie mit dem Tracer Fluordesoxyglukose (FDG-PET/CT). Alternativ gibt es zudem die Ganzkörper-Magnetresonanztomographie (MRT) als geeignetes bildgebendes Verfahren [22]. Ergänzend dienen die Knochenmarkszytologie und Lymphknotenexstirpation der histologischen Diagnosesicherung. Bei der Durchführung eines FDG-PET/CT kann jedoch häufig auf eine Punktion des Knochenmarks verzichtet werden [22].

**Tabelle 1: Modifizierte Darstellung der Ann-Arbor-Klassifikation**

| Stadien      | Definition  |
|--------------|---|
| <b>I/n</b>   | Befall einer einzelnen Lymphknotenregion  |
| <b>I/E</b>   | lokalisierter Befall eines einzelnen extralymphatischen Organs  |
| <b>II/n</b>  | Befall von 2 oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells  |
| <b>II/E</b>  | Vorliegen eines einzelnen extranodalen Herdes und Befall von $\geq 1$ Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells |
| <b>III/n</b> | Befall von $\geq 2$ Lymphknotenregionen beidseits des Zwerchfells   |
| <b>III/E</b> | Vorliegen eines Befalls extranodaler Herde und Lymphknoten beidseits des Zwerchfells                                      |
| <b>IV</b>    | disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit/ohne zusätzlichen Befall von Lymphknoten          |

Als Lymphknotenregionen sind zervikale, axilläre, inguinale und mediastinale Lymphknoten sowie Milz, Thymus und Waldeyerscher Rachenring als lymphatisches Gewebe definiert. Das Stadium III wird zusätzlich in Stadium III<sub>1</sub> und Stadium III<sub>2</sub> unterteilt. III<sub>1</sub> beschreibt den Befall der Milz, portaler- und zöliakaler Lymphknoten. III<sub>2</sub> den Befall von paraaortalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten, jeweils allein oder zusammen [34].

#### 2.1.4. Risikofaktoren

Die Ann-Arbor-Klassifikation eignet sich allein nicht zur Prognoseeinschätzung. Hier hat sich stattdessen der International Prognostic Index (IPI) (siehe Tabelle 3) als deutlich genauerer Prädiktor etabliert. Die fünf prognostisch relevanten Parameter des IPI sind: 1. Alter >60 Jahre, 2. Ann-Arbor-Stadium III oder IV, 3. schlechter Allgemeinzustand (ECOG 2–4) (siehe Tabelle 2), 4. >1 extranodaler Befall und 5. eine über dem oberen Grenzwert der jeweiligen Laboratorien erhöhte Lactatdehydrogenase (LDH) [47,63]. Seit der Einführung des IPI gab es zahlreiche Vorschläge zur weiteren Optimierung der Prognoseeinschätzung durch Indizes wie den Revised (R)-IPI, oder den National Comprehensive Cancer Network (NCCN)-IPI. Bislang hat der IPI jedoch weiterhin seinen Stellenwert behalten [55].

Da Patientinnen und Patienten, die 60 Jahre oder jünger sind, ein signifikant besseres Outcome haben, wird für diese der altersadjustierte IPI verwendet (aalPI) (siehe Tabelle 3). In dieser Kohorte haben sich das Tumorstadium, der LDH-Wert sowie der ECOG-Status als signifikante, unabhängige prognostische Faktoren herausgestellt [63].

Die Definition eines Bulk-Befunds bei Non-Hodgkin-Lymphomen ist uneinheitlich und schwankt leicht, je nach Studiengruppe. Die Deutsche Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (DSHNHL), welcher auch die UNFOLDER-Studie zugeordnet ist, definiert einen Bulk als Tumormasse  $\geq 7,5$  cm [79]. Die Definition der MinT-Studie beschreibt einen Bulk-Befund hingegen als Tumormasse (einzelne Lymphknoten oder Lymphknotenkonglomerate) mit einem Maximalen-Tumor-Durchmesser (MTD)  $\geq 10$  cm [50]. Andere Studienprotokolle definieren einen Bulk bereits ab einem MTD  $\geq 5$  cm [50]. Eine explorative Analyse der MinT-Studie deutet auf einen linearen prognostischen Effekt des MTDs hin und empfiehlt einen Grenzwert zwischen 5 und 10 cm [50].

**Tabelle 2: Der Performance Score der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)**

| <b>ECOG<br/>Score</b> | <b>Performance Status</b>  |
|-----------------------|--|
| <b>0</b>              | normale, uneingeschränkte Aktivität  |
| <b>1</b>              | eingeschränkt bei starker körperlicher Belastung, Arbeitsfähigkeit gegeben     |
| <b>2</b>              | selbstversorgend, >50 % der Wachzeit stehfähig, Arbeitsfähigkeit nicht gegeben |
| <b>3</b>              | begrenzte Selbstversorgung; >50 % der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden     |
| <b>4</b>              | voll pflegebedürftig, keine Selbstversorgung möglich                           |
| <b>5</b>              | Tod  |

Nach Oken et al. [47] zur Ergänzung des Karnofsky-Index [24].

Tabelle 3: Der Internationale Prognostische Index (IPI, aalPI)

| IPI            |            | aalPI          |            |
|----------------|------------|----------------|------------|
| Risiko         | IPI Faktor | Risiko         | IPI Faktor |
| gering         | 0–1        | gering         | 0          |
| niedrig–mittel | 2          | niedrig–mittel | 1          |
| hoch–mittel    | 3          | hoch–mittel    | 2          |
| hoch           | 4–5        | hoch           | 3          |

Der IPI wird durch folgende Kriterien bestimmt: 1. Alter >60 Jahre, 2. >1 extranodaler Befall, 3. Ann Arbor-Stadium III + IV, 4. ECOG  $\geq$ 2,5, erhöhte LDH. Die Kriterien 1. und 2. finden im aalPI keine Anwendung [63].

### 2.1.5. Prognose

Unbehandelt führen aggressive B-Zell-Lymphome meist rasch zum Tod der Patientinnen und Patienten. Martelli et al. vergleichen in ihrer Arbeit verschiedene Phase-III-Therapiestudien des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) zum Einsatz der Immunchemotherapie R-CHOP (siehe Tabelle 4) [39]. Über alle Altersklassen und IPI-Scores hinweg lag die Häufigkeit der kompletten Remissionen (CR) zwischen 76 % und 86 %, das dreijährige progressionsfreie Überleben (Progression Free Survival, PFS) bei 52–85 % und das dreijährige Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) bei 67–93 %.

Als einen Grund für die hohe Varianz der Ergebnisse lassen sich die unterschiedlichen Alterskohorten und Prognosestadien der Patientinnen und Patienten in den jeweiligen Studien vermuten. Histologische Subgruppen, wie zum Beispiel das primär mediastinale großzellige B-Zell-Lymphom (PMBCL), welches gehäuft bei jungen Frauen auftritt, sowie der molekulare Subtyp haben einen großen prognostischen Einfluss [59].

Tabelle 4: Prognose des DLBCL in verschiedenen Studien

|                            | MINT      | RICOVER-60    |               | ECOG-4494     |
|----------------------------|-----------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Studientherapie</b>     | CHOP-like | 6 x R-CHOP-14 | 8 x R-CHOP-14 | 8 x R-CHOP-21 |
| <b>IPI bzw. aalPI</b>      | 0–1       | 1–5           |               | 0– 5          |
| <b>Alter (Jahre)</b>       | $\leq$ 60 | 61– 80        |               | >60           |
| <b>Anzahl Teilnehmende</b> | 413       | 306           | 304           | 318           |
| <b>CR</b>                  | 86 %      | 78 %          | 76 %          | 77 %          |
| <b>3-Jahres PFS</b>        | 85 %      | 73,4 %        | 68,8 %        | 52 %          |
| <b>3-Jahres OS</b>         | 93 %      | 78,1 %        | 72,5 %        | 67 %          |

## 2.2. Immunchemotherapie

### 2.2.1. CHOP-Chemotherapie

1976 stellten McKelvey et al. die Überlegenheit einer Polychemotherapie zur Induktion einer klinischen Remission bei Patientinnen und Patienten mit fortgeschrittenen NHL gegenüber Chemotherapien mit einzelnen Wirkstoffen dar [40]. Das Akronym CHOP setzt sich aus den unterschiedlichen Wirkstoffnamen zusammen, die zur Chemotherapie eingesetzt werden. Diese beinhalten das Alkylans Cyclophosphamid, das Anthrazyklin Hydroxydaunorubicin bzw. Doxorubicin, das Vincaalkaloid Vincristin (Handelsname: Oncovin) und das Glucokortikoid Prednison (Prodrug) bzw. Prednisolon (aktiver Wirkstoff).

#### 2.2.1.1. Cyclophosphamid

Als Prodrug geht Cyclophosphamid nach Aktivierung über das Cytochrom-P450-Enzymsystem eine kovalente Bindung (sog. Crosslinks) mit der Desoxyribonukleinsäure (DNS/engl.: DNA) ein. Solche Quervernetzungen innerhalb von DNS und Proteinen führen zu Fehlern in der Transkription und dadurch zur Apoptose [26].

#### 2.2.1.2. Doxorubicin

Nach Aktivierung durch Enzymsysteme in der Leber werden Semichinonradikale gebildet. Die durch eine Reaktion mit Sauerstoff gebildeten Superoxid- und Hydroxylradikale bewirken eine Hemmung der Tyrosinkinase und der Topoisomerase-II, wodurch die Apoptose induziert wird [26].

#### 2.2.1.3. Vincristin

Als Mitosehemmer wirken Vincaalkaloide über die Hemmung der Tubulinsynthese. Dadurch arretieren Zellen in der Metaphase der Mitose. Folglich kommt es zur Störung der DNS-Synthese und zur Induktion von Apoptose [26].

#### 2.2.1.4. Prednison

Das synthetische Glucokortikoid Prednison wird als Prodrug in der Leber zur aktiven Substanz Prednisolon metabolisiert. Die proapoptotische Wirkung von Glucokortikoiden verläuft über verschiedene Signalwege, beispielsweise über die Induktion proapoptotischer Gene und über die Unterdrückung, der durch die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B- und AP-1-vermittelten Transkription [29,33].

### 2.2.2. Immuntherapie mit Rituximab

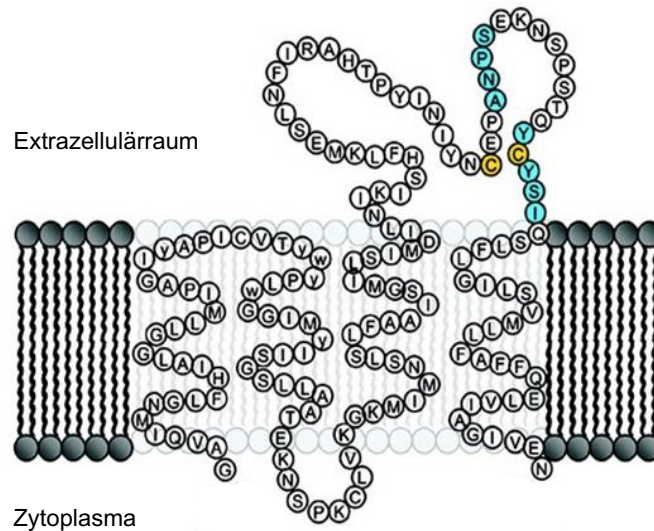
#### 2.2.2.1. Der B-Zell-Oberflächenmarker CD20

1981 konnten Nadler et al. den Ursprung von malignen Neoplasien durch die Entdeckung des spezifischen Oberflächenantigens „B1“ (im Verlauf in CD20 umbenannt) der B-Zell-Reihe zuordnen [44]. Bisherige phänotypische Zellmarker, wie das integrale Membranimmunglobulin, Rezeptoren des Komplementproteins C3 und des konstanten Fc-Teils von IgG waren in ihrer Expression nicht auf B-Lymphozyten limitiert [5].

CD20 wird auf der Zelloberfläche von 95 % der physiologischen, als auch der neoplastisch veränderten B-Zellen exprimiert [66]. Ähnlich wie CD19 oder CD22 wird CD20 daher auch als Pan-B-Zell-Marker bezeichnet. Anders als diese wird CD20 jedoch weder von Plasmazellen, noch von B-lymphatischen Stammzellen exprimiert, was zur Folge hat, dass der CD20-Antikörper Rituximab die Immunglobulin-Serumkonzentration nur geringfügig beeinflusst und sich nach der Behandlung die Lymphozytenzahlen vergleichsweise rasch erholen [11].

#### 2.2.2.2. Struktur des B-Zell Oberflächenmarkers CD20

Die Aminosäuresequenz von CD20, einem nicht glykosilierten Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 33 bis 35 Kilodalton (kDa), umfasst vier transmembran verlaufende Regionen. Das Amino- und das Carboxyende der Sequenz sind dabei auf der zytoplasmatischen Seite der Lipidmembran lokalisiert (siehe Abbildung 1) [7]. Ein extrazellulärer Anteil von ca. 43 Aminosäuren verläuft zwischen der dritten und vierten transmembran verlaufenden Domäne des Proteins [11]. Die extrazelluläre Schleife beinhaltet zwei Gruppen von Epitopen, eine, die bei Bindung der häufigsten monoklonalen anti-CD20-Antikörper, wie Rituximab, einen hemmenden Effekt auf die B-Zell-Proliferation erzeugt und eine zweite Gruppe von monoklonalen Antikörpern des 1F5-Typs, die meist eine Aktivierung der B-Zell-Proliferation bewirken [11].



**Abbildung 1: Molekulare Struktur von CD20 an der Plasmamembran einer B-Zelle**

Vier transmembran verlaufende Domänen verlaufen durch die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran. Auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite befinden sich das Amino- und Carboxyende der Aminosäuresequenz [11]. Die extrazellulär zugewandte Schleife der Aminosäuresequenz enthält mit C167 und C183 (gelb markiert) und den Peptiden ANPS bzw. YCYSI (blau markiert) die Bindungsstelle von Rituximab. Darstellung modifiziert nach Binder et al.[7].

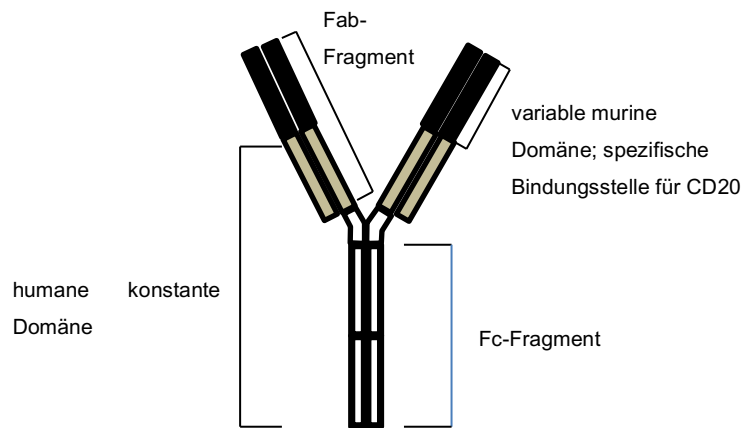
### 2.2.2.3. Rituximab

Kurz nach der Entdeckung des Oberflächenantigens CD20, untersuchten Nadler et al. 1981 die Wirkungsweise eines monoklonalen anti-CD20-Antikörpers zunächst zur Zuordnung eines B-zellulären Ursprungs von malignen Zellen [44].

Durch Fusion von Leicht- und Schwerketten der variablen Region des monoklonalen humanisierten murinen Antikörpers 2B8 mit IgG1-Schwerkette und  $\kappa$ -Leichtkette entsteht durch Klonierung und Amplifikation der monoklonale chimäre anti-CD20-Antikörper Rituximab [11,60]. Als glykosiliertes Protein beträgt das Molekulargewicht von Rituximab ca. 144 kDa, bei einer Aminosäuresequenz bestehend aus 1328 Aminosäuren (siehe Abbildung 2) [56].

Der rekombinant hergestellte monoklonale chimäre anti-CD20-Antikörper (Maus-Mensch) Rituximab bindet an das membranständige Zielantigen CD20, welches auf ca. 95 % von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen exprimiert wird.

Die Wirkmechanismen von Rituximab sind bis heute nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird vor allem eine Komplement- und Zell-induzierte Zytotoxizität, die ADCC, als Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, die über die Aktivierung von NK-Zellen zur Apoptose maligner Zellen führt [20,35,60].



**Abbildung 2: Strukturdarstellung von Rituximab**

Der monoklonale chimäre Anti-CD20-Antikörper Rituximab mit einer in Schwarz dargestellten variablen murinen Domäne des Fab-Fragments und dem in Weiß dargestellten humanen Fc-Fragment. Die in Grau dargestellte Region zeigt die humane konstante Domäne. Eigene Darstellung modifiziert nach Sacchi et al. [56].

#### 2.2.2.4. Antikörper-anhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Mit Antikörpern opsonierte Zielzellen können im Rahmen der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) durch NK-Zellen erkannt und zerstört werden (siehe Abbildung 3) [41]. Ausgelöst wird die ADCC durch den Kontakt von an Oberflächen von Zielzellen gebundenen Antikörpern mit den Fc-Rezeptoren von NK-Zellen. Die von NK-Zellen exprimierten FC $\gamma$ RIIIA (CD16a)- und FC $\gamma$ RIIC (CD32c)-Rezeptoren binden an das FC-Fragment humaner Immunglobuline [76]. Das durch NK-Zellen vermittelte Abtöten der Zielzellen erfolgt durch Exozytose zytoplasmatischer Granula, eine Signalkaskade von Todesrezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Gruppe und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [76]. Durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper, die zur Aktivierung von NK-Zellen führen, kann sich die Wirkung der ADCC gegenüber Tumorzellen verbessern [45].

#### 2.2.2.5. Komplement-abhängige Zytotoxizität

Die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) ist ein wichtiger Effektormechanismus für die Antikörper-vermittelte Zerstörung von Zielzellen [30]. Nach erfolgter Bindung der Fc-Domäne des Antikörpers an die Zielzelle rekrutiert der Antikörper das Komplement-Protein C1. Der C1 Komplex, bestehend aus einem Antikörper-erkennenden Protein C1q und den Serinproteasen C1r und C1s, setzen eine proteolytische Kaskade in Gang, die zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) führt (siehe Abbildung 3) [30]. Dieser MAC führt zur Integration lytischer Poren in die Zellmembranen der Zielzellen und zu deren Tod.

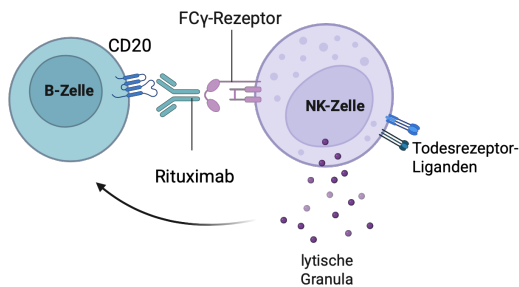
2.2.2.6. Indirekte Toxizität

Die indirekte Zytotoxizität bezieht sich auf Schädigungsmechanismen, die durch eine indirekte Aktivierung von Immunzellen durch Rituximab gekennzeichnet sind (siehe Abbildung 3). Vega et al. berichten, dass resistente Non-Hodgkin-Lymphom-B-Zellen durch Rituximab sowohl für eine durch den Fas-Liganden (FasL), als auch durch den Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) induzierte Apoptose sensibilisiert werden können [73]. Niu et al. zeigten, dass Rituximab in vitro die Aktivierung und Expansion von NK-Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen fördert und die Antitumoraktivität von NK-Zellen gegenüber autologen B-Zellen erhöht werden kann [46].

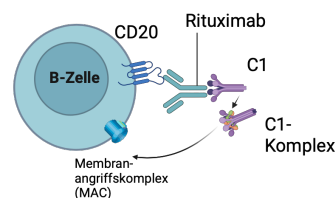
2.2.2.7. Antikörper-abhängige zellvermittelte Phagozytose

Die Antikörper-abhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP) ist ein Vorgang, bei dem von Antikörpern opsonierte Zielzellen Fc-Rezeptoren auf Phagozyten aktivieren und damit eine Phagozytose auslösen (siehe Abbildung 3). So können Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, bei Präsenz tumorspezifischer Antikörper, Tumorzellen direkt abtöten [61].

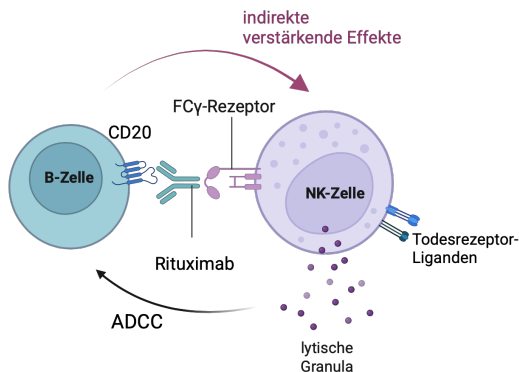
i) ADCC (Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität)



ii) CDC (Komplement-abhängige Zytotoxizität)



iii) indirekte Toxizität



iv) ADCP (Antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose)

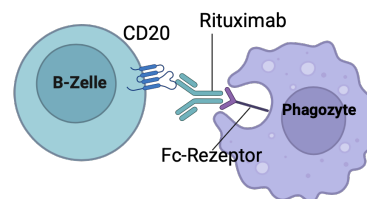


Abbildung 3: Verschiedene Wirkmechanismen von Rituximab.

Erstellt mit BioRender [8]

### 2.3. NK-Zellen

NK-Zellen sind Effektorzellen des adaptiven Immunsystems, die aus der CD34-positiven, gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle des Knochenmarks (Common Lymphoid-progenitor (CLP)) hervorgehen. Zytologisch entsprechen NK-Zellen mittelgroßen, lymphatischen Zellen mit granulärem Zytoplasma. Spezifisch für die NK-Zelle ist das NK-Zell-Oberflächenmerkmal CD56+, bei gleichzeitiger Abwesenheit der Oberflächenmerkmale CD19 (auf B-Lymphozyten) und CD3 (auf T-Lymphozyten). NK-Zellen stellen einen Anteil von 10–15 % an der Gesamtheit aller Lymphozyten und zirkulieren sieben bis zehn Tage im Blutkreislauf [15]. Im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten benötigen NK-Zellen keine antigenspezifischen Rezeptoren zur Initiierung der Immunantwort. Virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen stellen die primären Zielstrukturen von NK-Zellen dar [48].

#### 2.3.1 Fc-Gamma-Rezeptor (FcγR)

Als Oberflächenmoleküle binden Fc-Rezeptoren den Fc-Anteil von Immunglobulinen [42]. Fc-Rezeptoren erkennen Immunglobuline spezifischer Isotypen über eine bestimmte Erkennungsdomäne. Verschiedene Zelltypen weisen unterschiedliche Kombinationen von Fc-Rezeptoren auf. Durch den Isotyp des Antikörpers kann bestimmt werden, welche akzessorische Zelle an einer Reaktion teilnimmt [42]. Die Immunglobulin-G-induzierte FcγR-Funktion lässt sich in ihrer Heterogenität auf die genetischen Polymorphismen der drei FcγR-Klassen, FcγRIIa (CD32a), FcγRIIIa (CD16a) und FcγRIIIb (CD16b) zurückführen [72]. Die Rezeptoren FcγRI, FcγRII und FcγRIII gehören dabei zu den aktivierenden Rezeptoren, die Rezeptoren FcγRIIb1 und FcγRIIb2 zu den inhibierenden Rezeptoren [62,72].

##### 2.3.1.1. Bedeutung von Fc-Gamma-Rezeptoren auf NK-Zellen

Die ADCC wird primär durch den Rezeptor FcγRIIIa vermittelt. Induziert wird die ADCC am potentesten durch den Antikörper-Isotyp IgG1 [57]. FcγRIIIa ist ein relevanter FC-Rezeptor, der nach Expression durch NK-Zellen aktivierende Signale triggert und somit das Abtöten von zuvor durch Antikörper opsonierten Zielzellen verursacht [57]. Aguila et al. zeigten, dass FcγRIII (CD16)-defiziente NK-Zellen in vitro keine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität mit Antikörpern von B-Zell-Lymphomen induzieren konnten [1].

#### 2.3.2. Killing Mechanismen von NK-Zellen

Als wichtigste Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität sind die Expression von Todesrezeptorliganden, die Exozytose lytischer Granula über die Perforin/Granzym-Achse und zytokinvermittelte Effekte, wie durch Interferon-gamma (IFN-γ) zu nennen [54].

### 2.3.2.1. Todesrezeptorliganden

Bei der durch Todesrezeptorliganden vermittelten Apoptose werden Fas-Rezeptoren (CD95) auf Zielzellen durch den Fas-Liganden (FasL) auf der Zelloberfläche von NK-Zellen erkannt [54,58]. Durch Bindung von Fas-Rezeptor und Fas-Ligand kommt es zur Konformationsänderung und, über Interaktionen von Adapterproteinen und Todesrezeptoren, zur Entstehung des todesinduzierenden Signalkomplexes (DISC) [43]. Im DISC triggert Caspase-8 als Initiator die Apoptosekaskade, welche über Effektor-Caspasen wie Caspase-3 zu einer Fragmentierung der DNA und damit zur kontrollierten Zerstörung der Zielzelle führt [43].

### 2.3.2.2. Lytische Granula

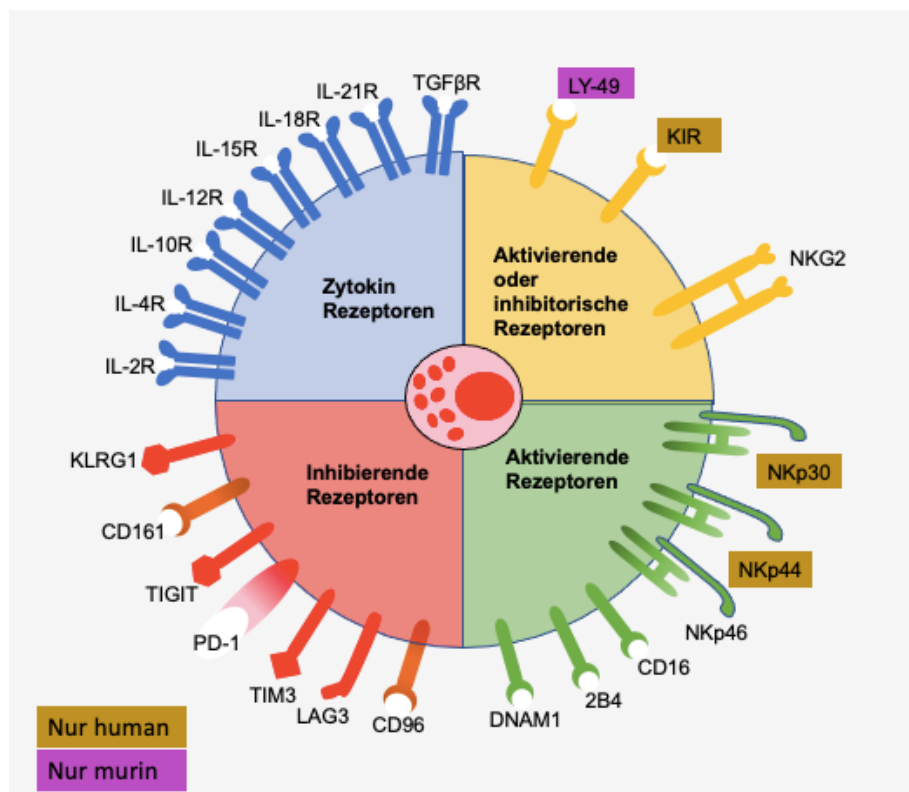
Durch geringe oder absente MHC-I-Expression der Zielzelle kommt es zur Initiation der Immunreaktion der NK-Zelle [4]. Durch den, durch die immunologische Synapse vermittelten, engen Zellkontakt, kommt es zur NK-Zell-abhängigen Sekretion zytotoxischer Substanzen, wie Perforin und Granzym [25]. Nach Porenbildung durch das Protein Perforin kann die Serinprotease Granzym in das Zytoplasma der Zielzelle eindringen, um dort über Caspasen eine Apoptose der Zelle zu triggern [25,32].

### 2.3.2.3. Interferon- $\gamma$

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) kann zusammen mit dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) die Zytotoxizität von NK-Zellen erhöhen [75]. Die Erhöhung der Zytotoxizität erfolgt über eine NF- $\kappa$ B-abhängige Hochregulation des intrazellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) welches die NK-Zell-Adhäsion und -Aktivierung an Zielzellen fördert. [75]. Caligiuri et al. zeigten, dass IFN- $\gamma$  zu einer Zytokinsekretion durch antigenpräsentierende Zellen führt [9].

### 2.3.3. NK-Zell-Rezeptoren

NK-Zellen exprimieren eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren, mit denen sie virusinfizierte oder aberrante Wirtszellen erkennen (siehe Abbildung 4). Im Gegensatz zu den klassischen und konservierten NK-Zell-Rezeptoren wie CD94/NKG2 (natural-killer-group 2), deren Zielantigene die ebenfalls konservierten Rezeptoren namens Humane Leukozytenantigene (HLA)-E, -F und -G des Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHC-I) sind, stellen die sogenannten Killer-Cell Immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR) ein evolutionsgenetisch relativ neues und bisher nur in Primaten beschriebenes, entsprechend dem Polymorphismus seiner Zielantigene des HLA-Systems (HLA-A/B/C) hochpolymorphes Rezeptorsystem dar [52]. Gemeinsames Ziel von allen NK-Zell-Rezeptoren ist es, veränderte Wirtszellen zu erkennen und zu bekämpfen, wenn sie den MHC-I verloren haben (Missing-self). Durch ein meist inhibitorisches Rezeptorsignal wird diese Funktion bei entsprechender Interaktion mit dem physiologisch exprimierten MHC-I-Antigen potenzieller Zielzellen gehemmt [9].



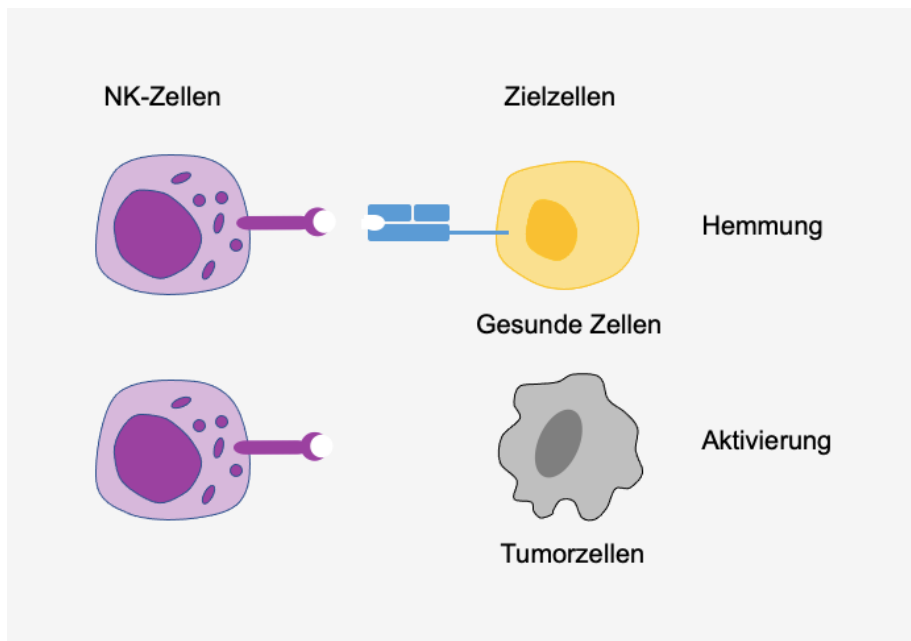
**Abbildung 4: NK-Zell Rezeptoren**

Eingruppierung von NK-Zell-Rezeptoren in Zytokin (blau), aktivierende (grün), inhibitorische (rot) und aktivierende oder inhibitorische Rezeptoren (gelb) und deren Vorkommen beim Menschen bzw. bei der Maus. Die Gruppe der Killer-Cell Immunoglobulin-like Rezeptoren richten sowohl aktivierende als auch inhibitorische Signale an die Funktion der NK-Zelle [14]. Eigene Darstellung nach Choucair et al. [15].

#### 2.3.4. Missing-self und NK-Zell-Toleranz

MHC-I-Moleküle kommen als membranverankerte Proteine ubiquitär auf allen Körperzellen vor. NK-Zellen erkennen Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen über eine abnormal niedrige oder nicht vorhandene Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche, was zur Aktivierung der NK-Zelle und Zytolyse der Zielzelle führt (siehe Abbildung 5) [4,37].

Reife NK-Zellen exprimieren Rezeptoren, die beim Erkennen eines MHC-I-Moleküls ein inhibitorisches Signal vermitteln. Dabei wird das Tyrosin-basierte Aktivierungssignal unterdrückt, welches eine Zerstörung physiologischer Körperzellen zur Folge haben würde. Während des Prozesses des NK-Licensing kommen inhibitorische Rezeptoren der heranreifenden NK-Zellen mit den MHC-I-Molekülen in Kontakt und vermitteln so eine Toleranz zu den körpereigenen Antigenen [27].



**Abbildung 5: Missing-self-Hypothese**

Verschiedene aktivierende und hemmende NK-Zell-Rezeptoren sorgen für eine Balance zwischen aktivierenden und hemmenden Signalen. Hemmende Rezeptoren auf NK-Zellen interagieren mit den MHC-I-Molekülen auf physiologischen Körperzellen, erzeugen ein inhibitorisches Signal und verhindern die Zytolyse gesunder Zellen. Die unter maligner Transformation oder Virusinfektion potentiell gestörte MHC-I-Expression führt zu einem relativen Überhang der aktivierenden Signale und zur NK-Zellattacke [49]. Eigene Darstellung nach Ljunggren et al. [36].

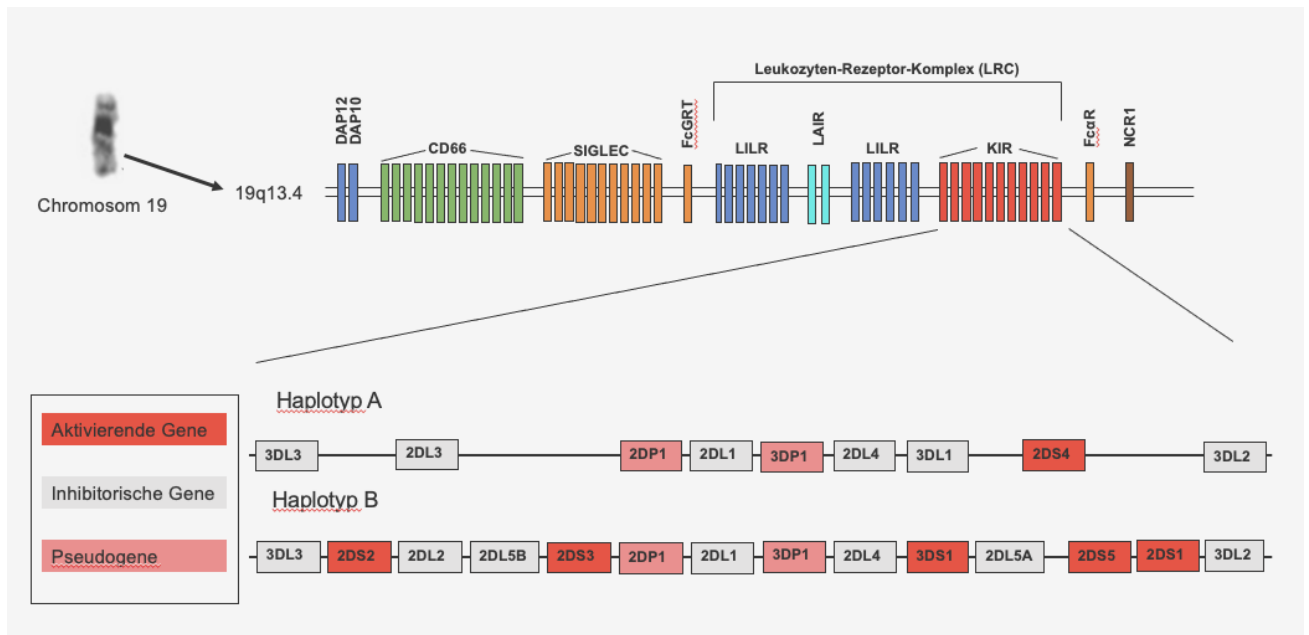
### 2.4. Killer-Cell Immunglobulin-like Rezeptoren

Die Gene des Killer-Cell Immunglobulin-like Rezeptor (KIR)-Systems sind als Gen-Cluster auf dem langen Arm des Chromosoms 19 im Locus 19q13.4. angeordnet (siehe Abbildung 6). Übergeordnet sind sie Teil des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes (LRC), der neben dem KIR-System die Immunglobulin-like Transcripts (ILT), die Gen-Familie der leukozytenassoziierten immunglobulinähnlichen Rezeptoren (LAIR) und Gene des Fc $\alpha$ -Rezeptors beinhaltet [31,48]. Alle bekannten KIR-Haplotypen beinhalten mit KIR3DL3 und KIR3DL2 an beiden Enden des Gen-Clusters sowie dazwischenliegend KIR2DL4 die strukturgebenden Framework-Gene [71,77].

Die KIR-Gene setzen sich aus den 15 teils aktivierenden, teils inhibierenden KIR2DL1–4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1–5, KIR3DL1–3, KIR3DS1 und zwei Pseudogenen, KIR2DP1 und KIR3DP1, zusammen. Zusätzlich zum Allel-Polymorphismus führen regelmäßig auftretende hybride Isoformen des KIR-Gens oder alternatives Spleißen zu Rezeptor-Isoformen mit potentiell veränderter Funktion [38,77].

Die Benennung der KIR-Gene erfolgt nach den jeweiligen molekularen Strukturen, für die sie codieren. Die erste Ziffer, die auf das Akronym KIR folgt, beschreibt die Anzahl der Immunglobulin-Domänen, das folgende D kennzeichnet die Domäne. Der Buchstabe S (short) bezeichnet einen kurzen, L (long) einen langen zytoplasmatischen Schwanz. P steht für Pseudogene. Die letzte Ziffer beschreibt die Anzahl der Gene, die für Proteine mit dieser Struktur codieren. Bei KIR-Genen, die eine starke Ähnlichkeit in ihrer Struktur aufweisen, können diese noch durch einen letzten Buchstaben im Akronym unterschieden werden [38].

Als Transmembranproteine werden KIR auf NK-Zellen exprimiert und beeinflussen die Regulation der Immunantwort gegenüber viralen Infektionserkrankungen oder Tumorerkrankungen. Bei der Bindung eines KIR an ein Molekül der HLA-I-Klasse sorgt die bestimmte Eigenschaft des jeweiligen KIR für ein aktivierendes bzw. ein inhibierendes Signal an die NK-Zelle. Die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden KIR steuert damit die lytische Aktivität von NK-Zellen [9].



**Abbildung 6: Leukozyten-Rezeptor-Komplex**

Ausschnitt des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes (LRC) des Genlocus 19q13.4. Eigene Darstellung nach Diaz-Peña et al. [16]. Die im LRC enthaltenen KIR-Gene können anhand ihrer Zusammensetzung in den Haplotyp A und den Haplotyp B eingeteilt werden. Die Haplotypen enthalten eine Kombination aus aktivierenden und inhibitorischen Genen sowie Pseudogenen [16].

#### 2.4.1. KIR-Liganden

Die HLA-Klasse-I-Moleküle A, B und C fungieren als Liganden von KIR. HLA-C-Allele lassen sich, bezogen auf ihre Ligandenfunktion für KIR, in die HLA-C1-Allele sowie HLA-C2-Allele unterteilen. HLA-C1 ist durch einen Asparginrest in Position 80 in der Aminosäuresequenz gekennzeichnet und geht eine Bindung mit den Genotypen KIR2DL3, KIR2DS2 und KIR2DL2 ein [6]. HLA-C2-Allele weisen einen Lysinrest in Position 80 auf und binden die Genotypen KIR2DS1 und KIR2DL1 [6,49].

### 2.5. Klinische Bedeutung des KIR-Status in der Onkologie

Almalte et al. zeigten, dass das Vorhandensein einer großen Anzahl von aktivierenden KIR-Genen mit einem signifikant erniedrigten Risiko für Kinder, an einer akuten lymphatischen Leukämie (B-ALL) zu erkranken, korreliert [2]. Zusätzlich konnte das Vorkommen des KIR2DS2-Genotyps mit einer Reduktion des Risikos, an einer B-ALL zu erkranken, assoziiert werden [2].

Als unabhängigen Risikofaktor für die Progression eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) zu einer akuten myeloischen Leukämie (AML) konnten Stringaris et al. das Vorkommen des KIR-Haplotyps A, der durch das Auftreten von keinem oder nur einem aktivierenden KIR-Gen gekennzeichnet ist, identifizieren [67].

Im Kontext einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation bei Patientinnen und Patienten mit AML wiesen Venstrom et al. Assoziationen zwischen einem positiven KIR2DS1-Status der stammzellspendenden Personen und weniger Erkrankungsrückfällen der empfangenden Personen nach [74].

Im Vergleich von Erkrankungsrückfällen bei KIR2DS1-positivem vs. KIR2DS1-negativem Status ergab sich: 26.5 % vs. 32.5 %; Hazard Ratio (HR): 0.76; 95 %-Konfidenzintervall (CI): 0.61–0.96; p-Wert (p) = 0.02. Dieser protektive Effekt war bei KIR2DS1-positiven Spendern und gleichzeitiger HLA-C1-Homozygotie bzw. HLA-C1/C2-Heterozygotie der Empfänger, nicht aber bei HLA-C2-Homozygotie nachweisbar. Im Vergleich von Erkrankungsrückfällen bei HLA-C1/C1 oder HLA-C1/C2 vs. HLA-C2/C2 zeigte sich 24.9 % vs. 37.3 %; HR: 0.46; 95 %-CI: 0.28–0.75; p = 0.002. Für diese Kombination, KIR2DS1-positive Spender, bei HLA-C2-homozygoten Empfängern, ergab sich also ein deutlich schwächerer Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL) [74].

### 2.6. Hypothese aus RICOVER-60 und CLL8

In der RICOVER-60-Therapiestudie wurden 1222 Patientinnen und Patienten im Alter von 61–80 Jahren mit einem CD20-positiven aggressiven B-Zell-Lymphom mit einer CHOP-haltigen Chemotherapie in einem 2x2-faktoriellen Design, in sechs oder acht Zyklen in zweiwöchigen Therapieintervallen (CHOP-14) mit Rituximab (R-CHOP) oder ohne (CHOP) behandelt [51]. Dabei stellten sich sechs Zyklen R-CHOP in Bezug auf ereignisfreies Überleben (EFS), PFS und OS gegenüber sechs Zyklen CHOP als überlegen dar [51].

Bestimmte KIR/HLA-Interaktionen führen zu einer veränderten Funktionsweise von NK-Zellen [69]. Im Speziellen führt eine HLA-C2-Homozygotie bei gleichzeitiger KIR2DS1-Positivität zur verminderten zytolytischen Aktivität der NK-Zelle [52].

2022 publizierten Kaddu-Mulindwa und Rixecker et al. den KIR- und HLA-C-Status von 519 Patientinnen und Patienten der RICOVER-60-Studie (NCT00052936), sowie den KIR2DS1- und HLA-C-Status von 549 Patientinnen und Patienten der CLL8-Studie (NCT00281918) und korrelierten die Resultate mit den klinischen Endpunkten der Studien [23].

In RICOVER-60 konnten KIR2DS1 und HLA-C2/C2 als unabhängige Risikofaktoren für das Überleben identifiziert werden. Ein positiver KIR2DS1-Rezeptorstatus, eine HLA-C2-Homozygotie sowie die Kombination aus positivem KIR2DS1- und HLA-C2/C2-Status waren bei Patientinnen und Patienten, die eine Rituximab-haltige Therapie erhielten, mit einem ungünstigen klinischen Outcome assoziiert [23].

Im Unterscheid dazu ergab sich bei Patientinnen und Patienten mit positivem KIR2DS1-HLA-C2/C2-Status, die nur eine CHOP-Chemotherapie erhielten, kein ungünstigeres klinisches Outcome. Zwischen dem KIR2DS1-HLA-C2/C2-Status und Rituximab konnte eine signifikante Interaktion in Bezug auf das EFS ( $p = 0,018$ ) und PFS ( $p = 0,034$ ) beobachtet werden [23].

In der CLL8-Studie ergab sich hinsichtlich des PFS für die Interaktion des KIR2DS1-HLA-C2/C2-Status und Rituximab ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,024$ ). Wie auch in RICOVER-60, konnte im entsprechenden Patientenkollektiv der positive KIR2DS1-HLA-C2/C2-Status als prädiktiver Biomarker für einen fehlenden Benefit durch Rituximab identifiziert und validiert werden [23].

### 2.7. Fragestellung

Ausgehend von der aus RICOVER-60 und CLL8 abgeleiteten Hypothese, dass KIR/HLA-Interaktionen einen unabhängigen Risikofaktor für das Überleben darstellen und die Wirksamkeit einer Rituximab-Therapie beeinflussen, sollen diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit am Patientenkollektiv der UNFOLDER-Studie überprüft werden [23].

Während RICOVER-60 ein älteres Kollektiv (61–80 Jahre) mit CHOP  $\pm$  Rituximab untersuchte, umfasst die UNFOLDER-Studie jüngere Patientinnen und Patienten (18–60 Jahre). Die CLL8-Studie wiederum evaluierte eine Chemotherapie mit Fludarabin und Cyclophosphamid (FC)  $\pm$  Rituximab in einer Kohorte von 30–81 Jährigen [23]. Hinsichtlich der Krankheitsstadien schließt UNFOLDER (IPI 0–1), im Gegensatz zu RICOVER-60 (IPI 1–5) und CLL8 (Binet-Stadium C oder B mit Therapiebedürftigkeit), Patientinnen und Patienten in limitierten Krankheitsstadien, und damit besserer Prognose, ein [19,70].

Neben der Bestimmung der Häufigkeit und Verteilung des individuellen KIR2DS1- und HLA-C-Status der untersuchten Patientinnen und Patienten der UNFOLDER-Studie, soll im Rahmen dieser Dissertation der Einfluss dieser Genotypen auf den jeweiligen Therapieverlauf untersucht werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material und Laborgeräte

Zur Durchführung der in der Arbeit beschriebenen Messungen wurden die folgenden Laborgeräte (siehe Tabelle 5) und Verbrauchsmaterialien (siehe Tabelle 6) verwendet.

**Tabelle 5: Laborgeräte**

| <b>Geräte und Software</b>  | <b>Hersteller</b>  |
|---|--|
| - Pipetten<br>- Thermomixer compact<br>- Zentrifuge 5810 R  | Eppendorf, Hamburg; Deutschland                                  |
| - Zentrifuge Heraeus Fresco 21<br>- Spectrophotometer NanoDrop ND-1000-<br>Software: ND-1000-Windows XP | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                           |
| - Real-Time PCR System CFX Connect-<br>Software: Bio-Rad CFX Maestro 1.1                                | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA                         |
| - Wasserbad GFL - 1002  | Gesellschaft für Labortechnik mbH,<br>Burgwedel, Deutschland     |
| - Kühlschrank<br>- Labortiefkühlschrank -20°C   | Liebherr, Liebherr-Hausgeräte GmbH,<br>Ochsenhausen, Deutschland |
| - Labortiefkühlschrank -20°C  | Robert Bosch GmbH, Stuttgart,<br>Deutschland                     |
| - Vortex- Schüttler VV3   | VWR International GmbH, Darmstadt,<br>Deutschland                |

**Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien**

| <b>Material</b>  | <b>Hersteller</b>                                      |
|--|--|
| - Pipettenspitzen  | Sarstedt AG & Co., Nürnberg,<br>Deutschland            |
| - 96-Well-PCR-Platten  | Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern,<br>Deutschland |
| - QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)<br>CAT No. 51106 Lot. No.: 130170077<br>- QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)<br>Cat. No. 51106 Lot. No.: 166041874  | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland                       |
| - Ethanol absolut ≥ 99,5%  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                     |
| - Mastermix: appliedbiosystems by Thermo<br>Fisher Scientific; SYBR Green PCR<br>Mastermix. LOT: 1903523. REF: 4309155<br>- Mastermix SNP: appliedbiosystems by<br>Thermo Fisher Scientific; TaqMan<br>GTexpress Mastermix. LOT: 00837125. REF:<br>4403311 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                 |
| - Verschlussfolie-PCR-Platten: Microseal B<br>Adhesive Sealer  | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA               |

### 3.1.1. Primer

Zur Durchführung der Untersuchung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wurden folgende KIR-Primer (siehe Tabelle 7) und HLA-C-Primer (siehe Tabelle 8) verwendet.

**Tabelle 7: Verwendete KIR-Primer mit Angabe der spezifischen Schmelztemperatur T<sub>m</sub>**

| <b>KIR-Gen</b> | <b>Forward Primer</b>                      | <b>Reverse Primer</b> | <b>T<sub>m</sub></b> |
|----------------|--|-----------------------|----------------------|
| KIR2DS1        | TCTCCATCAGTCGCATGAG<br>TCTCCATCAGTCGCATGAA | GGTCACTGGGAGCTGAC     | 80,5 °C              |
| Control1       | GGCTGCACCTGAGGCTAA                         | GCCCCAAAAGAACTCGTATTC | 87,5 °C              |
| Control2       | TTACCCAGAGCCCTATCGTTCT                     | GTCTGCCCATCACCACTATT  | 75,0 °C              |

**Tabelle 8: Verwendete HLA-C Primer**

| HLA-C1                      | HLA-C2                     |
|-----------------------------|----------------------------|
| 6FAM-CCGAGTGAG CCTGC-MGBNFQ | VIC-CCGAGTGAA CCTGC-MGBNFQ |

### 3.2. Klinische Therapiestudie UNFOLDER

Die UNFOLDER-Studie ist eine klinische Therapiestudie in 2x2-faktoriellem Design, der DSHNHL, mit der Studiennummer NCT00278408 (Ehemalige Leitung: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh). Die Durchführung fand an 148 klinischen Standorten in Dänemark, Israel, Italien und Deutschland in Übereinstimmung mit der Helsinki-Erklärung und der jeweiligen Ethikkommissionen statt.

Als prospektive, randomisierte, offene, multizentrische Therapieoptimierungsstudie, vergleicht sie sechs Zyklen einer Immunchemotherapie mit R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison) in Therapieintervallen von 21 Tagen (R-CHOP-21) mit einer Immunchemotherapie mit R-CHOP in Therapieintervallen von 14 Tagen (R-CHOP-14). Neben der Verkürzung des Therapieintervalls auf 14 Tage und deren prognostische Bedeutung bei bestimmten Patientengruppen, lag ein weiterer Studienschwerpunkt auf der Frage, ob eine konsolidierende Strahlentherapie eines Bulks und/oder von Extranodalbefällen das Therapieergebnis verbessert [70].

#### 3.2.1. Fragestellung der UNFOLDER-Therapiestudie

Nach Etablierung von Rituximab in einem R-CHOP-Therapieschema bei einem CD20+-B-NHL wird R-CHOP-14 dem Therapieschema R-CHOP-21 gegenübergestellt. Vorarbeiten der DSHNHL legen die Vermutung nahe, dass Patientinnen und Patienten mit Bulk und hoher LDH von einem verkürzten Therapieschema (R-CHOP-14) profitieren [50,51]. Auch Ergebnisse der MINT-Therapiestudie weisen einen Bulk als unabhängigen Risikofaktor für das Überleben aus, obwohl dieser im IPI-Schema nicht enthalten ist [50]. UNFOLDER soll nun unter anderem klären, ob Patientinnen und Patienten mit Bulk im Rahmen der R-CHOP-Therapie von einer Strahlentherapie profitieren.

### 3.2.2. Patientenkollektiv und Studiendesign

Nach Fallzahlkalkulation sollten 1072 Patientinnen und Patienten für die UNFOLDER-Studie rekrutiert werden, um 578 davon zu randomisieren, die sich für eine konsolidierende Strahlentherapie eignen [70].

Als Einschlusskriterien mussten ein histologisch gesichertes, unbehandeltes CD20-positives aggressives B-Zell-Lymphom der Niedrig-Risiko-Gruppe (aalPI = 1 oder laaPI = 0 mit Bulk) und ein weniger günstiger Verlauf vorliegen. Zu den Ausschlusskriterien zählten unter anderem vorausgegangene Chemo- oder Strahlentherapien sowie immunsuppressive Therapien bei früheren Erkrankungen, eine andere Tumorerkrankung innerhalb der letzten 5 Jahre, > 1 Risikofaktor nach aalPI sowie ZNS-Befall oder MALT-Lymphom. Aufgrund einer sich langsam gestaltenden Rekrutierung wurde diese vorzeitig beendet und es wurden 700 Patientinnen und Patienten in die Studie aufgenommen, von denen fünf ihr Einverständnis zurückzogen. Von den verbliebenen 695 Patientinnen und Patienten eigneten sich 228 nicht für eine Strahlentherapie und wurden nur zwischen sechsmal R-CHOP-14 und sechsmal R-CHOP-21 randomisiert. Die übrigen 467 Patientinnen und Patienten wurden zusätzlich bezüglich einer konsolidierenden Strahlentherapie randomisiert [70].

Die Subgruppe der PMBCL stellte mit 136 (19,6 %) Patientinnen und Patienten einen relativ großen Anteil der Studienpopulation dar [70]. Der Anteil von PMBCL an allen DLBCL macht insgesamt jedoch nur bis zu 10 % aus [17].

Die Randomisierung von Patientinnen und Patienten, die sich für eine Strahlentherapie eigneten, allerdings in den Behandlungsarm ohne Strahlentherapie randomisiert wurden, wurde nach einer Interimsanalyse durch das Data Safety Committee aufgrund eines signifikant kürzeren EFS, dem primären Endpunkt der Studie, nach Aufnahme von 162 Patientinnen und Patienten in diesen Behandlungsarm, vorzeitig beendet (siehe Abbildung 8) [70].

### 3.2.3. Studiendesign

In dem 2x2-armigen offenen, multizentrischen, prospektiven, randomisierten Phase-III-Studiendesign werden die Patientinnen und Patienten in vier Therapiearme randomisiert (siehe Abbildung 7). Sie erhalten eine Immuntherapie bestehend aus sechs Zyklen des monoklonalen anti-CD20-Antikörpers Rituximab sowie eine Chemotherapie bestehend aus sechs Zyklen Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (CHOP-Schema). Die Therapie erfolgt in 21-tägigen Intervallen (R-CHOP-21) oder in 14-tägigen Intervallen (R-CHOP-14) jeweils mit und ohne konsolidierende Strahlentherapie von Tumormassen >7,5 cm und/ oder Extranodalbefällen (siehe Abbildung 7) [70].

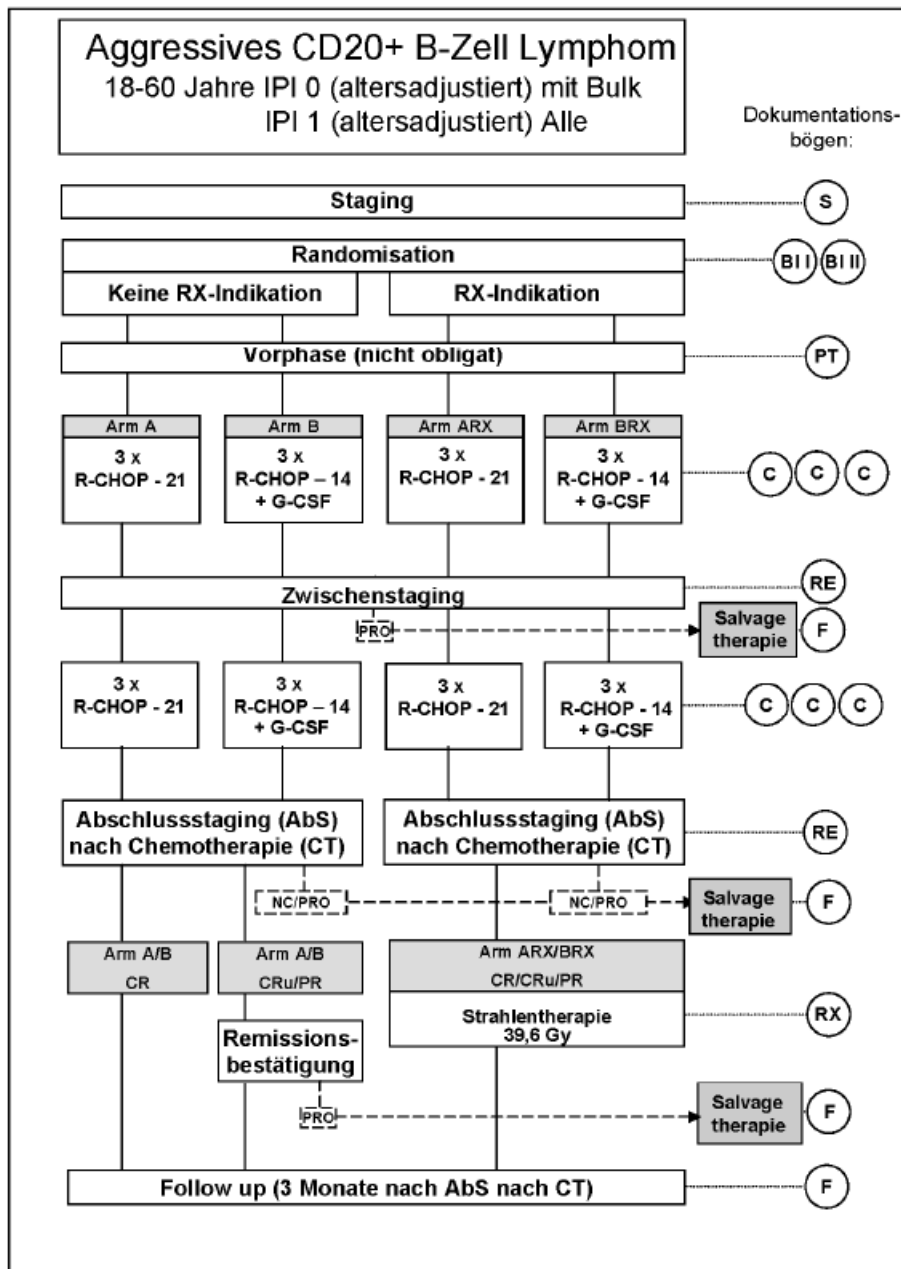


Abbildung 7: Flussdiagramm der UNFOLDER-Therapiestudie [80]

### 3.2.4. Vorphase-Therapie und Chemotherapie

Die sieben-tägige Vorphase-Therapie besteht aus der einmaligen Gabe von 1 mg Vincristin i.v., sowie der täglichen Gabe von 100 mg Prednison p.o.. Ziele der Vorphase-Therapie sind das Verhindern eines Tumorlysesyndroms, die Verbesserung des Allgemeinzustandes und eine Reduktion der Toxizität der Chemotherapie.

In beiden Therapiearmen, R-CHOP-21 und R-CHOP-14, ist die Dosierung der Chemotherapie identisch. Die Wirkstoffe (siehe Tabelle 9) werden in beiden Therapieschemata in insgesamt sechs Therapiezyklen verabreicht, lediglich der Abstand zwischen zwei Zyklen unterscheidet sich (14 vs. 21 Tage). Gründe für einen Therapieabbruch stellen eine Thrombozytopenie oder Leukozytopenie, eine Organtoxizität oder eine aktive Infektion dar [70]. Details zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der jeweiligen Wirkstoffe sind unter Punkt 2.2.1 beschrieben.

**Tabelle 9: Wirkstoffe der R-CHOP-Immunchemotherapie**

| <b>Wirkstoff</b> | <b>Applikationstag</b> | <b>Dosierung</b>                  |
|------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Rituximab        | Tag 0 oder Tag 1       | 375 mg/m <sup>2</sup>             |
| Cyclophosphamid  | Tag 1                  | 750 mg/m <sup>2</sup>             |
| Doxorubicin      | Tag 1                  | 50 mg/m <sup>2</sup>              |
| Vincristin       | Tag 1                  | 1,4 mg/m <sup>2</sup> , max. 2 mg |
| Prednison        | Tag 1–5                | 100 mg                            |
| G-CSF            | Tag 4–13               | 263 µg                            |

### 3.2.5. Immuntherapie mit Rituximab

Die Rituximab-Gabe erfolgt in beiden Therapiearmen jeweils 48 bis zwei Stunden vor Beginn des jeweiligen Zyklus (siehe Tabelle 9). Die erneute Gabe erfolgt dann in jeder dritten bzw. jeder zweiten Woche mit der R-CHOP-14 bzw. R-CHOP-21 Gabe, insgesamt sechsmal, synchronisiert. Weitere Details zur Wirkungsweise von Rituximab sind in Punkt 2.2.2. dargestellt.

Zur Vermeidung eines Tumorlysesyndroms ist auf eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr und eine Allopurinol-Gabe zu achten. Die Immuntherapie erfolgt unter kontinuierlichem Monitoring von Herzfrequenz, Blutdruck und Atemfrequenz.

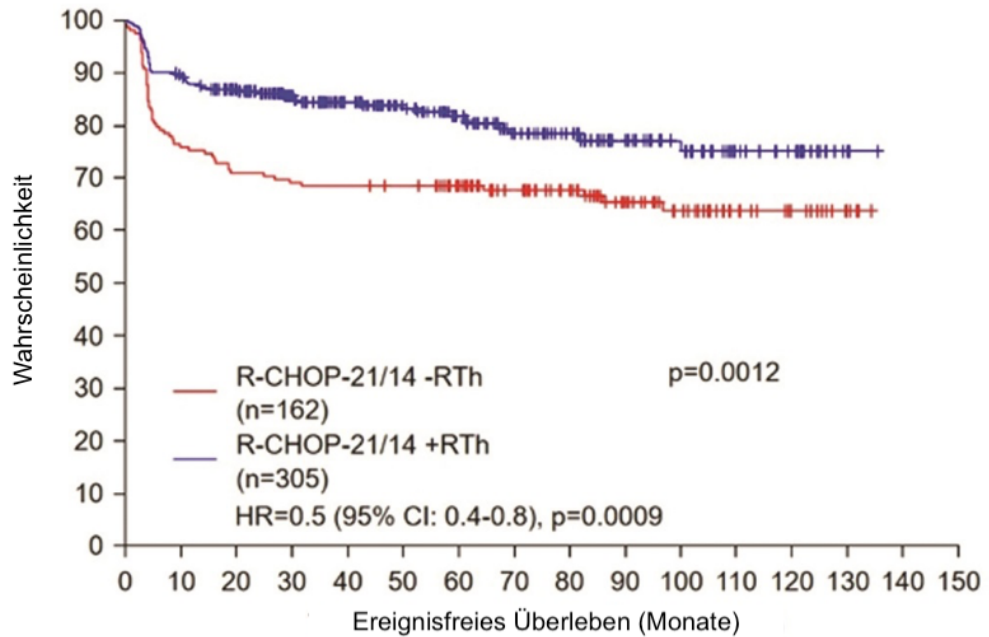
### 3.2.6. Konsolidierende Strahlentherapie

Das Vorliegen mindestens einer bestrahlbaren Lokalisation, ein Bulk bzw. ein nicht operativ entfernter und/oder bestrahlbarer Extranodalbefall, stellen eine Bestrahlungsindikation dar. Bei Patienten im entsprechenden Therapiearm wird eine Involved-field-Bestrahlung in Regionen mit einem Bulk oder einem Extranodalbefall  $\geq 7,5$  cm nach Empfehlung der Referenzstrahlentherapie in Homburg durchgeführt. Die Gesamtdosis der Bestrahlung beträgt 39,6 Gray (Gy). Bei vollständiger Erholung des Knochenmarks, bzw. nach der Ausheilung von Mukosiden, wird zwei bis sechs Wochen nach dem letzten Zyklus Immunchemotherapie mit der konsolidierenden Strahlentherapie begonnen.

### 3.2.7. Intervention der Studie im Verlauf

Im Verlauf der Studie ergab eine Interimsanalyse, dass der primäre Endpunkt, das EFS, von insgesamt 285 der für eine Strahlentherapie qualifizierten Patientinnen und Patienten statistisch signifikant länger im Studienarm mit Strahlentherapie andauerte als im Studienarm ohne Strahlentherapie (siehe Abbildung 8). Folglich wurden die beiden Therapiearme mit 144 Patientinnen und Patienten, die R-CHOP-14 und R-CHOP-21 ohne Strahlentherapie erhielten, beendet und die Patientinnen und Patienten den entsprechenden Therapiearmen mit Strahlentherapie zugeordnet [70].

Die im Therapiearm ohne Strahlentherapie zum Abbruch führenden Ereignisse (Events) resultierten überwiegend daraus, dass Restbefunde bzw. partielle Remissionen mangels PET-Diagnostik von den lokalen Investigatoren häufig als unzureichende Therapieantwort interpretiert wurden. Dies führte vielfach zur Einleitung einer Strahlentherapie, die gemäß Studienprotokoll als Ereignis gewertet wurde.



|                   | number at risk<br>(number censored) |      |      |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------|-------------------------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| R-CHOP-21/14 -RTh | 123                                 | 115  | 112  | 111  | 109   | 95    | 79    | 65    | 46    | 35    | 21    | 13    | 5     | 0     | 0     |
|                   | (0)                                 | (0)  | (0)  | (0)  | (2)   | (16)  | (31)  | (45)  | (62)  | (72)  | (86)  | (94)  | (102) | (107) | (107) |
| R-CHOP-21/14 +RTh | 270                                 | 247  | 196  | 160  | 131   | 106   | 80    | 66    | 49    | 38    | 23    | 16    | 3     | 0     | 0     |
|                   | (2)                                 | (18) | (66) | (99) | (126) | (149) | (171) | (185) | (201) | (212) | (226) | (233) | (246) | (249) | (249) |

**Abbildung 8: Ereignisfreies Überleben aller Patientinnen und Patienten der UNFOLDER-Studie**

Dargestellt ist das ereignisfreie Überleben (EFS) von Patientinnen und Patienten in den Therapiearmen R-CHOP-21/14 ohne konsolidierende Radiation im Vergleich mit dem Therapiearm R-CHOP-21/14 ohne konsolidierende Radiatio. Darstellung modifiziert nach Thurner et al. [70].

### 3.2.8. Patientenkollektiv und Probenasservierung

In der UNFOLDER-Therapiestudie konnten 695 Patientinnen und Patienten mit aggressiven CD20-positiven B-Zell-Lymphomen im Alter von 18–60 Jahren während des Zeitraums von Januar 2006 bis November 2015 eingeschlossen und in der Intention-to-Treat-Analyse randomisiert werden [70]. Es standen von 414 Patientinnen und Patienten Blutproben für unsere Analysen zur Verfügung. Die Blutproben lagerten bis zur Analyse bei -20 °C in einem Labortiefkühlschrank (Robert Bosch GmbH) des José Carreras Instituts am Universitätsklinikum des Saarlandes.

### 3.2.9. Genehmigungen

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes mit dem Votum Nr. 139/04 genehmigt. Die genetischen Experimente wurden entsprechend der gültigen Gesetze der Landesregierung des Saarlandes durchgeführt.

### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. DNS-Isolation

Aus den 414 gesammelten Vollblutproben der UNFOLDER-Studie wurde DNS isoliert. Vorgegangen wurde dabei in Anlehnung an folgendes Protokoll: „Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells“ des DNeasy Blood & Tissue Handbook (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) [53]. Als Kit für die DNS-Isolation wurde das QiAmp-DNA-Blood-Mini-Kit für genomische DNS (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Vor der eigentlichen Extraktion wurden die EDTA-Vollblutproben der Studienteilnehmenden passiv auf Zimmertemperatur erwärmt. Die im Kit enthaltenen Puffer AW1 und AW2 lagen in Konzentratform vor und wurden mit der im Kit vorgesehenen Menge mind. 99,5 % Ethanol der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) auf das für den jeweiligen Puffer vorgeschriebene Volumen verdünnt. Die im Set enthaltene Protease wurde mit dem ebenfalls im Set enthaltenen Lösungsmittel in Lösung gebracht. Sowohl Puffer AL als auch Puffer AE wurden jeweils durch Schütteln gemischt.

In Schritt 1 der DNS-Extraktion wurden 20 µl Proteaselösung in ein Mikroreaktionsgefäß der Größe 1,5 ml pipettiert. In das gleiche Röhrchen wurden 200 µl einer vorbereiteten Vollblutprobe hinzugegeben.

Im Anschluss wurde der Puffer AL ohne zusätzlichen Alkohol in der Menge 200 µl hinzupipettiert. Über einen Vortexmischer wurde durch einen zehnhundertjährigen Rüttelvorgang eine homogene Lösung aus Lysat und Puffer erzielt. Danach wurde diese in einem auf 56 °C vorgeheizten Wasserbad für zehn Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 200 µl des 99,5 % Ethanols zu den Reagenzien hinzupipettiert und nochmals für zehn Sekunden im Vortexmischer gerüttelt. Durch das Ethanol wird das Löslichkeitsprodukt der DNS herabgesetzt und die DNS fällt aus [21]. Anschließend wurden die Deckelinnenseiten der Röhrchen von Flüssigkeitsrückständen bei 10.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für fünf Sekunden freizentrifugiert. Das gesamte Volumen wurde dann in eine 2 ml fassende Spin-Säule pipettiert, verschlossen, und in einem neuen Mikroreaktionsgefäß platziert. Dieses wurde wiederum bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Dabei verbleibt die DNS aufgrund einer speziellen Membran in der Spin-Säule. Das Mikroreaktionsgefäß inklusive Bodensatz wurde verworfen und die Spin-Säule in ein neues Röhrchen eingesetzt. In die Säule wurden 500 µl des Waschpuffers AW1 gegeben, verschlossen und in der Zentrifuge für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Vor einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die Spin-Säule abermals in ein neues Mikroreaktionsgefäß eingesetzt und 500 µl des Puffers AW2 in die Säule gegeben. Die Zentrifugation erfolgte nun bei 14.000 rpm für drei Minuten.

Der Bodensatz wurde verworfen und die Mikrozentrifugationssäule wieder in das entleerte Mikroreaktionsgefäß eingesetzt und erneut bei 14.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Dieser

Schritt dient dazu, die Membran der Spin-Säule zu trocknen, da noch vorhandenes Ethanol die weiteren Reaktionen beeinflussen könnte.

Für den letzten Schritt der DNS-Isolation, dem Eluierungsschritt, wurde die Spin-Säule in einem neuen Mikroreaktionsgefäß platziert. In die Säule wurden 200 µl Puffer AE pipettiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um danach für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert zu werden. Die Spin-Säule wurde entfernt und im Mikrozentrifugationsgefäß befand sich nun das Filtrat der gelösten DNS [53].

### 3.3.2. Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration

Um eine anschließende zielgerechte Probenverdünnung zu gewährleisten, wurde zunächst die Ausgangskonzentration der isolierten DNS photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte mittels NanoDrop ND-1000-Full-spectrum-UV/Vis-Spectrophotometer. Nach Nullen des Geräts mit 2 µl Puffer AE wurden zur Messung 2 µl des Filtrats mit der isolierten DNS aufgetragen. Zur Bestimmung der Reinheit der DNS ist das Verhältnis der Absorption der Probe bei der Wellenlänge von 260 Nanometern (nm) und bei 280 nm entscheidend. Dabei beschreibt ein Koeffizient von 1,8 eine hohe Reinheit der DNS. Bei einem Wert unterhalb von 1,8 ist von einer Präsenz von Proteinen, oder einer Kontamination auszugehen. Ein Koeffizient  $>2$  indiziert die Präsenz von Ribonukleinsäure (RNA). Neben des Absorptionskoeffizienten 260/280 ist die Menge der DNS in Nanogramm pro Mikroliter (ng/µl) zur späteren Verdünnung vor der PCR bedeutend.

### 3.3.3. Real-time-PCR zur Bestimmung des KIR-Genotyps

#### 3.3.3.1. Erstellung Masterplatte

Die isolierte DNS wurde auf 4 ng/µl verdünnt. Anhand einer Verdünnungsliste wurde die jeweilige Menge DNS mit einer Menge Puffer AE so verdünnt, dass ein Gemisch von 75 µl pro Kavität (engl.: well) der Masterplatte (96-Well-Mikrotiterplatte) in der Konzentration 4 ng/µl vorlag. Das Well A1 wurde als negative Kontrolle mit 75 µl Puffer AE aufgefüllt. Im Well A2 wurde als Positivkontrolle eine Referenzprobe DNS mit einer Ausgangskonzentration von 160,5 ng/µl ebenfalls mit Puffer AE auf die Menge 4 ng/µl verdünnt. Pro Masterplatte konnten also exklusive der Kontrollfelder 94 Proben für die PCR und anschließende Schmelzpunktanalyse herangezogen werden. Bis zur Analyse der jeweiligen KIR-spezifischen PCR-Platte lagerte die Masterplatte bei 4 °C im Laborkühlschrank.

### 3.3.3.2. Mastermix

Der SYBR-Green-Mastermix der Firma Thermo Fisher Scientific enthält neben dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, thermostabile Heißstart-DNS-Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und Puffer .

Im TaqMan-Gtxpress-Mastermix der Firma Thermo Fisher sind der passive Referenzfarbstoff 5-Carboxy-Rhodamin-X (ROX), thermostabile Heißstart-DNS-Polymerase, dNTPs und Puffer enthalten (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: PCR-Mastermix**

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>Mastermix KIR-Analyse</b> | Mastermix: appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific; SYBR® Green PCR Mastermix. LOT: 1903523. REF: 4309155       |
| <b>Mastermix SNP-Analyse</b> | Mastermix SNP: appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific; TaqMan® GTxpress Mastermix. LOT: 00837125. REF: 4403311 |

### 3.3.3.3. Erstellung Primermix

Für die Analyse der 17 KIR-Genotypen wurde der Primermix für fünf PCR-Platten mit jeweils 96 Wells erstellt. Pro zu bestimmendem KIR sollte das Gesamtvolumen 1020,4 µl betragen. Für die KIR-Gene KIR2DS1, KIR3DL1 und KIR3DS1 besteht das Primerset jeweils aus zwei spezifischen Forward-Primern und einem spezifischen Reverse-Primer. Bei allen anderen KIR-Genen waren jeweils ein spezifischer Forward-Primer sowie ein spezifischer Reverse-Primer zu verwenden.

### 3.3.3.4. PCR-Platte

Die für die KIR-Analyse benötigte Zusammensetzung ist in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der PCR-Platte zur KIR-Analyse**

| Inhalt             | SYBR® Green I<br>Mastermix | Primermix | DNS | <b>Gesamtmenge<br/>pro Well</b> |
|--------------------|----------------------------|-----------|-----|---------------------------------|
| <b>Menge in µl</b> | 5                          | 2         | 3   | 10                              |

3.3.3.5. PCR-Protokoll

Im Gegensatz zur Sequenz-spezifischen-Oligonukleotid-PCR (PCR-SSO), bei der sich an die DNS-Amplifikation eine komplexe Nachbearbeitung und Interpretation anschließt, oder einer PCR, an deren Anschluss eine Argarose-Gel-Elektrophorese mit gesundheitsgefährdendem Ethidiumbromid nötig ist, wurde eine Real-time-PCR-Methode mit Sequenz-spezifischen-Primern (PCR-SSP) angewendet, bei der auch eine geringe Menge DNS zur Amplifikation ausreicht. Das verwendete Protokoll sieht eine zweiminütige Initiationsphase bei 50 °C vor. In der anschließenden zehnminütigen Phase kommt es bei 95 °C zur Aktivierung der Heißstart-Polymerase und zur DNS-Denaturierung. Es folgten 40 Zyklen, bestehend aus einer 15-sekündigen Phase der DNS-Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von einer einminütigen Phase der Primer-Anlage bei 62 °C an die einsträngige DNS-Matrize. Beendet wurde ein Zyklus im Elongationsschritt durch die Anlage von dNTPs und der Synthese des neuen, komplementären Strangs durch die DNS-Polymerase (siehe Tabelle 12) [3].

Tabelle 12: PCR-Protokoll zur KIR-Analyse

| Anzahl Zyklen | Reaktionsphasen  | Temperatur | Dauer       |
|---------------|--|------------|-------------|
| -             | Initiation   | 50 °C      | 2 Minuten   |
| -             | Aktivierung Heißstart Polymerase                               | 95 °C      | 10 Minuten  |
| 40            | Denaturierung  | 95 °C      | 15 Sekunden |
|               | Primer-Anlage<br>Elongation;<br>Synthese<br>Komplementärstrang | 62 °C      | 1 Minute    |

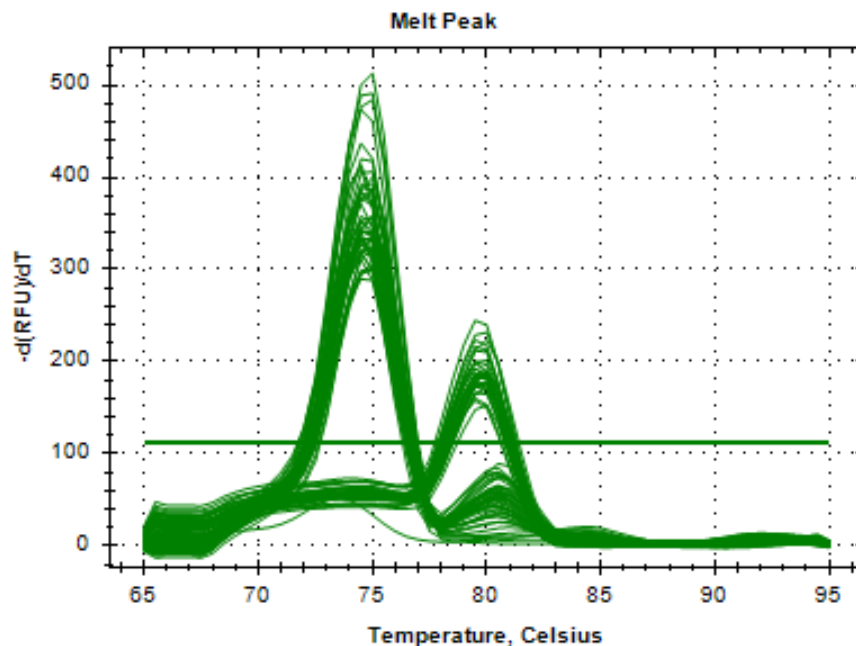
Für 15 der 17 zu untersuchenden KIR-Genotypen wurde das identische PCR-Protokoll mit Schmelzpunktanalyse verwendet. Zur Analyse der Genotypen KIR2DS1 und KIR2DS3 wurde ein zweites, optimiertes PCR-Protokoll angewendet. Dieses unterscheidet sich durch eine veränderte Annealingtemperatur von 63,5 °C anstatt 62,0 °C.

Bei der Analyse der Schmelzpunkte war unter Verwendung der ursprünglichen Annealingtemperatur von 62,0 °C eine Zuordnung der KIR nicht eindeutig möglich. Es bestand der Verdacht, dass sich neben den KIR2DS1 bzw. KIR2DS3 auch andere Genotypen amplifizierten. Witt et al. gelang es in ihrer KIR-Analyse, durch Erhöhung der Annealingtemperaturen auf 64,0 °C während der PCR, eine unspezifische Produktbildung zu reduzieren [77].

Durch empirische Ermittlung, unter Optimierung der Parameter, konnte unsere Arbeitsgruppe durch das Anheben der Annealingtemperatur auf 63,5 °C ebenfalls die Spezifität der PCR für diese Genotypen erhöhen.

### 3.3.3.6. Schmelzpunktbestimmung

Im gleichen PCR-Protokoll schließt sich an die DNS-Amplifikation eine Schmelzpunktbestimmung an (siehe Abbildung 9). Dabei denaturiert die DNS-Probe, welche den spezifischen KIR-Genotyp nicht enthält, bei einer geringeren Temperatur als die DNS-Probe, welche den KIR-Genotypen enthält. Im Mittel lag der Schmelzpunkt bei 75,0 °C für nicht-regulierende Gene (GALC). Bei den jeweiligen KIR-Amplikons lag der Schmelzpunkt zwischen 80,5 °C und 87,5 °C. Es ist also die Schmelzpunktanalyse, nicht die DNS-Amplifikation, welche für die eigentliche Bestimmung der KIR-Genotypen ausschlaggebend ist.



**Abbildung 9: DNS-Schmelzpunktkurve KIR2DS1**

Bei einer negativen Änderungsrate von 300 Relative Fluorescence Units/Time (-d(RFU)/dT) und einer Temperatur von 74,5 °C denaturiert die DNS der Proben, welche den Genotyp KIR2DS1 nicht enthalten. Im Bereich zwischen 140 und 250 -dRFU/dT und einer Temperatur von 79,5 °C denaturiert die DNS der Proben, welche den Genotyp KIR2DS1 enthalten [3].

### 3.3.3.7. Sequenzspezifische Fluoreszenzsonden

Durch die Real-time-Multiplex-PCR besteht die Möglichkeit, verschiedene Zielsequenzen in einer Reaktion zu quantifizieren. Sequenzspezifische Fluoreszenzsonden werden mit Fluorophoren versehen, die sich möglichst signifikant im Emissionsspektrum unterscheiden (siehe Tabelle 13) [21].

**Tabelle 13: Charakteristika der Fluoreszenzfarbstoffe**

| <b>Farbstoff</b> | <b>Anregungsmaximum (nm)</b> | <b>Emissionsmaximum (nm)</b> |
|------------------|------------------------------|------------------------------|
| SYBR® Green I    | 494                          | 521                          |
| FAM              | 494                          | 518                          |
| VIC              | 538                          | 552                          |

### 3.3.4. SNP-Assay zur Bestimmung des HLA-C-Status

Zur Bestimmung der HLA-C-Allel-Frequenz werden im Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP)-Assay durch eine Real-time-PCR mit zwei sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden mehrere Zielsequenzen von Einzelnukleotid-Polymorphismen detektiert (siehe Tabelle 15). Als quantitative PCR-Methode binden im Anschluss an die Denaturierung der DNS neben den sequenzspezifischen Forward- und Reverse-Primern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Sonden an die komplementäre Nukleotidsequenz. Durch die Aktivität des an die Sonde gebundenen Unterdrückerfarbstoffes (Quencher) in der Nähe der Reporterfarbstoffe (VIC, FAM), wird vor der Amplifizierung die Fluoreszenz unterdrückt. Im Zuge der Neustrangsynthese spaltet die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase die Fluoreszenzsonden hydrolytisch, wodurch Quencher und Reporterfarbstoff getrennt voneinander vorliegen. Das durch den Reporterfarbstoff freigesetzte Fluoreszenzsignal macht anhand der spezifisch emittierten Wellenlänge eine Zuordnung zum verwendeten Reporterfarbstoff, und damit auch zum in der Probe vorhandenen Allel, möglich (siehe Abbildung 10) [21].

Eine alleinige Zunahme des Fluoreszenzsignals für FAM zeigt ein homozygoten Allel 1 an, während die alleinige Zunahme des Fluoreszenzsignals für VIC auf ein homozygoten Allel 2 hinweist. Bei gleichzeitiger Emission beider Fluoreszenzsignale (VIC und FAM) ist die betreffende Probe durch Vorliegen beider Allele 1 und 2 als heterozygot bestimmt.

3.3.4.1. PCR-Reaktionsbedingungen

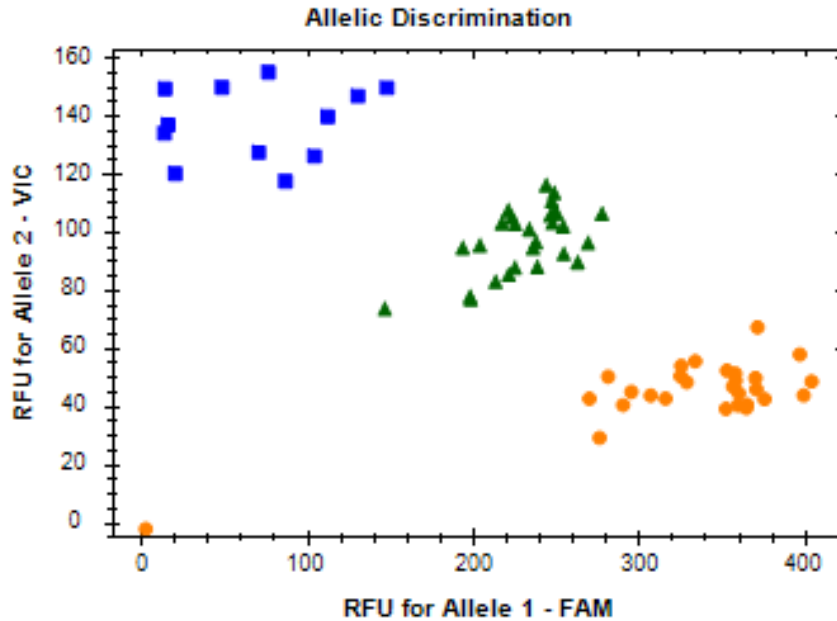
Die für die HLA-C-Analyse benötigte Zusammensetzung ist in Tabelle 14 dargestellt. Das verwendete PCR-Protokoll zur HLA-C-Analyse ist in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der PCR-Platte zur HLA-C-Analyse**

| <b>Inhalt</b>      | TaqMan®<br>Universal PCR<br>Mastermix | TaqMan®<br>Genotyping<br>Assay Mix | DNS  | <b>Gesamtmenge<br/>pro Well</b> |
|--------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------|---------------------------------|
| <b>Menge in µl</b> | 2,5                                   | 0,25                               | 2,25 | 5                               |

**Tabelle 15: PCR-Protokoll zur HLA-C-Analyse**

| <b>Reaktionsphase</b>          | <b>Temperatur in °C</b> | <b>Dauer</b> | <b>Anzahl Zyklen</b> |
|--------------------------------|-------------------------|--------------|----------------------|
| Enzymaktivierung               | 95                      | 10 Minuten   | -                    |
| Denaturierung                  | 95                      | 15 Sekunden  | 40                   |
| Primer-Anlage und<br>Extension | 60                      | 1 Minute     |                      |



**Abbildung 10: Diskriminierung allelspezifischer Sonden**

Im Anschluss an die PCR werden die allelspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe freigesetzt. Eine Homozygotie für Allel 2 wird durch den Fluoreszenzfarbstoff VIC (blaue Quadrate) angezeigt, eine Homozygotie für Allel 1 indiziert den Fluoreszenzfarbstoff FAM (gelbe Kreise). Eine Heterozygotie aus Allel 1 und Allel 2 ist dazwischen dargestellt (grüne Dreiecke). Je nach Intensität des freigesetzten Signalfarbstoffs der jeweiligen Probe variiert die Position der Probe entlang der X- und Y-Achse. Die Negativkontrolle wird durch die Software ebenfalls durch einen gelben Kreis dargestellt.

### 3.4. Statistische Auswertung

Für die vergleichende Analyse der Baseline-Charakteristika des UNFOLDER-Kollektivs und des untersuchten Kollektivs wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Bei einer Stichprobengröße von  $n < 20$  kam der exakte Test nach Fisher zur Anwendung. Für den Vergleich des KIR- und HLA-C-Status zwischen untersuchtem Kollektiv und der Normalbevölkerung wurde ebenfalls der Chi-Quadrat-Test angewandt. Für den Vergleich der durchgeführten Studientherapie des UNFOLDER-Kollektivs und des untersuchten Kollektivs kam erneut der Chi-Quadrat-Test zur Anwendung.

Die Überlebenszeiten EFS, PFS und OS wurden mittels Kaplan-Meier-Methode geschätzt und im Anschluss per Log-Rank-Test verglichen. Zur Abschätzung der Hazard Ratio wurde in den multivariaten Analysen die Cox-Regression (Cox Proportional-hazard Model) verwendet. Ab einem p-Wert von 0,05 oder kleiner wurden Unterschiede zwischen Gruppen als statistisch signifikant definiert. Die statistischen Tests wurden mit Hilfe der Software SPSS (Version 29.0.1.1.) durchgeführt.

Einige der statistischen Analysen, wie die Überlebenszeitanalysen zu KIR2DS1 und HLA-C, wurden durch das Institut für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig (IMISE) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der UNFOLDER-Therapiestudie

Von den insgesamt 695 eingeschlossenen Patientinnen und Patienten der UNFOLDER-Therapiestudie der DSHNHL lagen Blutproben von 414 Patientinnen und Patienten zur Analyse am José Carreras Institut für Immun- und Genterapie des Univeristätsklinikums des Saarlandes vor. Von allen 414 Patientinnen und Patienten konnten der KIR2DS1- und HLA-C-Status mit den o.g. Analysen zweifelsfrei bestimmt werden.

In einer nach 66 Monaten erfolgten Zwischenauswertung waren die Therapiearme mit erfolgter Strahlentherapie den Therapiearmen ohne Strahlentherapie im Bezug auf den Endpunkt EFS signifikant überlegen: 84 % (95 %-CI: 80–89) vs. 68 % (95 %-CI: 61–76);  $p = 0,001$ . Dies war durch ein teilweises Ansprechen des Tumors (PR), auf die Behandlung im Therapiearm mit erfolgter Strahlentherapie zurückzuführen (2 % vs. 11 %). Ein teilweises Ansprechen des Tumors hatte ohne das Vorliegen einer FDG-PET/CT-Analyse, welche zum Zeitpunkt des Studienentwurfs nicht in die Studie integriert war, aus Unsicherheit der lokalen Investigatoren meist eine zusätzliche Strahlentherapie zur Folge, welche im Therapiearm ohne Strahlentherapie als Event definiert war. In Bezug auf die Endpunkte PFS (89 % vs. 81 %;  $p = 0,221$ ) und OS (93 % vs. 93 %;  $p = 0,506$ ) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Durch multivariate Analysen (siehe Tabelle 16) wurden diese Ergebnisse bestätigt [70].

**Tabelle 16: Multivariate Analyse der Zwischenauswertung**

| Studientherapie   | Event Free Survival                             | Progression Free Survival    | Overall Survival             |
|---|---|------------------------------|------------------------------|
|   | Hazard Ratio; (95 %-Konfidenzintervall); p-Wert |                              |                              |
| 6x R-CHOP 21/14+RTx (n = 305)<br>vs.<br>6x R-CHOP 21/14 (n = 162) | 0,5; (0,4–0,8);<br>p = 0,001                    | 0,7; (0,5–1,1);<br>p = 0,174 | 1,2; (0,6–2,2);<br>p = 0,674 |

4.2. Baseline-Charakteristika aller Patientinnen und Patienten der UNFOLDER-Studie und Charakteristika der untersuchten Population

Zwischen dem gesamten UNFOLDER-Studienkollektiv und dem untersuchten Kollektiv lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede der Baseline-Charakteristika vor (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17: Baseline-Charakteristika des UNFOLDER-Kollektivs und des untersuchten Kollektivs**

| <b>Charakteristika</b>   | <b>UNFOLDER-Kollektiv (n = 695)</b> | <b>Untersuchtes Kollektiv (n = 414)</b> | <b>p-Wert</b> |
|--------------------------|-------------------------------------|---|---------------|
| Geschlecht:              |                                     |   |               |
| Männlich                 | 403 (58,0 %)                        | 233 (56,3 %)                            | 0,579         |
| Weiblich                 | 292 (42,0 %)                        | 181 (43,7 %)                            |               |
| Alter (in Jahren):       |                                     |   |               |
| Mittelwert               | 44,7                                | 44,92                                   | 0,507         |
| Median                   | 47,0                                | 47,0                                    |               |
| Variationsbreite         | 18–60                               | 18–60                                   |               |
| LDH > oberer Normwert    | 293 (42,2 %)                        | 175 (42,3 %)                            | 0,971         |
| ECOG > 1                 | 3 (0,4 %)                           | 2 (0,5 %)                               | 1,000         |
| IPI stage III/IV         | 296 (42,6 %)                        | 180 (43,5 %)                            | 0,773         |
| IPI 0                    | 111 (16,0 %)                        | 63 (15,2 %)                             | 0,738         |
| IPI 1                    | 576 (82,9 %)                        | 345 (83,3 %)                            | 0,845         |
| IPI 2                    | 8 (1,1 %)                           | 6 (1,4 %)                               | 0,782         |
| Bulk-Manifestation       | 396 (57,0 %)                        | 234 (56,5 %)                            | 0,882         |
| >1 extranodaler Befall   | 324 (46,6 %)                        | 202 (48,8 %)                            | 0,483         |
| B-Symptomatik            | 152 (21,9 %)                        | 78 (18,8 %)                             | 0,229         |
| Knochenmarksinfiltration | 41 (5,9 %)                          | 29 (7,0 %)                              | 0,464         |

4.3. Durchgeführte Therapie im UNFOLDER- und untersuchten Kollektiv

Von den insgesamt 695 Patientinnen und Patienten des UNFOLDER-Studienkollektivs war bei 467 die Qualifikation zur Radiotherapie gegeben. Davon erhielten 81 Patientinnen und Patienten sechs Zyklen R-CHOP-21 und weitere 81 davon erhielten sechs Zyklen R-CHOP-14. Beide Gruppen erhielten keine zusätzliche Radiotherapie. 155 der Patientinnen und Patienten erhielten sechs Zyklen R-CHOP-21 und 150 Patientinnen und Patienten R-CHOP-14, jeweils mit zusätzlicher Radiotherapie. Von den 228 Patientinnen und Patienten ohne Qualifikation zur Radiotherapie erhielten 114 sechs Zyklen R-CHOP-21 und 114 sechs Zyklen R-CHOP-14 ohne zusätzliche Radiotherapie (siehe Abbildung 11).

Von den 414 Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs war bei 283 die Qualifikation zur Radiotherapie gegeben. Davon erhielten 49 Patientinnen und Patienten sechs Zyklen R-CHOP-21 bzw. 40 sechs Zyklen R-CHOP-14 ohne zusätzliche Radiotherapie. 96 Patientinnen und Patienten erhielten sechs Zyklen R-CHOP-21 und 98 erhielten R-CHOP-14, jeweils mit zusätzlicher Radiotherapie. Von den 131 Patientinnen und Patienten ohne Qualifikation zur Radiotherapie erhielten 62 sechs Zyklen R-CHOP-21 und 69 sechs Zyklen R-CHOP-14 ohne zusätzliche Radiotherapie (siehe Abbildung 11).

Zwischen dem gesamten UNFOLDER-Studienkollektiv und dem untersuchten Kollektiv lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Verteilung der verschiedenen Studientherapien vor (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18: Durchgeführte Studientherapie im UNFOLDER-Gesamtkollektiv und im Untersuchungskollektiv**

| Studientherapie                                   | Qualifiziert für Radiotherapie |                |                     |                     | Nicht qualifiziert für Radiotherapie |                 |
|---|--------------------------------|----------------|---------------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------|
|   | 6 x R-CHOP-21                  | 6 x R-CHOP-14  | 6 x R-CHOP-21 + RTx | 6 x R-CHOP-14 + RTx | 6 x R-CHOP-21                        | 6 x R-CHOP-14   |
| <b>Patientenkollektiv UNFOLDER (n = 695)</b>      | 81<br>(11,7 %)                 | 81<br>(11,7 %) | 155<br>(22,3 %)     | 150<br>(21,6 %)     | 114<br>(16,5 %)                      | 114<br>(16,5 %) |
| <b>Patientenkollektiv KIR2DS1/HLA-C (n = 414)</b> | 49<br>(11,8 %)                 | 40<br>(9,7 %)  | 96<br>(23,2 %)      | 98<br>(23,7 %)      | 62<br>(15,0 %)                       | 69<br>(16,7 %)  |
| <b>p-Wert</b>                                     | 0,992                          | 0,247          | 0,837               | 0,479               | 0,525                                | 0,907           |

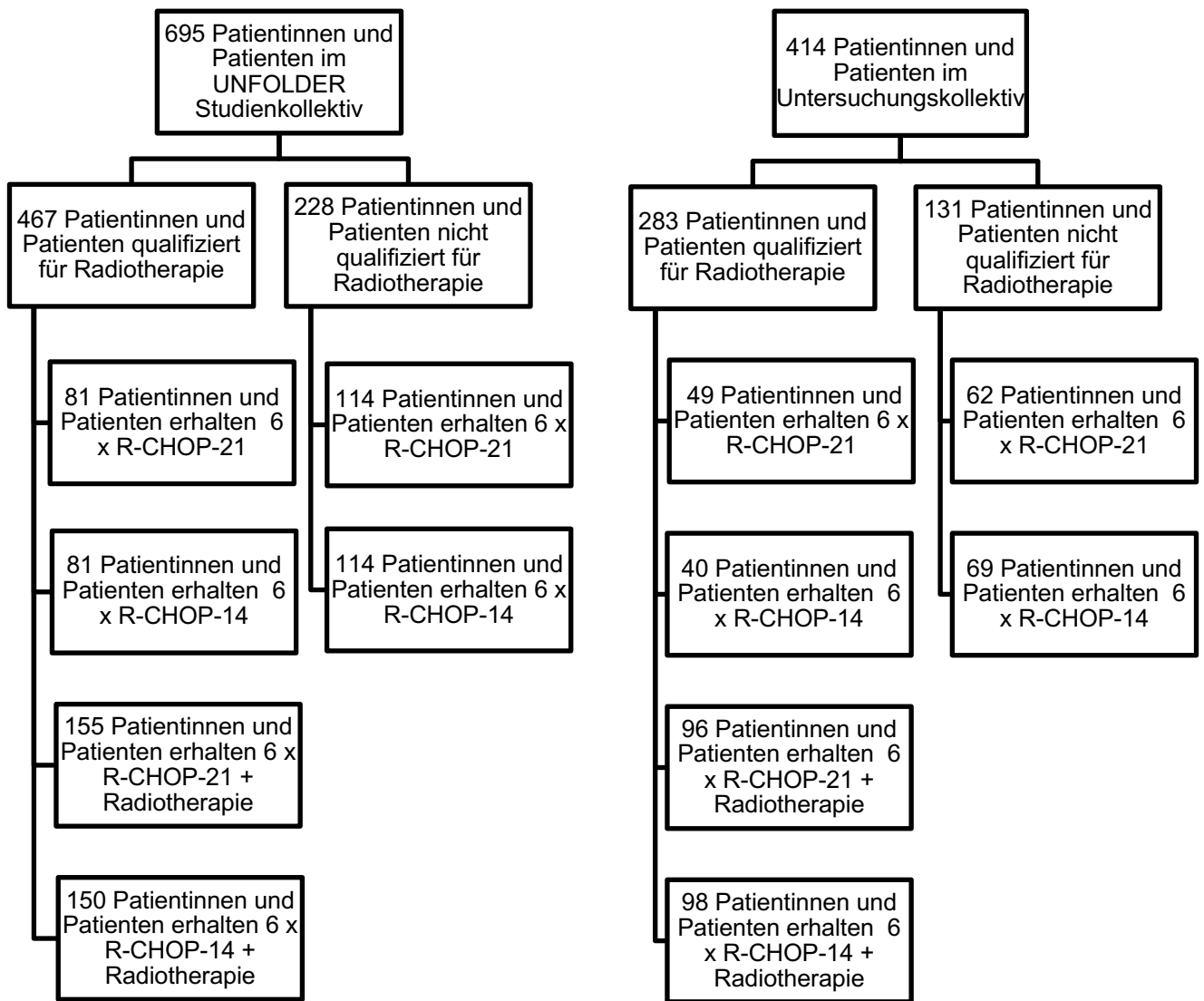


Abbildung 11: Flussdiagramm UNFOLDER-Studienkollektiv und Untersuchungskollektiv

#### 4.4. Verteilung von KIR2DS1 und HLA-C

Von den 414 untersuchten Patientinnen und Patienten trugen 175 (42,3 %) den KIR2DS1-Genotyp, während 239 (57,7 %) diesen KIR-Genotyp nicht aufwiesen.

Bezüglich des HLA-C-Status waren 201 (48,6 %) Patientinnen und Patienten HLA-C1/C2-heterozygote Träger, 147 (35,5 %) Patientinnen und Patienten waren HLA-C1-homozygote und 66 (15,9 %) waren HLA-C2-homozygote Träger. Eine kombinierte Positivität für KIR2DS1 und HLA-C2/C2 wiesen 27 (6,5 %) Patientinnen und Patienten auf (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19: Vorkommen von KIR2DS1 und HLA-C bei Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs**

|                        | <b>HLA-C1/C2</b> | <b>HLA-C1/C1</b> | <b>HLA-C2/C2</b> | <b>Total</b> |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| <b>KIR2DS1 negativ</b> | 109 (26,3 %)     | 91 (22 %)        | 39 (9,4 %)       | 239 (57,7 %) |
| <b>KIR2DS1 positiv</b> | 92 (22,2 %)      | 56 (13,5 %)      | 27 (6,5 %)       | 175 (42,3 %) |
| <b>Total</b>           | 201 (48,6 %)     | 147 (35,5 %)     | 66 (15,9 %)      | 414 (100 %)  |

Im Vergleich des UNFOLDER-Kollektivs mit der deutschen Normalbevölkerung lagen in Bezug auf den KIR-Status (siehe Tabelle 24), mit Ausnahme von KIR2DL1 und KIR2DS3, keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

##### 4.4.1 Assoziationen der Baseline-Charakteristika mit KIR2DS1 und HLA-C2/C2

Zwischen dem gesamten untersuchten Kollektiv (n = 414) und den Patientinnen und Patienten mit kombinierter Positivität aus KIR2DS1 und HLA-C2/C2 (n = 27) lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede zum Gesamtkollektiv in Bezug auf die Baseline-Kriterien vor (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Assoziationen der Baseline-Charakteristika mit KIR2DS1 und HLA-C2/C2

| Charakteristika          | Untersuchtes Kollektiv (n = 414) | KIR2DS1 und HLA-C2/C2 (n = 27) | p-Wert |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------|
| Geschlecht:              |                                  |                                |        |
| Männlich                 | 233 (56,3 %)                     | 15 (55,6 %)                    | 0,902  |
| Weiblich                 | 181 (43,7 %)                     | 12 (44,4 %)                    |        |
| Alter (in Jahren):       |                                  |                                |        |
| Mittelwert               | 44,9                             | 48,7                           | 0,088  |
| Median                   | 47,0                             | 51,5                           |        |
| Variationsbreite         | 18–60                            | 16–60                          |        |
| LDH > oberer Normwert    | 175 (42,3 %)                     | 12 (44,4 %)                    | 0,444  |
| ECOG > 1                 | 2 (0,5 %)                        | 0                              | -      |
| IPI stage III/IV         | 180 (43,5 %)                     | 14 (51,9 %)                    | 0,305  |
| IPI 0                    | 63 (15,2 %)                      | 2 (7,4 %)                      | 0,302  |
| IPI 1                    | 345 (83,3 %)                     | 24 (88,9 %)                    | 0,197  |
| IPI 2                    | 6 (1,4 %)                        | 1 (3,7 %)                      | 0,338  |
| Bulk-Manifestation       | 234 (56,5 %)                     | 17 (63,9 %)                    | 0,398  |
| >1 extranodaler Befall   | 202 (48,8 %)                     | 7 (25,9 %)                     | 0,252  |
| B-Symptomatik            | 78 (18,8 %)                      | 5 (18,5 %)                     | 0,947  |
| Knochenmarksinfiltration | 29 (7,0 %)                       | 0                              | -      |

#### 4.4.2. PMBCL-Subgruppe und Verteilung von KIR2DS1 und HLA-C

In Voruntersuchungen durch Thurner et al. konnte gezeigt werden, dass die Subgruppe der Patientinnen und Patienten mit PMBCL mit einem ausgeprägt günstigen Verlauf assoziiert war [70].

Von den 414 im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Patientinnen und Patienten wiesen 81 (19,6 %) in der Referenzpathologie ein PMBCL auf, während 333 (80,4 %) kein PMBCL aufwiesen (siehe Tabelle 21). Von 175 (42,3 %) Patientinnen und Patienten mit positivem KIR2DS1-Genotyp wiesen 32 (18,3 %, bzw. 7,8 % des Untersuchungskollektivs) ein PMBCL auf und 143 (81,7 %, bzw. 34,5 % des Untersuchungskollektivs) Patientinnen und Patienten wiesen kein PMBCL auf (siehe Tabelle 21). Es konnte somit kein signifikanter Unterschied der

Patientinnen und Patienten mit PMBCL in Bezug auf den KIR2DS1-Status im Vergleich zu jenen ohne diesen Subtyp festgestellt werden (Odds Ratio (OR): 0,86; 95 %-CI: 0,54–1,36; p = 0,63).

**Tabelle 21: KIR2DS1-Status bei Patientinnen und Patienten mit und ohne PMBCL**

|                   | <b>KIR2DS1-negativ</b> | <b>KIR2DS1-positiv</b> | <b>Total</b>     |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------|
| <b>PMBCL</b>      | 49/239 (20,5 %)        | 32/175 (18,3 %)        | 81/414 (19,6 %)  |
| <b>Kein PMBCL</b> | 190/239 (79,5 %)       | 143/175 (81,7 %)       | 333/414 (80,4 %) |
| <b>Total</b>      | 239 (57,7 %)           | 175 (42,3 %)           | 414              |

Im Vergleich der Patientenkollektive mit und ohne PMBCL je nach HLA-C-Status, wiesen von den insgesamt 66 (15,9 %) Patientinnen und Patienten mit HLA-C2/C2-Status 15 (22,7 % bzw. 3,6 % des Untersuchungskollektivs) auch ein PMBCL auf (siehe Tabelle 22). Von den 348 (84,1 %) Patientinnen und Patienten mit anderem HLA-C-Status wiesen 66 (19 %, bzw. 15,9 % des Untersuchungskollektivs) ein PMBCL auf (Tabelle 22). Der Unterschied in der Häufigkeit des HLA-C2/C2-Status zwischen Patientinnen und Patienten mit oder ohne PMBCL ist somit nicht signifikant (OR: 1,25; 95 %-CI: 0,67–2,26; p-Wert = 0,46).

**Tabelle 22: HLA-C-Status bei Patientinnen und Patienten mit und ohne PMBCL**

|                   | <b>HLA-C2/C2</b> | <b>HLA-C1/C1 bzw.<br/>HLA-C1/C2</b> | <b>Total</b> |
|-------------------|------------------|-------------------------------------|--------------|
| <b>PMBCL</b>      | 15/66 (22,7 %)   | 66/348 (19,0 %)                     | 81 (19,6 %)  |
| <b>Kein PMBCL</b> | 51/66 (77,3 %)   | 282/348 (81,0 %)                    | 333 (80,4 %) |
| <b>Total</b>      | 66 (15,9 %)      | 348 (84,1 %)                        | 414          |

Von den 27 (6,5 %) Patientinnen und Patienten mit einer kombinierten Positivität für KIR2DS1 und HLA-C2/C2 wiesen 4 (14,8 %, bzw. 1 % des Untersuchungskollektivs) ein PMBCL auf (siehe Tabelle 23). Von den 387 (93,6 %) Patientinnen und Patienten, die nicht diese Kombination aus positivem KIR2DS1- und HLA-C2/C2-Status aufwiesen, lag bei 77 (19,9 %, bzw. 18,6 % des Untersuchungskollektivs) ein PMBCL vor (siehe Tabelle 23). Die Häufigkeit einer kombinierten Positivität von KIR2DS1 und HLA-C2/C2 unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant zwischen PMBCL-Patientinnen und -Patienten und Nicht-PMBCL-Patientinnen und -Patienten (OR: 0,69; 95 %-CI: 0,23–2,01; p-Wert: 0,53).

ERGEBNISSE

**Tabelle 23: KIR2DS1- und HLA-C-Status bei Patientinnen und Patienten mit und ohne PMBCL**

|                   | <b>KIR2DS1 positiv<br/>und HLA-C2/C2</b> | <b>Alle anderen<br/>Patientinnen und<br/>Patienten</b> | <b>Total</b>     |
|-------------------|--|--|------------------|
| <b>PMBCL</b>      | 4/27 (14,8 %)                            | 77/387 (19,9 %)  | 81/414 (19,6 %)  |
| <b>Kein PMBCL</b> | 23/27 (85,2 %)                           | 310/387 (80,1 %)                                       | 333/414 (80,4 %) |
| <b>Total</b>      | 27 (6,5 %)                               | 387 (93,6 %)   | 414              |

Somit zeigte sich in keiner der untersuchten genetischen Konstellationen, weder für KIR2DS1 allein noch für HLA-C2/C2, noch für die kombinierte Positivität von KIR2DS1 und HLA-C2/C2 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen und Patienten mit PMBCL und solchen ohne PMBCL.

**Tabelle 24: KIR-Prävalenz im UNFOLDER-Studienkollektiv und in der deutschen Bevölkerung**

| <b>KIR<br/>positiv/total</b> | <b>UNFOLDER</b>  | <b>Deutsche<br/>Population</b> | <b>p-Wert</b> |
|------------------------------|------------------|--------------------------------|---------------|
| 2DL1                         | 405/414 (97,8 %) | 181/199 (91 %)                 | <0,001        |
| 2DL2                         | 221/414 (53,4 %) | 101/199 (50,8 %)               | 0,542         |
| 2DL3                         | 367/414 (88,6 %) | 181/199 (91 %)                 | 0,385         |
| 2DL4                         | 414/414 (100 %)  | 99/99 (100 %)                  | -             |
| 2DS1                         | 175/414 (42,3 %) | 74/199 (37,2 %)                | 0,230         |
| 2DS2                         | 223/414 (53,9 %) | 102/199 (51,3 %)               | 0,545         |
| 2DS3                         | 137/414 (33,1 %) | 45/199 (22,6 %)                | 0,008         |
| 2DS4                         | 381/414 (92 %)   | 189/199 (95 %)                 | 0,181         |
| 2DS5                         | 133/414 (32,1 %) | 27/99 (27,2 %)                 | 0,349         |
| 3DL1                         | 381/414 (92 %)   | 186/199 (93,5 %)               | 0,527         |
| 3DL2                         | 414/414 (100 %)  | 99/99 (100 %)                  | -             |
| 3DS1                         | 166/414 (40,1 %) | 71/199 (35,7 %)                | 0,293         |

Deutsche Population bestehend aus „DKMS Germany KIR“ und „Germany Hesse KIR“ -allele frequencies.net

Den HLA-C-Status betreffend (siehe Tabelle 25) lag für HLA-C2-Homozygotie im Vergleich mit der Vergleichspopulation „Germany Essen“ kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Für HLA-C1-Homozygotie und HLA-C1/C2-Heterozygotie lagen keine Daten zu einer Vergleichskohorte vor.

**Tabelle 25: HLA-C-Prävalenz im UNFOLDER-Studienkollektiv und in der deutschen Bevölkerung**

| <b>HLA positiv/total</b> | <b>UNFOLDER</b>  | <b>Deutsche Population</b> | <b>p-Wert</b> |
|--------------------------|------------------|----------------------------|---------------|
| C1/C2                    | 201/414 (48,6 %) | -                          | -             |
| C1/C1                    | 147/414 (35,5 %) | -                          | -             |
| C2/C2                    | 66/414 (15,9 %)  | 35/174 (20,1 %)            | 0,221         |

Deutsche Population bestehend aus „Germany Essen“-allelefreqencies.net

#### 4.5. Outcome-Assoziationen

##### 4.5.1. KIR2DS1

Eine KIR2DS1-Positivität lag bei insgesamt 175 (42,3 %) Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs (n = 414) vor (siehe Tabelle 19). In der univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer (siehe Abbildung 12) zeigten die Patientinnen und Patienten mit positivem KIR2DS1-Status gegenüber den 239 (57,7 %) Patientinnen und Patienten mit KIR2DS1-negativem Status in Bezug auf das EFS, das PFS und das OS keine statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen. In der mittels Cox-Regression durchgeführten multivariaten Analyse (siehe Tabelle 26) konnten die statistisch nicht signifikanten Outcome-Assoziationen in Bezug auf das EFS: HR 1,1; (95 %-CI: 0,7–1,6); p = 0,75, das PFS: HR 1,0; (95 %-CI: 0,6–1,6); p = 0,97 und das OS: HR 0,8; (95 %-CI: 0,4–1,6); p = 0,53 bei KIR2DS1-Positivität gegenüber negativem KIR2DS1-Status bestätigt werden.

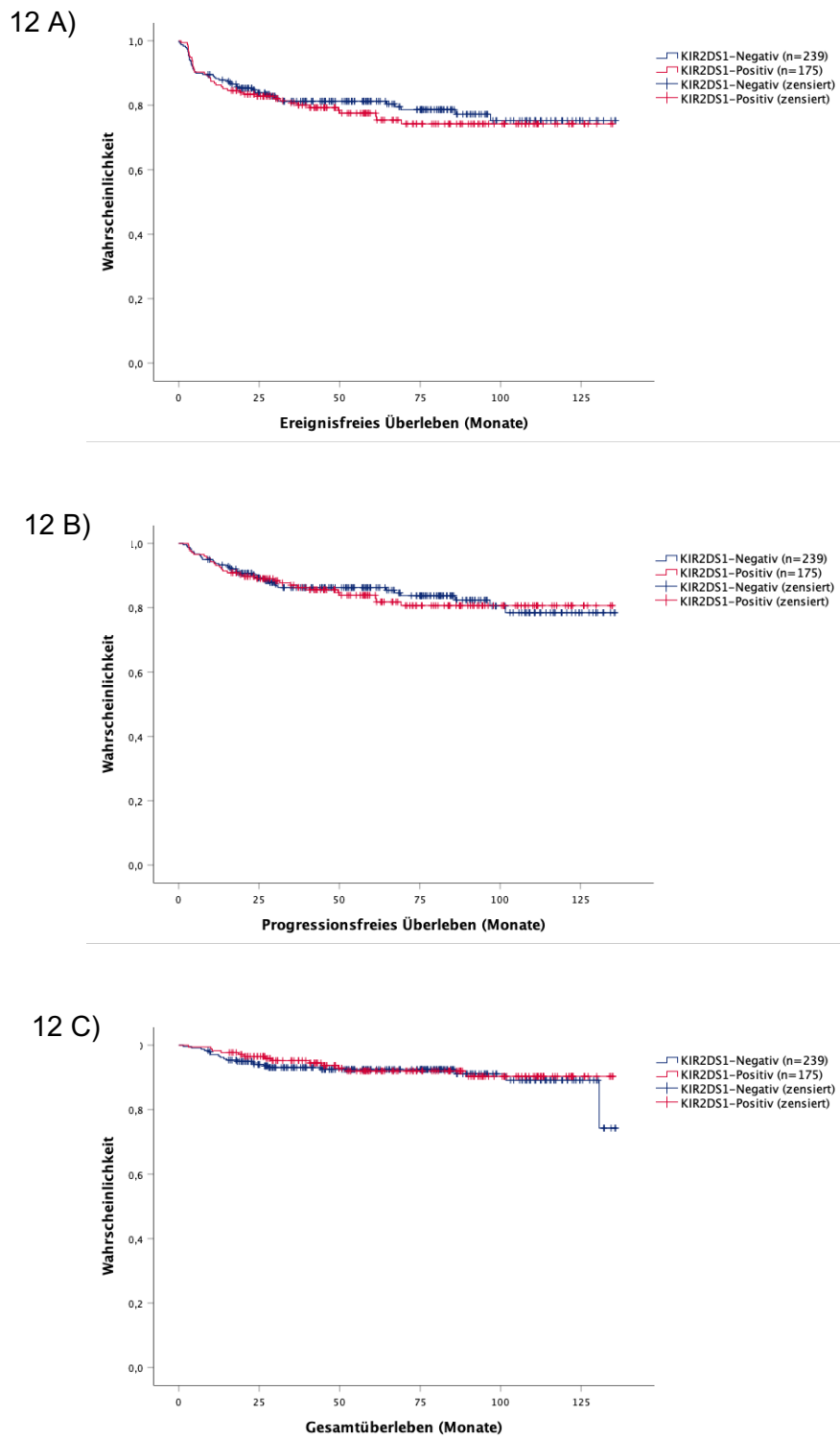
##### 4.5.2. HLA-C

Von den 414 Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs waren 201 (48,6 %) HLA-C1/C2-heterozygot. 147 (35,5 %) Patientinnen und Patienten waren HLA-C1-homozygot und 66 (15,9 %) HLA-C2-homozygot (siehe Tabelle 19). In der univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer (siehe Abbildung 13) zeigten die Patientinnen und Patienten mit homozygotem HLA-C2-Status gegenüber den 348 (84,1 %) mit anderem HLA-C-Status (HLA-C1/C1, HLA-C1/C2) in Bezug auf das EFS, das PFS und das OS keine statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen.

In der mittels Cox-Regression durchgeführten multivariaten Analyse (siehe Tabelle 26) konnten die statistisch nicht signifikanten Outcome-Assoziationen in Bezug auf das EFS: HR 1,3; (95 %-CI: 0,8–2,2);  $p = 0,31$ , das PFS: HR 1,3; (95 %-CI: 0,7–2,3);  $p = 0,42$  und das OS: HR 1,2; (95 %-CI: 0,5–2,9);  $p = 0,62$ , bei den 66 HLA-C2-homozygoten Patientinnen und Patienten gegenüber den 348 (84,1 %) Patientinnen und Patienten mit HLA-C1/C2-Heterozygotie bzw. HLA-C1-Homozygotie bestätigt werden.

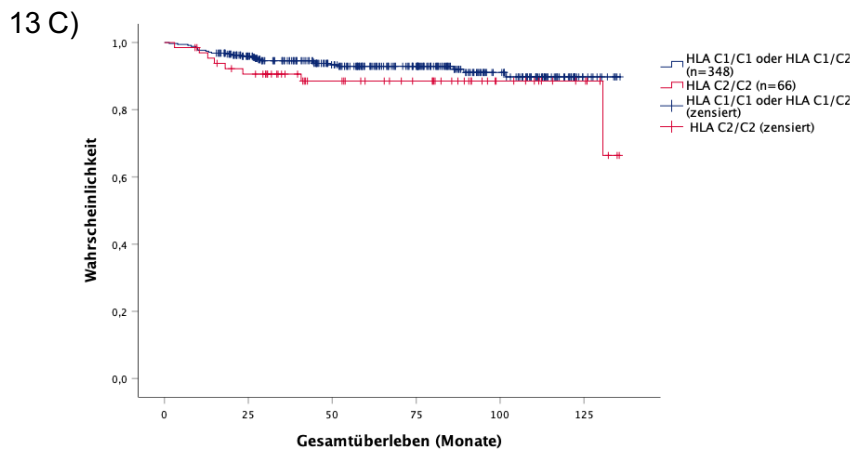
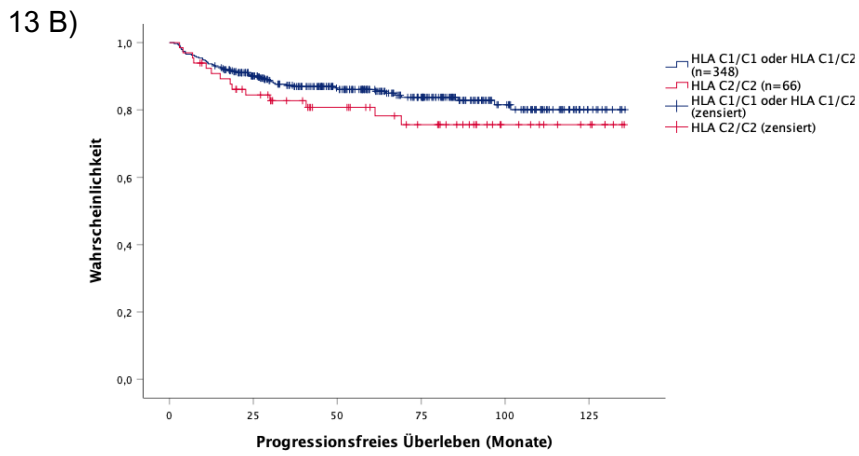
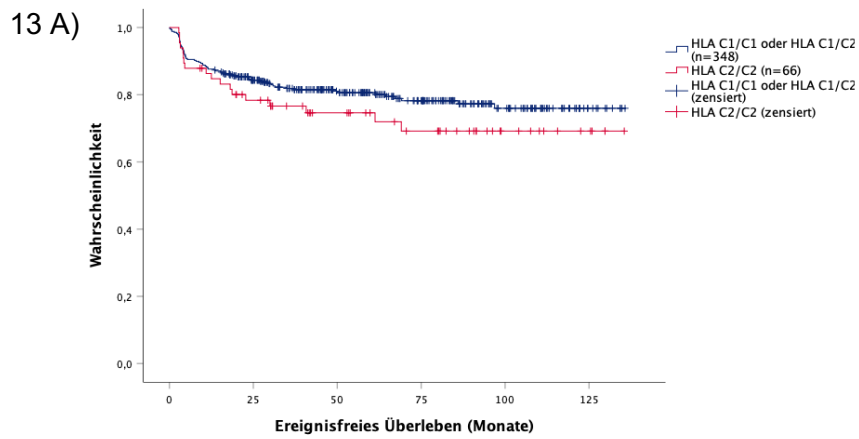
#### 4.5.3. KIR2DS1/HLA-C

Eine kombinierte Positivität für KIR2DS1 und HLA-C2/C2 wiesen 27 (6,5 %) Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs ( $n = 414$ ) auf (siehe Tabelle 19). In der univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer (siehe Abbildung 14) zeigten die Patientinnen und Patienten mit positivem KIR2DS1- und HLAC2/C2-Status, gegenüber allen anderen 387 (93,5 %) Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs, sowohl in Bezug auf das EFS als auch auf das PFS und das OS keine statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen. In der, mittels Cox-Regression durchgeführten, multivariaten Analyse (siehe Tabelle 26) konnten die statistisch nicht signifikanten Outcome Assoziationen in Bezug auf das EFS: HR 1,3; (95 %-CI: 0,6–2,8);  $p = 0,44$ , das PFS: HR 1,0; (95 %-CI: 0,4–2,5);  $p = 0,99$ , und das OS: HR 1,3; (95 %-CI: 0,4–4,1);  $p = 0,70$  zwischen den beiden genannten Gruppen (KIR2DS1 und HLA-C2/C2 vs. alle anderen) bestätigt werden.



**Abbildung 12: Die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs mit KIR2DS1-positivem Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit KIR2DS1-negativem Status**

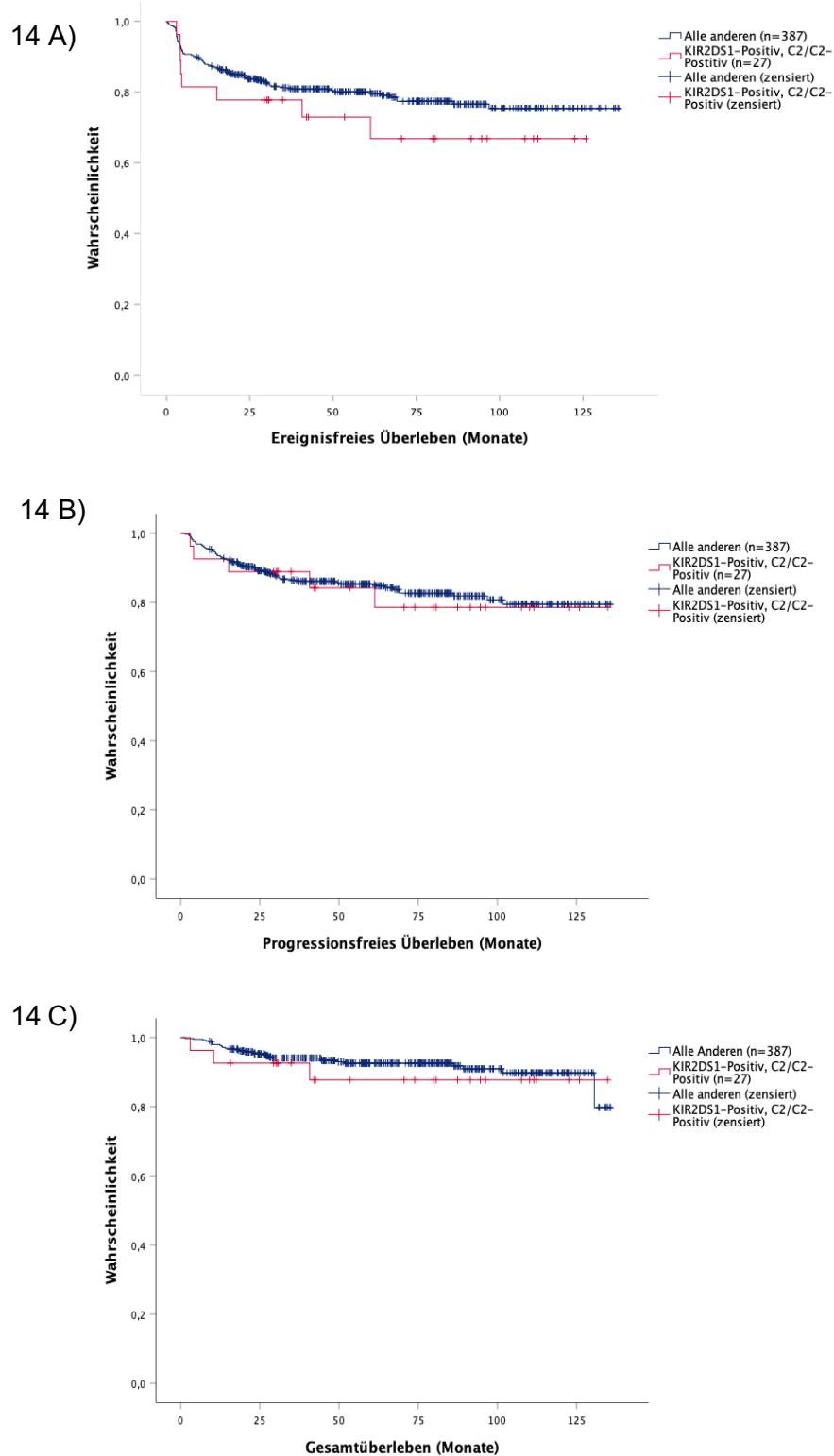
Dargestellt sind die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten mit KIR2DS1-positivem Status (n = 175), sowie die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten mit KIR2DS-negativem Status (n = 239) in Bezug auf das EFS, das PFS und das OS über einen Zeitraum von 0 bis 125 Monaten.



**Abbildung 13: Die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs mit HLA-C2-homozygotem Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit HLA-C1/C1- bzw. HLA-C1/C2-Status**

Dargestellt sind die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs mit HLA-C2-homozygotem Status (n = 66) im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit HLA-C1/C2-heterozygotem (n = 201) bzw. HLA-C1/C1-homozygotem Status (n = 147) mit EFS, PFS und OS über einen Zeitraum von 0 bis 125 Monaten.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 14: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit kombiniertem KIR2DS1- und HLA-C-Status im Vergleich mit den Überlebenskurven des restlichen Untersuchungskollektivs**

Dargestellt sind die Überlebenskurven des gesamten Untersuchungskollektivs (n = 414) und des Patientenkollektivs mit kombiniert positivem KIR2DS1- und HLA-C2-Status (n = 27) mit EFS, PFS und OS über einen Zeitraum von 0 bis 125 Monaten.

Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit kombiniertem KIR2DS1- und HLA-C2/C2-Status (n = 27; 6,5 %) unterscheiden sich im Vergleich mit den Überlebenskurven des restlichen Patientenkollektivs (n = 387; 93,5 %) nicht signifikant.

Tabelle 26 zeigt das Ergebnis der multivariaten Analysen von KIR2DS1-, HLA-C-, und KIR2DS1/ HLA-C-Status am gesamten untersuchten Patientenkollektiv (n = 414). Dargestellt sind die Größe der Subgruppen (n), Hazard Ratios (HR), 95 %-Konfidenzintervalle (CI) und p-Werte. Multivariat adjustiert wurde für eine erhöhte Laktatdehydrogenase, ein Tumorstaging Grad III/IV, ein extranodaler Tumorbefall und ein Tumorbulk  $\geq 7,5$  cm.

**Tabelle 26: Multivariate Analyse der KIR2DS1-, HLA-C- und KIR2DS1+HLA-C-Status**

|   | Anzahl       | Hazard Ratio; (95 %-Konfidenzintervall); p-Wert |                             |                             |
|---|--------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
|   |              | Event Free Survival                             | Progression Free Survival   | Overall Survival            |
| <b>KIR2DS1 positiv</b>                        | 175 (42,3 %) | 1,1; (0,7–1,6);<br>p = 0,075                    | 1,0; (0,6–1,6);<br>p = 0,97 | 0,8; (0,4–1,6);<br>p = 0,53 |
| <b>HLA-C2/C2</b>                              | 66 (15,9 %)  | 1,3; (0,8–2,2);<br>p = 0,31                     | 1,3; (0,7–2,3);<br>p = 0,42 | 1,2; (0,5–2,9);<br>p = 0,62 |
| <b>KIR2DS1-<br/>positiv und<br/>HLA-C2/C2</b> | 27 (6,5 %)   | 1,3; (0,6–2,8);<br>p = 0,44                     | 1,0; (0,4–2,5);<br>p = 0,99 | 1,3; (0,4–4,1);<br>p = 0,70 |

#### 4.5.4. PMBCL-Subgruppe

Von den 414 Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs wiesen 81 (19,6 %) in der Referenzpathologie ein PMBCL auf, während 333 (80,4 %) kein PMBCL aufwiesen (siehe Tabelle 21).

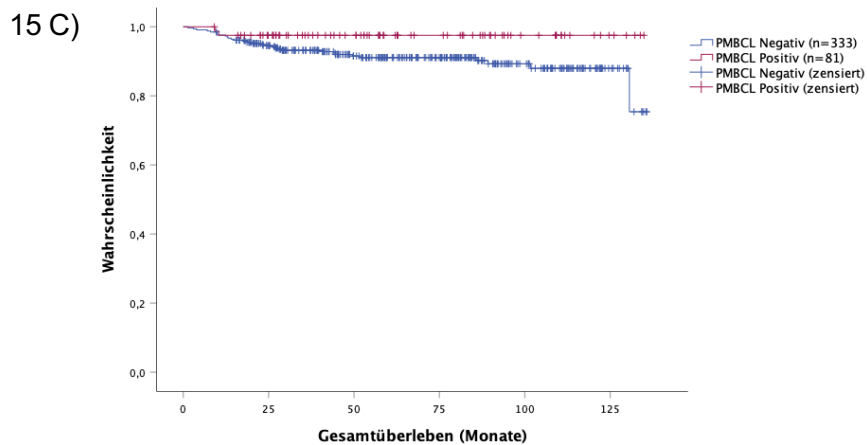
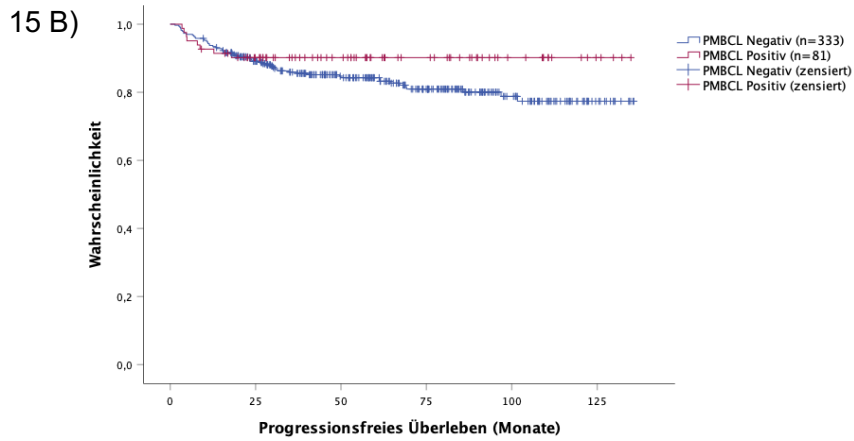
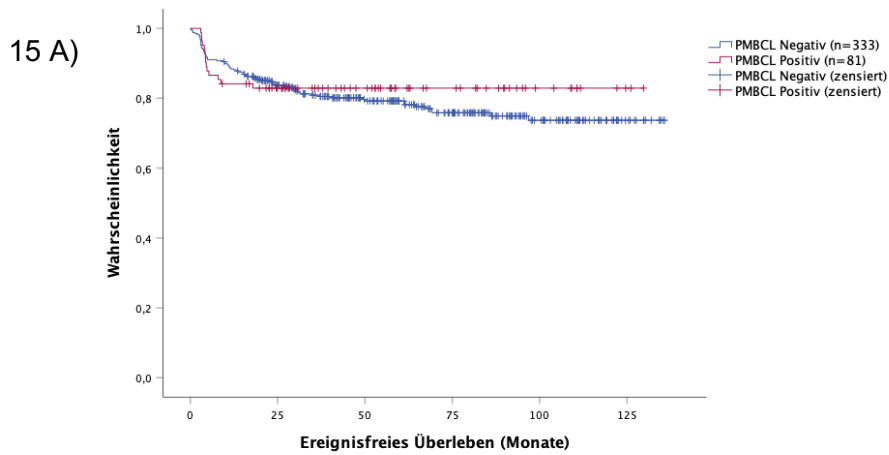
Zwischen dem untersuchten Kollektiv und der PMBCL-Subgruppe lagen bei Patientinnen und Patienten mit Qualifikation zur Radiotherapie keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Studientherapie vor. Bei den Patientinnen und Patienten ohne Qualifikation zur Radiotherapie lagen zwischen den beiden untersuchten Gruppen statistisch signifikante Unterschiede vor (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Durchgeführte Studientherapie im Untersuchungskollektiv und der PMBCL-Subgruppe

| Studientherapie   | Qualifiziert für Radiotherapie |                       |                             |                             | Nicht qualifiziert für Radiotherapie |                       |
|---|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
|   | 6 x R-<br>CHOP-<br>21          | 6 x R-<br>CHOP-<br>14 | 6 x R-<br>CHOP-<br>21 + RTx | 6 x R-<br>CHOP-<br>14 + RTx | 6 x R-<br>CHOP-<br>21                | 6 x R-<br>CHOP-<br>14 |
| <b>Patientenkollektiv<br/>KIR2DS1/HLA-C<br/>(n = 414)</b> | 81<br>(11,7 %)                 | 81<br>(11,7 %)        | 155<br>(22,3 %)             | 150<br>(21,6 %)             | 114<br>(16,5 %)                      | 114<br>(16,5 %)       |
| <b>Patientenkollektiv<br/>PMBCL<br/>(n = 81)</b>          | 15<br>(18,5 %)                 | 11<br>(13,6 %)        | 28<br>(34,6 %)              | 24<br>(29,6%)               | 2<br>(2,5 %)                         | 1<br>(1,2 %)          |
| <b>p-Wert</b>   | 0,82                           | 0,203                 | 0,614                       | 0,25                        | 0,001                                | 0,001                 |

Im Vergleich des gesamten Untersuchungskollektivs (n = 414) mit der PMBCL-Subgruppe (n = 81) zeigte die univariate Analyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer (siehe Abbildung 15) in Bezug auf das EFS (p = 0,483) und das PFS (p = 0,149) des Untersuchungskollektivs zur PMBCL-Subgruppe keine statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen. In Bezug auf das OS (p = 0,047) zeigte sich ein statistisch signifikant kürzeres Überleben des gesamten Untersuchungskollektivs. In der mittels Cox-Regression durchgeführten multivariaten Analyse (siehe Tabelle 28) konnten die statistisch nicht signifikanten Outcome-Assoziationen in Bezug auf das EFS: HR 0,8; (95 %-CI: 0,5–1,4); p = 0,48 und das PFS: HR 0,6; (95 %-CI: 0,3–1,2); p = 0,15 bestätigt werden. In Bezug auf das OS: HR 0,3; (95 %-CI: 0,06–1,1); p = 0,065 konnten die statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen bei 81 (19,6 %) Patientinnen und Patienten mit PMBCL gegenüber 333 (80,4 %) Patientinnen und Patienten ohne PMBCL nicht bestätigt werden.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 15: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit PMBCL im Vergleich mit Patientinnen und Patienten ohne PMBCL**

Dargestellt sind die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten mit primär mediastinalem B-Zell-Lymphom (PMBCL) (n = 81) versus Patientinnen und Patienten ohne PMBCL (n = 333) mit EFS, PFS und OS über einen Zeitraum von 0 bis 125 Monaten

Weiterhin wurde untersucht, ob es einen potenziellen Zusammenhang zwischen der PMBCL-Subgruppe und dem Genotyp von KIR2DS1 sowie dem HLA-C-Status gibt.

In Bezug auf den KIR2DS1-Status zeigte die univariate Analyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer (siehe Abbildung 16) bei KIR2DS1-positiven Patientinnen und Patienten mit einem PMBCL (n = 32) ein signifikant kürzeres EFS ( $p = 0,019$ ) und PFS ( $p = 0,009$ ) im Vergleich zu KIR2DS1-negativen Patientinnen und Patienten mit PMBCL (n = 49). In Bezug auf das OS ( $p = 0,78$ ) zeigten sich keine statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen. In der mittels Cox-Regression durchgeführten multivariaten Analyse (siehe Tabelle 28) konnten die statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen in Bezug auf das EFS: HR 3,7; (95 %-CI: 1,1–12,1);  $p = 0,019$ , und das PFS: HR: 9,9; (95 %-CI: 1,2–82,2);  $p = 0,009$  bestätigt werden. In Bezug auf das OS: HR: 1,5; (95 %-CI: 0,09–23,7);  $p = 0,78$  konnten die statistisch nicht signifikanten Outcome-Assoziationen bei 32 (7,8 %) Patientinnen und Patienten mit KIR2DS1-Positivität und PMBCL gegenüber 49 (11,8 %) Patientinnen und Patienten mit negativem KIR2DS1-Status und PMBCL bestätigt werden.

In Bezug auf den HLA-C-Status zeigte die univariate Analyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer (siehe Abbildung 17) bei HLA-C2/C2-positiven Patientinnen und Patienten und PMBCL (n = 15) keine signifikanten Outcome Assoziationen in Bezug auf EFS ( $p = 0,61$ ), PFS ( $p = 0,79$ ) und OS ( $p = 0,23$ ) im Vergleich zu allen anderen Patientinnen und Patienten der PMBCL-Subgruppe (n = 66).

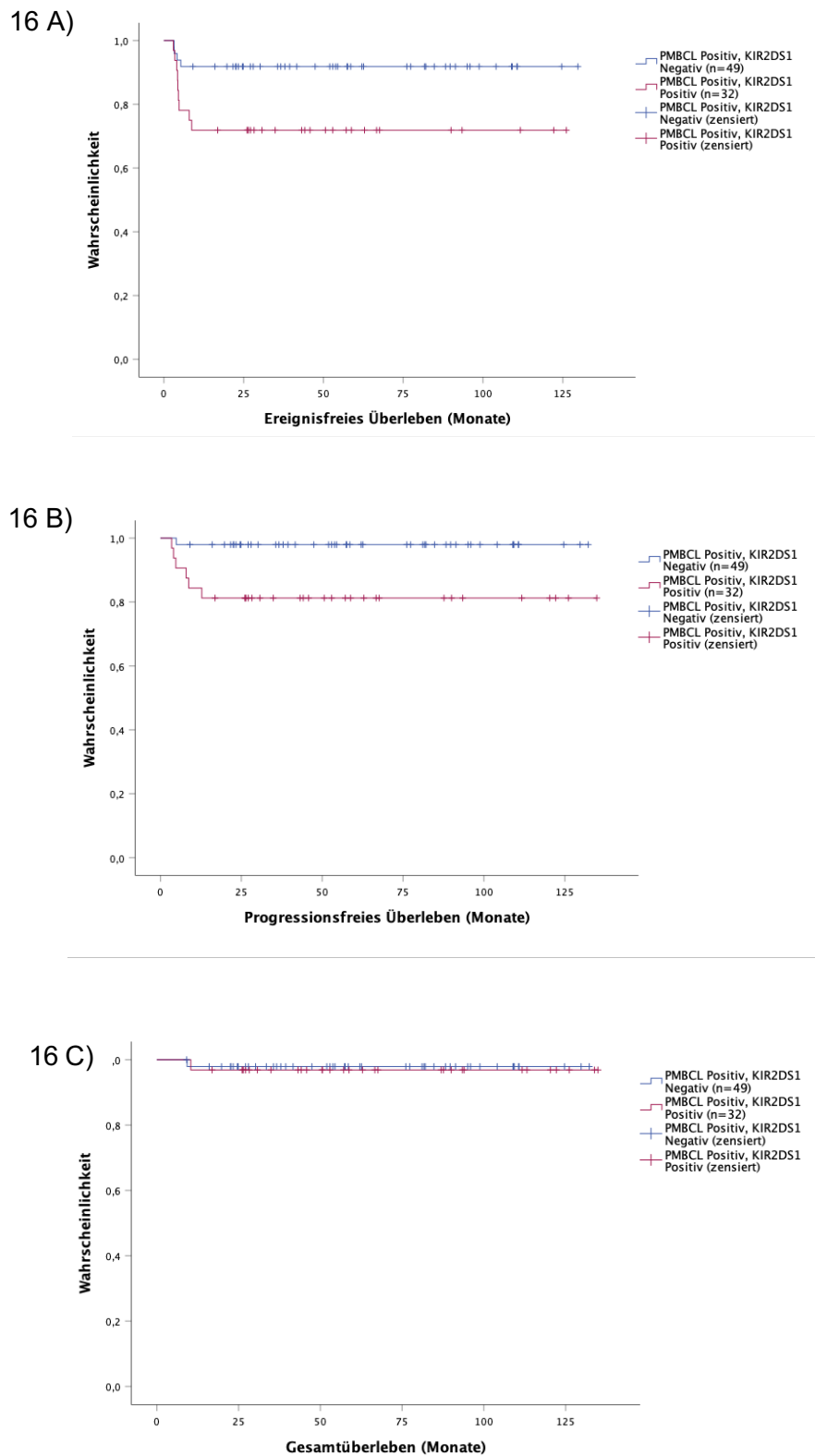
In der mittels Cox-Regression durchgeführten multivariaten Analyse (siehe Tabelle 28) konnten die statistisch nicht signifikanten Outcome-Assoziationen in Bezug auf das EFS: HR: 1,4; (95 %-CI: 0,4–5,1);  $p = 0,61$ , das PFS: HR: 0,8; (95 %-CI: 0,1–6,2);  $p = 0,79$  und das OS: HR: 0,8; (95 %-CI: 0,1–5,7);  $p = 0,23$  bei den 15 (3,6 %) HLA-C2-homozygoten Patientinnen und Patienten mit PMBCL gegenüber 66 (16 %) Patientinnen und Patienten mit HLA-C1/C2-Heterozygotie bzw. HLA-C1-Homozygotie und PMBCL bestätigt werden.

In Bezug auf den kombinierten KIR2DS1- und HLA-C2/C2-Status zeigte die univariate Analyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer (siehe Abbildung 18) ein bei kombiniert KIR2DS1- und HLA-C2/C2-positiven Patientinnen und Patienten mit PMBCL (n = 4) ein signifikant schlechteres EFS ( $p = 0,038$ ) und OS ( $p = 0,04$ ) im Vergleich zu allen anderen Patientinnen und Patienten der PMBCL-Subgruppe (n = 77). In Bezug auf das PFS ( $p = 0,18$ ) zeigten sich keine statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen.

In der mittels Cox-Regression durchgeführten multivariaten Analyse (siehe Tabelle 28) konnten die statistisch nicht signifikanten Outcome-Assoziationen in Bezug auf das PFS: HR 3,8; (95 %-CI: 0,5–31,6);  $p = 0,22$  bestätigt werden. In Bezug auf das EFS: HR: 4,3; (95 %-CI:

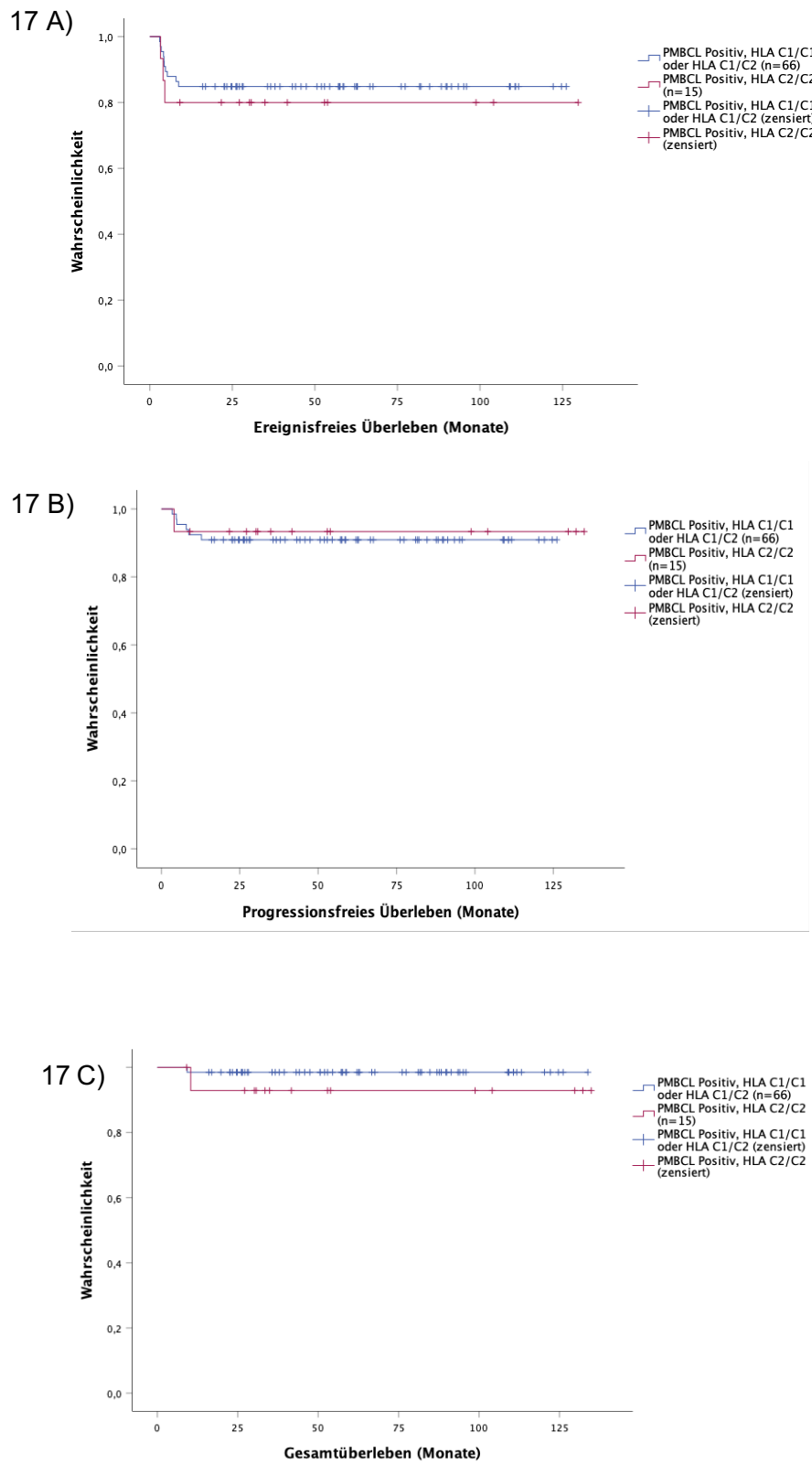
0,9–19,6);  $p = 0,058$ , konnten die statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen in der multivariaten Analyse nicht bestätigt werden. In Bezug auf das OS: HR: 18,9; (95 %-CI: 1,2–301,8);  $p = 0,038$  konnten die statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen bei 4 (1 %) Patientinnen und Patienten mit kombinierter Positivität aus KIR2DS1 und HLA-C2/C2 gegenüber 77 (18,6%) anderen Patientinnen und Patienten der PMBCL-Subgruppe bestätigt werden.

# ERGEBNISSE



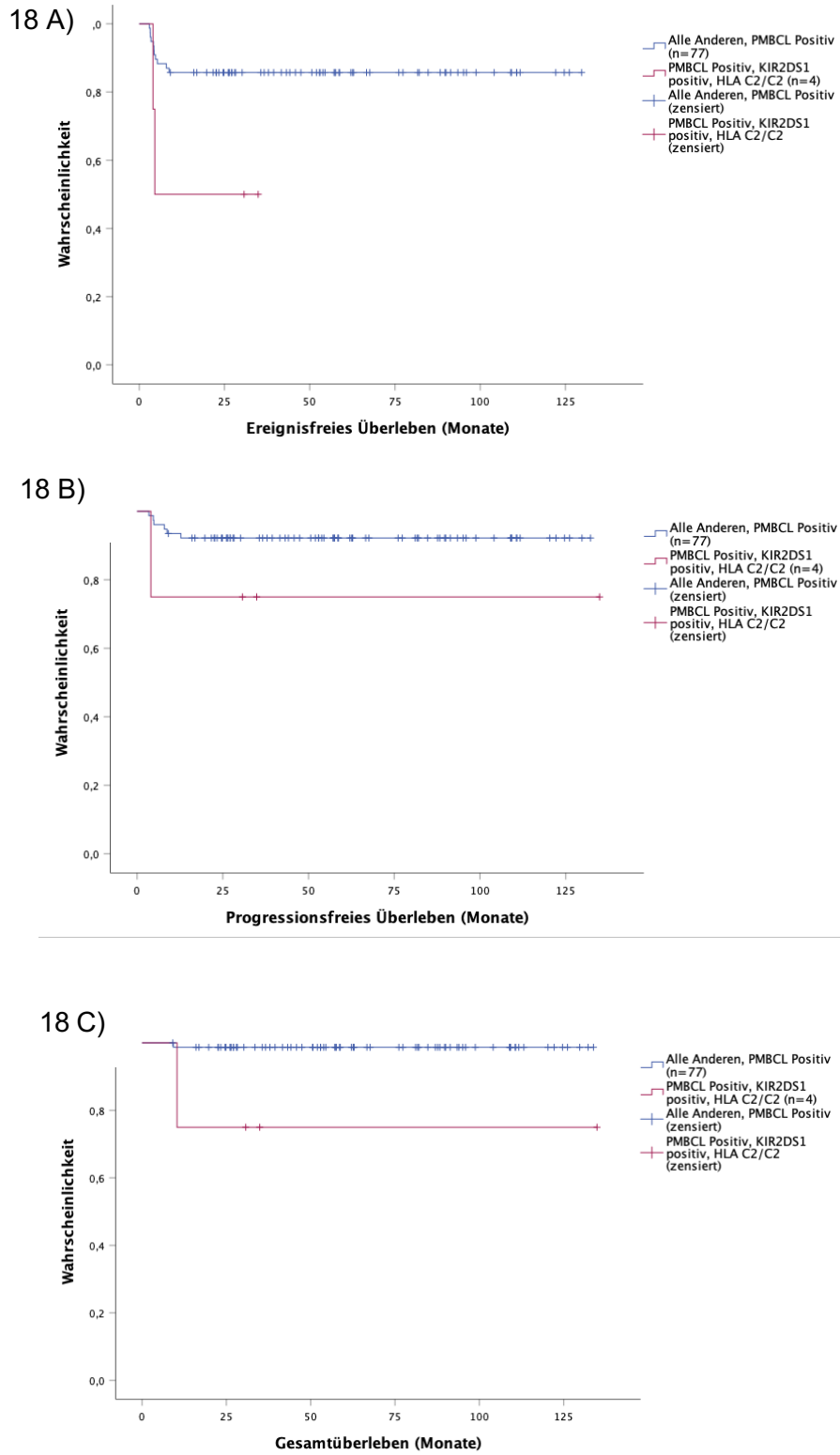
**Abbildung 16: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit PMBCL und positivem KIR2DS1-Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit PMBCL und negativem KIR2DS1-Status**

Dargestellt sind die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten mit primär mediastinalem B-Zell-Lymphom (PMBCL) (n = 81) mit jeweils positivem KIR2DS1-Status (n = 32) versus negativem KIR2DS1-Status (n = 49) mit EFS, PFS und OS über einen Zeitraum von 0 bis 125 Monaten.



**Abbildung 17: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit PMBCL und HLA C2/C2-Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit PMBCL und HLA C1/C1-Status oder HLA C1/C2-Status**

Dargestellt sind die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten mit primär mediastinalem B-Zell-Lymphom (PMBCL) (n = 81) mit jeweils HLA-C1/C1- oder HLA-C1/C2-Status (n = 66) versus HLA-C2/C2-Status (n = 15) mit EFS, PFS und OS über einen Zeitraum von 0 bis 125 Monaten.



**Abbildung 18: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit PMBCL und kombiniertem KIR2DS1- und HLA-C2/2-Status im Vergleich mit den Patientinnen und Patienten mit PMBCL mit anderem KIR2DS1- und HLA-C-Status**

Dargestellt sind die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten mit primär mediastinalem B-Zell-Lymphom (PMBCL) (n = 81) mit jeweils anderem KIR2DS1 und HLA C-Status (n = 77) versus Patientinnen und Patienten mit KIR2DS1 und HLA-C2/C2-positivem Status (n = 4) mit EFS, PFS und OS über einen Zeitraum von 0 bis 125 Monaten.

ERGEBNISSE

Tabelle 28 zeigt das Ergebnis der multivariaten Analysen von KIR2DS1-, HLA-C-, und KIR2DS1/ HLA-C-Status anhand der PMBCL-Subgruppe (n = 81; 19,6 %).

Dargestellt sind die Größe der Subgruppen (n), Hazard Ratios (HR), 95 %-Konfidenzintervalle (CI) und p-Werte. Multivariat adjustiert wurde für eine erhöhte Laktatdehydrogenase, ein Tumorstaging Grad III/IV, ein extranodaler Tumorbefall und ein Tumorbulk  $\geq 7,5\text{cm}$ .

**Tabelle 28: Multivariate Analyse der PMBCL-Subgruppe in Bezug auf KIR2DS1-, HLA-C- und kombiniertem KIR2DS1, HLA-C-Status**

|  | Anzahl      | Hazard ratio; (95% Konfidenzintervall); p-Wert |                               |                                 |
|--|-------------|--|-------------------------------|---------------------------------|
|  |             | Event Free Survival                            | Progression Free Survival     | Overall Survival                |
| <b>PMBCL positiv</b>                           | 81 (19,6 %) | 0,8; (0,5-1,4);<br>p = 0,48                    | 0,6; (0,3-1,2);<br>p = 0,15   | 0,3; (0,06-1,1);<br>p = 0,065   |
| <b>PMBCL und KIR2DS1 positiv</b>               | 32 (7,7 %)  | 3,7; (1,1-12,1);<br>p = 0,019                  | 9,9; (1,2-82,2);<br>p = 0,009 | 1,5; (0,09-23,7);<br>p = 0,78   |
| <b>PMBCL und HLA-C2/C2 positiv</b>             | 15 (3,6 %)  | 1,4; (0,4-5,1);<br>p = 0,61                    | 0,8; (0,1-6,2);<br>p = 0,79   | 0,8; (0,1-5,7);<br>p = 0,23     |
| <b>PMBCL und KIR2DS1 positiv und HLA-C2/C2</b> | 4 (1,0 %)   | 4,3; (0,9-19,6);<br>p = 0,058                  | 3,8; (0,46-31,6);<br>p = 0,22 | 18,9; (1,2-301,8);<br>p = 0,038 |

Es ist zu beachten, dass die Subgruppe der Patientinnen und Patienten mit PMBCL (n = 81), in der ersten Zeile der Tabelle, im Vergleich zu Patientinnen und Patienten ohne PMBCL (n = 333) der Studie analysiert wurde. Die weiteren Analysen erfolgten innerhalb der PMBCL-Subgruppe (n = 81).

Von den insgesamt 368 (88,9 % des gesamten Untersuchungskollektivs) Patientinnen und Patienten, die nicht positiv für KIR2DS1 und homozygot für HLA-C2 waren, lag die Rate der partiellen Remission (PR) bei 4,6 %, für eine komplette Remission (CR/CRU) bei 95,4 %. Von den 23 Patientinnen und Patienten mit dem Rezeptorstatus KIR2DS1+HLA-C2/C2 (5,6 % des gesamten Untersuchungskollektivs) lag die Rate der partiellen Remissionen bei 4,3 %, für eine komplette Remission bei 95,7 % (siehe Tabelle 29).

**Tabelle 29: Rate an partiellen Remissionen (PR) und kompletten Remissionen (CR/CRU) für KIR2DS1+HLA-C2/C2 gegenüber Patientinnen und Patienten mit anderem Rezeptorstatus**

|               | <b>Andere</b>    | <b>KIR2DS1 positiv<br/>und HLA-C2/C2</b> | <b>Total</b> |
|---------------|------------------|--|--------------|
| <b>PR</b>     | 17/368 (4,6 %)   | 1/23 (4,3 %)                             | 18 (4,6 %)   |
| <b>CR/CRU</b> | 351/368 (95,4 %) | 22/23 (95,7 %)                           | 373 (95,4 %) |
| <b>Gesamt</b> | 368              | 23                                       | 391          |

#### 4.5.5. Subgruppenanalyse von Patientinnen und Patienten ohne Randomisierung zur Bestrahlung

Eine zusätzliche Bestrahlung könnte den Effekt von Rituximab und damit den Einfluss der untersuchten Polymorphismen mindern [28]. Daher wurde in einem weiteren Schritt untersucht, inwiefern der KIR2DS1/HLA-C-Status Einfluss auf den Therapieverlauf von Patientinnen und Patienten ohne Bestrahlungsindikation hat.

Im analysierten Kollektiv von 414 Patientinnen und Patienten wurden 131 Patientinnen und Patienten dem Therapiearm ohne Strahlentherapie zugeordnet (siehe Tabelle 30). 52 (39,7 %) Patientinnen und Patienten waren KIR2DS1-positiv, 79 (60,3 %) Patientinnen und Patienten waren KIR2DS1-negativ. 58 (44,3 %) Patientinnen und Patienten waren HLA-C1/C2-heterozygot, 51 (38,95 %) Patientinnen und Patienten HLA-C1-homozygot und 22 (16,8 %) Patientinnen und Patienten HLA-C2-homozygot. Eine kombinierte Positivität aus KIR2DS1 und HLA-C2/C2 wurde bei sieben (5,3 %) Patientinnen und Patienten gefunden.

Sowohl für den KIR2DS1-Status als auch für den KIR2DS1/HLA-C Status wurden erneut keine signifikanten Outcome-Assoziationen festgestellt. Bezüglich HLA-C zeigte sich in der univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer ein statistisch signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben. Im Vergleich von HLA-C2/C2 zu HLA-C1/C2 bzw. HLA-C1/C1 (siehe Abbildung 19) zeigten Patientinnen und Patienten mit positivem HLA-C2/C2-Status ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben ( $p = 0,045$ ).

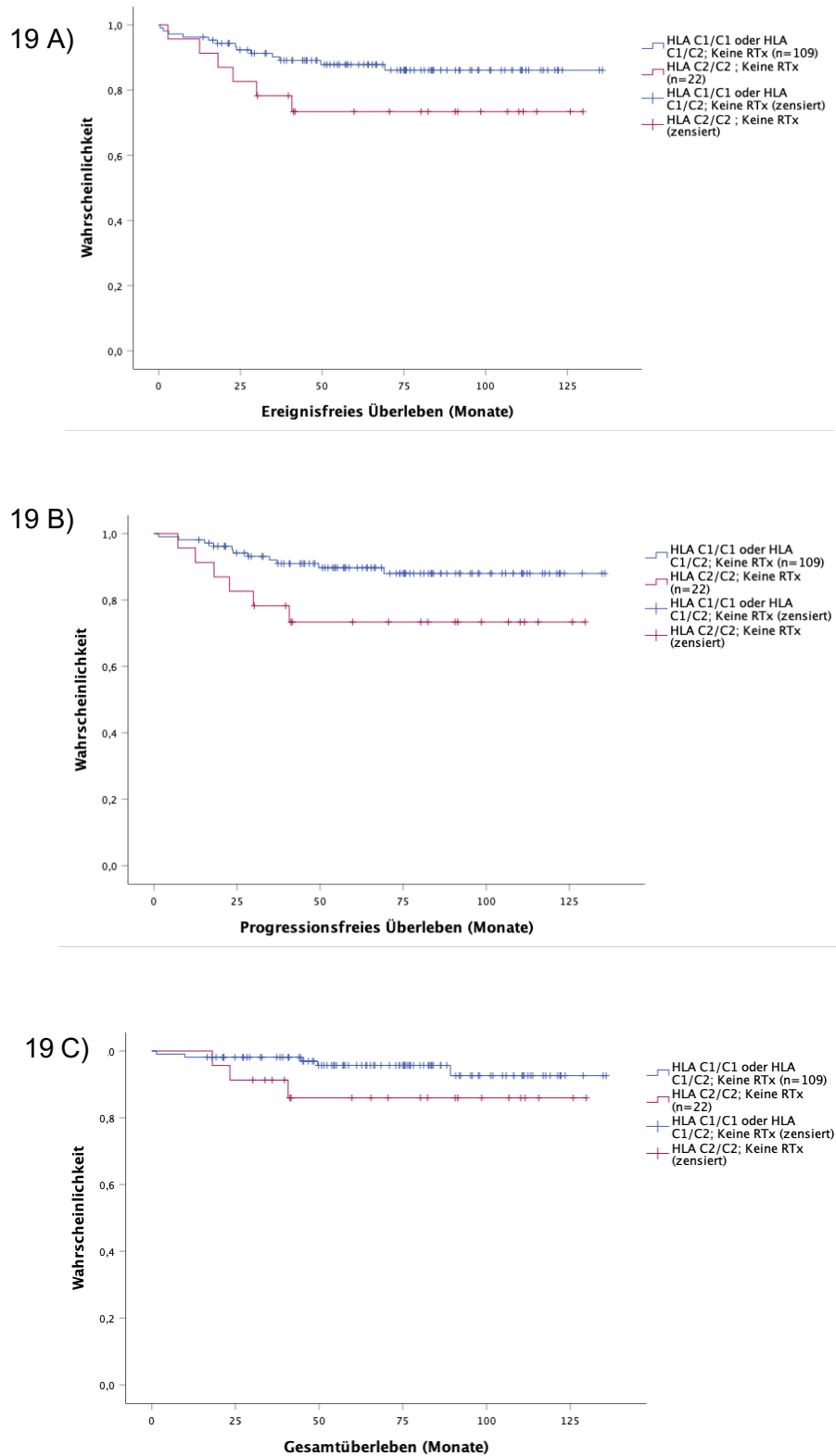
## ERGEBNISSE

In Bezug auf das ereignisfreie Überleben ( $p = 0,11$ ) sowie das Gesamtüberleben ( $p = 0,16$ ) konnten keine signifikanten Outcome-Assoziationen festgestellt werden (siehe Abbildung 19). In der mittels Cox-Regression durchgeführten multivariaten Analyse (siehe Tabelle 31) konnten die statistisch nicht signifikanten Outcome-Assoziationen in Bezug auf das EFS: HR: 2,9; (0,8–5,7);  $p = 0,11$  und OS: HR: 2,8; (0,7–11,9);  $p = 0,16$  bestätigt werden. In Bezug auf das PFS: 2,6; (0,9–7,1);  $p = 0,045$  konnte die statistisch signifikante Outcome-Assoziation bestätigt werden.

**Tabelle 30: Vorkommen von KIR2DS1 und HLA-C bei Patientinnen und Patienten ohne Indikation zur Strahlentherapie (n = 131)**

|                        | <b>HLA-C1/C2</b> | <b>HLA-C1/C1</b> | <b>HLA-C2/C2</b> | <b>Total</b> |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| <b>KIR2DS1 negativ</b> | 32 (24,4 %)      | 32 (24,4 %)      | 15 (11,4 %)      | 79 (60,3 %)  |
| <b>KIR2DS1 positiv</b> | 26 (19,9 %)      | 19 (14,5 %)      | 7 (5,4 %)        | 52 (39,7 %)  |
| <b>Total</b>           | 58 (44,3 %)      | 51 (38,9 %)      | 22 (16,8 %)      | 131          |

## ERGEBNISSE



**Abbildung 19: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten ohne Indikation zur Strahlentherapie und HLA-C2/C2-Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten ohne Indikation zur Strahlentherapie und anderem HLA-C-Status**

Im Vergleich mit den Allelen HLA-C1/C1 und HLA-C1/C2 haben Träger des Allels HLA-C2/C2 ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben ( $p=0,045$ ) unter den Patientinnen und Patienten ohne Indikation zur Strahlentherapie ( $n=131$ ). Im ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

ERGEBNISSE

---

Tabelle 31 zeigt das Ergebnis der multivariaten Analysen von KIR2DS1-, HLA-C-, und KIR2DS1/ HLA-C-Status am gesamten untersuchten Patientenkollektiv (n = 414). Dargestellt sind die Größe der Subgruppen (n), Hazard Ratios (HR), 95%-Konfidenzintervalle (CI) und p-Werte. Multivariat adjustiert wurde für eine erhöhte Laktatdehydrogenase, ein Tumorstaging Grad III/IV, ein extranodaler Tumorbefall und ein Tumorbulk  $\geq 7,5$  cm.

Im Vergleich mit den Allelen HLA-C1/C1 und HLA-C1/C2 haben Träger des Allels HLA-C2/C2 ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben ( $p = 0,045$ ) unter den Patientinnen und Patienten ohne Indikation zur Strahlentherapie (n = 131). Im ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

**Tabelle 31: Multivariate Analyse der Patientinnen und Patienten im Therapiearm ohne Indikation zu Strahlentherapie (n = 131)**

|  | Anzahl | Hazard ratio; (95% Konfidenzintervall); p-Wert |                              |                              |
|--|--------|--|------------------------------|------------------------------|
|  |        | Event Free Survival                            | Progression Free Survival    | Overall Survival             |
| <b>Keine Indikation zur Strahlentherapie HLA-C2/C2</b> | 22     | 2,9; (0,8–5,7);<br>p = 0,11                    | 2,6; (0,9–7,1);<br>p = 0,045 | 2,8; (0,7–11,9);<br>p = 0,16 |

## 5. Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Dissertationsarbeit war es, den Einfluss des individuellen KIR2DS1- und HLA-C-Status auf das Therapieansprechen unter Rituximab-haltiger Immunchemotherapie an einem weiteren Kollektiv von Patientinnen und Patienten mit aggressivem B-Zell-Lymphom zu untersuchen. Hierzu wurde das gut charakterisierte UNFOLDER-Kollektiv gewählt.

Bereits in früheren Untersuchungen zweier großer Studienkollektive wurde der für die NK-Zell-Toleranz relevante KIR2DS1/HLA-C-Status der Patientinnen und Patienten als potenziell prädiktiver Marker für die Wirksamkeit von Rituximab identifiziert [23]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patientinnen und Patienten mit KIR2DS1-Positivität bei gleichzeitiger HLA-C2-Homozygotie (ca. 7% der Patientinnen und Patienten), in Bezug auf Parameter des Überlebens (EFS, PFS, OS), nicht von der zusätzlichen Gabe von Rituximab zur Chemotherapie profitierten [23]. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit in-vitro-Voruntersuchungen, die eine reduzierte Rituximab-abhängige ADCC-Funktion bei KIR2DS1-positiven NK-Zellen von HLA-C2-homozygoten Spendern demonstrierten [52]. Zudem bekräftigen die Ergebnisse der beiden Studien die Hypothese einer KIR2DS1- und HLA-C2-vermittelten NK-Zell-Anergie [27,52].

In der Post-hoc-Analyse der UNFOLDER-Studie konnten hingegen keine statistisch signifikanten Outcome-Assoziationen des KIR2DS1-, HLA-C- und des KIR2DS1/HLA-C-Status festgestellt werden. Die in den vorherigen Studien als prädiktiver Marker für die Wirksamkeit einer Rituximab-Therapie identifizierte Rezeptorkonstellation, war in UNFOLDER nur tendenziell mit einem kürzeren ereignisfreien und Gesamtüberleben assoziiert, erreichte jedoch keine Signifikanz. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in den strukturellen Unterschieden der Therapieprotokolle: In UNFOLDER erfolgte die Behandlung häufiger als multimodale Kombinationstherapie, was immunologische Effekte einzelner Komponenten – einschließlich Rituximab – potenziell überlagern könnte.

Diese Interpretation wird durch die Subgruppenanalyse der Patientinnen und Patienten ohne Bestrahlungsindikation gestützt. In dieser weniger heterogenen Population war ein homozygoter HLA-C2-Status, konsistent mit den Ergebnissen aus RICOVER-60, mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert. Dies unterstreicht, dass der Einfluss einzelner KIR/HLA-Konstellationen möglicherweise nur in spezifischen klinischen Kontexten detektierbar ist.

Die biologische Plausibilität eines prädiktiven Einflusses von KIR/HLA-Interaktionen auf die Rituximab-Wirksamkeit wird zudem durch frühere experimentelle und klinische Arbeiten unterstützt. Die ADCC stellt eine zentrale Effektorfunktion von NK-Zellen verschiedener Antikörpertherapien dar [69]. Bei Patientinnen und Patienten mit indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen konnte nach Rituximab-Gabe eine erhöhte ADCC-Aktivität bei zirkulierenden NK-Zellen festgestellt werden [20]. Fauriat et al. demonstrierten, dass KIR2DS1-positive NK-Zellen eines HLA-C2-homozygoten Spenders unterdurchschnittlich reaktiv sind, während Venstrom et al. zeigten, dass KIR2DS1- und HLA-C2-homozygote Gewebsmerkmale eines Spenders, die im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation an Patientinnen und Patienten mit akuter myeloischer Leukämie übertragen wurden, einen geringeren Graft-versus-Leukemia-Effekt erzeugten [18][74].

Aktuelle Arbeiten weisen zudem darauf hin, dass neben NK-Zellen auch andere Effektorzellpopulationen die ADCC-vermittelte Wirksamkeit von Rituximab beeinflussen können. Zöpfel et al. zeigten 2024, dass CD16-positive T-Zellen eine deutlich höhere ADCC-Kapazität als NK-Zellen besitzen und dass insbesondere CD16-positive Monozyten einen relevanten prognostischen Einfluss auf das progressionsfreie Überleben bei aggressiven B-Zell-Lymphomen haben [78]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die ADCC-vermittelte Immunantwort komplexer ist als bislang angenommen und immunogenetische Konstellationen - wie KIR2DS1/HLA-C2 - ihr klinisches Wirkprofil nicht isoliert, sondern im Zusammenspiel mit der zellulären Zusammensetzung des Immunsystems entfalten. Vor diesem Hintergrund gewinnt die Untersuchung solcher Marker in klinischen Kohorten weiter an Relevanz.

Die hier vorgestellte Analyse stellt mit untersuchten Proben von 414 Patientinnen und Patienten einen repräsentativen Anteil an der gesamten Studienpopulation von 695 Patientinnen und Patienten des UNFOLDER Kollektivs dar. Aufbauend auf in-vitro-Experimenten zur Interaktion von verschiedenen KIR mit ihren HLA-Liganden und Funktionsweise der ADCC stellen diese Untersuchungen eine Post-hoc-Analyse an einer prospektiven klinischen Studie mit einer hohen Anzahl an Studienteilnehmenden dar [70]. Eine wesentliche Limitation ergibt sich jedoch aus der geringen Anzahl an Patientinnen und Patienten mit positivem KIR2DS1-Status, bei gleichzeitiger HLA-C2/C2-Positivität (n = 27; 6,5 %).

Möglicherweise ist diese niedrige Häufigkeit auf negative genetische Assoziation zwischen KIR- und HLA-Loci zurückzuführen. Single et al. untersuchten Korrelationen zwischen den Häufigkeiten funktionell relevanter Rezeptor-Liganden-Paare als Belege für eine Koevolution auf Populationsebene [65]. Zwischen aktivierenden KIR-Genen und den entsprechenden HLA-Liganden konnte eine negative Korrelation nachgewiesen werden, was die Theorie einer KIR/HLA-abhängigen Toleranz dieser beiden Gensysteme stützt.

Solche genetischen Gegenläufigkeiten können die Identifikation klinisch relevanter Untergruppen erheblich erschweren.

Zusätzlich beeinflussen bestimmte Charakteristika des UNFOLDER-Studiendesigns die statistische Aussagekraft der durchgeführten Analyse [70]. Die Beurteilung eines Therapieansprechens erfolgte bei UNFOLDER durch die von Cheson et al. 1999 formulierten Response-Kriterien für Non-Hodgkin-Lymphome, welche die Durchführung eines FDG-PET/CT nicht vorsahen [12]. Aufgrund der ausschließlichen Bildgebung mittels CT - ohne die heute standardmäßige FDG-PET/CT bestand eine höhere diagnostische Unsicherheit der Remissionsbeurteilung, und es wurden mittels konventioneller CT-Diagnostik höhere Raten partieller Remissionen statt kompletter metabolischer Remissionen diagnostiziert. Dies wurde als Event gewertet, führte zu vermehrten Radiotherapie-Indikationen auch in den Observations-Armen und zu einem signifikanten EFS-Unterschied zwischen Bestrahlungs- und Beobachtungsarmen, ohne sich auf PFS und OS auszuwirken. Durch die in der UNFOLDER-Studie nicht vorgesehenen metabolischen Verlaufskontrollen mittels FDG-PET/CT lassen sich diese als Ereignis definierten Events allerdings wahrscheinlich nicht hinreichend tumorspezifisch begründen.

Die Einführung der Lugano-Klassifikation 2014 hat gezeigt, dass FDG/PET-CT-basierte Response-Bewertungen eine fundiertere Differenzierung zwischen teilweise und kompletten Ansprechen des Tumors auf die Therapie mittels metabolischem Ansprechen ermöglichen, was retrospektiv die Limitierung der UNFOLDER-Daten verdeutlicht [13].

Auch die Auswertung des Therapiearms ohne Strahlentherapie bestätigt die Problematik kleiner Subgruppen. Zwar zeigten Patientinnen und Patienten mit HLA-C2-Homozygotie ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben, doch basierten Analysen der kombinierten KIR2DS1/HLA-C2/C2-Konstellation lediglich auf sieben Personen. Aufgrund dieser sehr kleinen Fallzahl und der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten multiplen explorativen Tests lässt sich kein statistisch belastbarer Schluss auf einen kombinierten Einfluss von KIR2DS1 und HLA-C ableiten. Die Ergebnisse sind daher explorativ und als hypothesengenerierend zu interpretieren.

Besondere Aufmerksamkeit verdient die PMBCL-Subgruppe, die 19,6 % des analysierten Kollektivs ausmachte. Trotz insgesamt kleiner Fallzahlen ergaben sich Hinweise auf eine prognostische Relevanz des KIR2DS1-Status: KIR2DS1-positive Patientinnen und Patienten wiesen ein signifikant kürzeres ereignisfreies und progressionsfreies Überleben auf, wohingegen der HLA-C2/C2-Status allein keinen Einfluss zeigte. Die sehr kleine Gruppe kombinierter KIR2DS1/HLA-C2/C2-positiver Personen (n = 4) war mit einem signifikant

schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. Auch wenn diese Resultate wegen der minimalen Fallzahl vorsichtig interpretiert werden müssen, fügen sie sich schlüssig in die von Fauriat et al. postulierte KIR2DS1/HLA-C2/C2-vermittelte NK-Zell-Hyporesponsivität ein [18].

In der von Thurner et al. publizierten Arbeit zeigten Patientinnen und Patienten mit PMBCL zwar insgesamt eine sehr gute Prognose (3-Jahres-OS: 97 %), dennoch deuten die Ergebnisse der hier dargestellten Arbeit darauf hin, dass immunogenetische Marker, wie die kombinierte KIR2DS1/HLA-C2/C2-Positivität selbst innerhalb dieser prognostisch günstigen Entität eine zusätzliche Risikostratifikation ermöglichen könnten [70].

Ein weiterer limitierender Faktor ergibt sich aus den insgesamt sehr guten Behandlungsergebnissen im UNFOLDER-Kollektiv. Das 3-Jahres-Gesamtüberleben lag in beiden Studienarmen bei 93 %, was die Detektion kleiner Effekte einzelner immunologischer Parameter erschwert. Demgegenüber war die Ereignisrate im RICOVER-60-Kollektiv deutlich höher, sodass immunogenetische Determinanten der Rituximab-Wirksamkeit dort klarer hervortreten konnten [50]. Die günstige prognostische Ausgangslage des überwiegend jungen Patientenkollektivs in limitierten Krankheitsstadien von UNFOLDER, könnte die Wirkung einzelner therapeutischer Faktoren – wie etwa den Einsatz von Rituximab – relativieren.

Zusammenfassend kann die am RICOVER-60- und CLL8-Kollektiv abgeleitete Hypothese einer KIR2DS1/HLA-C-abhängigen Wirksamkeit von Rituximab nach Analyse des UNFOLDER-Kollektivs weder bestätigt noch verworfen werden. Die beobachteten Trends, wie das signifikant kürzere PFS der HLA-C2-homozygoten Patientinnen und Patienten ohne Bestrahlung sowie das überlegene Outcome der PMBCL-Subgruppe, sprechen jedoch dafür, dass immunogenetische Unterschiede der NK-Zell-Aktivierung auch in prognostisch günstigen Lymphomentitäten klinische Relevanz besitzen können. Die vorliegenden Daten unterstreichen deshalb die Notwendigkeit größerer, ereignisreicherer Kohorten, idealerweise mit konsistenter PET-basierter Response-Bewertung. Ergänzend legt die PMBCL-Subgruppenanalyse nahe, dass KIR2DS1- und HLA-C2-vermittelte Unterschiede der NK-Zell-Aktivität auch in prognostisch günstigen Lymphom-Entitäten klinisch relevant sein könnte. Diese immunogenetische Konstellation könnte als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Rituximab-Therapie dienen und sollte ebenfalls in größeren, ereignisreicheren Kohorten sowie in biologisch homogeneren Subgruppen weiter untersucht werden. Eine systematische Einbindung immunogenetischer Parameter in zukünftige Studien könnte dazu beitragen, das therapeutische Potenzial antikörperbasierter Therapien präziser zu erfassen und patientenspezifischer einzusetzen.

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

|               |  |
|---------------|--|
| ADCC          | antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) |
| AP-I          | Aktivator-Protein-I  |
| bzw.          | beziehungsweise  |
| CD            | Cluster of Differentiation   |
| CHOP          | Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednison                                     |
| CI            | Konfidenzintervall (Confidence Interval)   |
| CR            | komplette Remission (Complete Remission)   |
| CRU           | unbestätigte komplette Remission (Complete Remission Unconfirmed)                            |
| CT            | Computertomographie  |
| DISC          | Todesinduzierender Signalkomplex (Death-Inducing Signaling Complex)                          |
| dNTP          | Desoxyribonukleotidtriphosphat   |
| DSHNHL        | Deutsche Studiengruppe für Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome                                  |
| ECOG          | Eastern Cooperative Oncology Group scale   |
| EFS           | ereignisfreies Überleben (Event Free Survival)   |
| FasL          | Fas-Ligand   |
| FDG           | Fluordesoxygulcose   |
| G-CSF         | Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)           |
| GvL           | Graft-versus-Leukemia-Effekt (Graft-versus-Leukemia-Effect)                                  |
| Hb            | Hämoglobin   |
| HLA           | Humanes Leukozytenantigen (Human Leukocyte Antigen)  |
| HR            | Hazard Ratio   |
| ICAM-1        | intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1)                       |
| IFN- $\gamma$ | Interferon-gamma (Glykoprotein aus der Klasse der Zytokine)                                  |
| i.v.          | intravenös   |
| ICRU          | International Commission on Radiation Units and Measurements                                 |
| IPI           | internationaler prognostischer Index   |
| kDA           | Kilodalton   |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|           |   |
|-----------|---|
| LDH       | Lactatdehydrogenase   |
| MAC       | Membranangriffskomplex (Membrane Attack Complex)  |
| MALT      | Schleimhaut-assoziiertes lymphoides Gewebe (Mucosa-associated Lymphoid Tissue)                                  |
| MHC       | Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)   |
| MRT       | Magnetresonanztomographie   |
| NCCN-IPI  | internationaler prognostischer Index der Allianz führender Krebszentren (National Comprehensive Cancer Network) |
| NF-κB     | Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells  |
| NHL       | Non-Hodgkin-Lymphom   |
| NK-Zellen | natürliche Killerzellen   |
| ONW       | Obergrenze der Normalwerte  |
| OR        | Odds Ratio  |
| OS        | Gesamtüberleben (Overall Survival)  |
| p.o.      | peroral   |
| PET       | Positronenemissionstomografie   |
| PFS       | progressionsfreies Überleben (Progression Free Survival)  |
| PMBCL     | primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom (primary mediastinal B-cell lymphoma)                          |
| PR        | Rückgang der messbaren Tumorparameter >30% (Partial Response)   |
| R-CHOP    | Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednison   |
| R-IPI     | überarbeiteter (revised) Internationaler prognostischer Index   |
| rpm       | Umdrehungen pro Minute (Revolutions per Minute)   |
| RTx       | Strahlentherapie (Radiotherapy)   |
| SNP       | Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single-Nucleotide-Polymorphism)   |
| TNF       | Tumornekrosefaktor  |
| TRAIL     | Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand   |
| vs.       | versus; im Gegensatz zu   |

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Struktur von CD20 an der Plasmamembran einer B-Zelle ..... - 13 -

Abbildung 2: Strukturdarstellung von Rituximab ..... - 14 -

Abbildung 3: Verschiedene Wirkmechanismen von Rituximab..... - 15 -

Abbildung 4: NK-Zell Rezeptoren..... - 18 -

Abbildung 5: Missing-self-Hypothese ..... - 19 -

Abbildung 6: Leukozyten-Rezeptor-Komplex..... - 21 -

Abbildung 7: Flussdiagramm der UNFOLDER-Therapiestudie [80]..... - 28 -

Abbildung 8: Ereignisfreies Überleben aller Patientinnen und Patienten der UNFOLDER-Studie ..... - 31 -

Abbildung 9: DNS-Schmelzpunktkurve KIR2DS1 ..... - 36 -

Abbildung 10: Diskriminierung allelspezifischer Sonden..... - 39 -

Abbildung 11: Flussdiagramm UNFOLDER-Studienkollektiv und Untersuchungskollektiv- 43 -

Abbildung 12: Die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs mit KIR2DS1-positivem Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit KIR2DS1-negativem Status ..... - 50 -

Abbildung 13: Die Überlebenskurven von Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs mit HLA-C2-homozygotem Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit HLA-C1/C1- bzw. HLA-C1/C2-Status..... - 51 -

Abbildung 14: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit kombiniertem KIR2DS1- und HLA-C-Status im Vergleich mit den Überlebenskurven des restlichen Untersuchungskollektivs..... - 52 -

Abbildung 15: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit PMBCL im Vergleich mit Patientinnen und Patienten ohne PMBCL ..... - 55 -

Abbildung 16: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit PMBCL und positivem KIR2DS1-Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit PMBCL und negativem KIR2DS1-Status ..... - 58 -

Abbildung 17: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit PMBCL und HLA C2/C2-Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit PMBCL und HLA C1/C1-Status oder HLA C1/C2-Status..... - 59 -

Abbildung 18: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit PMBCL und kombiniertem KIR2DS1- und HLA-C2/2-Status im Vergleich mit den Patientinnen und Patienten mit PMBCL mit anderem KIR2DS1- und HLA-C-Status..... - 60 -

Abbildung 19: Die Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten ohne Indikation zur Strahlentherapie und HLA-C2/C2-Status im Vergleich mit Patientinnen und Patienten ohne Indikation zur Strahlentherapie und anderem HLA-C-Status ..... - 64 -

### 6.3. Tabellenverzeichnis

|  |        |
|--|--------|
| Tabelle 1: Modifizierte Darstellung der Ann-Arbor- Klassifikation .....  | - 8 -  |
| Tabelle 2: Der Performance Score der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG).....  | - 9 -  |
| Tabelle 3: Der Internationale Prognostische Index (IPI, aaIPI) .....   | - 10 - |
| Tabelle 4: Prognose des DLBCL in verschiedenen Studien .....   | - 10 - |
| Tabelle 5: Laborgeräte .....   | - 24 - |
| Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....  | - 25 - |
| Tabelle 7: Verwendete KIR-Primer mit Angabe der spezifischen Schmelztemperatur Tm-   | 25 -   |
| Tabelle 8: Verwendete HLA-C Primer .....   | - 26 - |
| Tabelle 9: Wirkstoffe der R-CHOP-Immunchemotherapie .....  | - 29 - |
| Tabelle 10: PCR-Mastermix .....  | - 34 - |
| Tabelle 11: Zusammensetzung der PCR-Platte zur KIR-Analyse.....  | - 34 - |
| Tabelle 12: PCR-Protokoll zur KIR-Analyse.....   | - 35 - |
| Tabelle 13: Charakteristika der Fluoreszenzfarbstoffe.....   | - 37 - |
| Tabelle 14: Zusammensetzung der PCR-Platte zur HLA-C-Analyse .....   | - 38 - |
| Tabelle 15: PCR-Protokoll zur HLA-C-Analyse .....  | - 38 - |
| Tabelle 16: Multivariate Analyse der Zwischenauswertung .....  | - 40 - |
| Tabelle 17: Baseline-Charakteristika des UNFOLDER-Kollektivs und des untersuchten Kollektivs .....                             | - 41 - |
| Tabelle 18: Durchgeführte Studientherapie im UNFOLDER-Gesamtkollektiv und im Untersuchungskollektiv .....                      | - 42 - |
| Tabelle 19: Vorkommen von KIR2DS1 und HLA-C bei Patientinnen und Patienten des Untersuchungskollektivs.....                    | - 44 - |
| Tabelle 20: Assoziationen der Baseline-Charakterisitika mit KIR2DS1 und HLA-C2/C2..  | - 45 - |
| Tabelle 21: KIR2DS1-Status bei Patientinnen und Patienten mit und ohne PMBCL .....   | - 46 - |
| Tabelle 22: HLA-C-Status bei Patientinnen und Patienten mit und ohne PMBCL .....   | - 46 - |
| Tabelle 23: KIR2DS1- und HLA-C-Status bei Patientinnen und Patienten mit und ohne PMBCL .....                                  | - 47 - |
| Tabelle 24: KIR-Prävalenz im UNFOLDER-Studienkollektiv und in der deutschen Bevölkerung .....                                  | - 47 - |
| Tabelle 25: HLA-C-Prävalenz im UNFOLDER-Studienkollektiv und in der deutschen Bevölkerung .....                                | - 48 - |
| Tabelle 26: Multivariate Analyse der KIR2DS1-, HLA-C- und KIR2DS1+HLA-C-Status... -  | 53 -   |
| Tabelle 27: Durchgeführte Studientherapie im Untersuchungskollektiv und der PMBCL-Subgruppe.....                               | - 54 - |
| Tabelle 28: Multivariate Analyse der PMBCL-Subgruppe in Bezug auf KIR2DS1-, HLA-C- und kombiniertem KIR2DS1, HLA-C-Status..... | - 61 - |

Tabelle 29: Rate an partiellen Remissionen (PR) und kompletten Remissionen (CR/CRU) für KIR2DS1+HLA-C2/C2 gegenüber Patientinnen und Patienten mit anderem Rezeptorstatus ..- 62 -

Tabelle 30: Vorkommen von KIR2DS1 und HLA-C bei Patientinnen und Patienten ohne Indikation zur Strahlentherapie (n = 131)..... - 63 -

Tabelle 31: Mulitvariate Analyse der Patientinnen und Patienten im Therapiearm ohne Indikation zu Strahlentherapie (n = 131) ..... - 65 -

## 6.4. Literaturverzeichnis

1. Aguilar OA, Gonzalez-Hinojosa MDR, Arakawa-Hoyt JS, Millan AJ, Gotthardt D, Nabekura T, Lanier LL (2023) The CD16 and CD32b Fc-gamma receptors regulate antibody-mediated responses in mouse natural killer cells. *J Leukoc Biol* 113:27–40
2. Almalte Z, Samarani S, Iannello A, Debbeche O, Duval M, Infante-Rivard C, Amre DK, Sinnett D, Ahmad A (2011) Novel associations between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia. *Blood* 118:1323–1328
3. Alves LGT, Rajalingam R, Canavez F (2009) A novel real-time PCR method for KIR genotyping. *Tissue Antigens* 73:188–191
4. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E (2006) Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* 25:331–342
5. Bianco C, Patrick R, Nussenzweig V (1970) A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes: I. separation and characterization. *J Exp Med* 132:702–720
6. Biassoni R, Falco M, Cambiaggi A, Costa P, Verdiani S, Pende D, Conte R, Di Donato C, Parham P, Moretta L (1995) Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by „group 2“ or „group 1“ NK clones. *J Exp Med* 182:605–609
7. Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M (2006) The epitope recognized by rituximab. *Blood* 108:1975–1978
8. Bopp C (2026) Verschiedene Wirkmechanismen von Rituximab. BioRenderURL: <https://BioRender.com/d06w40s>
9. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112:461–469
10. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M (1971) Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res* 31:1860–1861
11. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P (2004) From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104:2635–2642
12. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-López A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP (1999) Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 17:1244–1253
13. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, Lister TA (2014) Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* 32:3059–3067
14. Chiossone L, Dumas P-Y, Vienne M, Vivier E (2018) Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 18:671–688

15. Choucair K, Duff J, Cassidy C, Albrethsen M, Kelso J, Lenhard A, Staats H, Patel R, Brunicardi C, Dworkin L, Nemunaitis J (2019) Natural killer cells: a Review of biology, therapeutic potential and challenges in treatment of solid tumors. *Future Oncol* 15:3053–3069
16. Diaz-Peña R, Mondelo-Macía P, Molina de la Torre AJ, Sanz-Pamplona R, Moreno V, Martín V (2020) Analysis of Killer Immunoglobulin-Like Receptor Genes in Colorectal Cancer. *Cells* 9:514–514
17. Dunleavy K, Wilson WH (2015) Primary mediastinal B-cell lymphoma and mediastinal gray zone lymphoma: do they require a unique therapeutic approach? *Blood* 125:33–39
18. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaëlsson J (2010) Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* 115:1166–1174
19. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, Langerbeins P, von Tresckow J, Engelke A, Maurer C, Kovacs G, Herling M, Tausch E, Kreuzer K-A, Eichhorst B, Böttcher S, Seymour JF, Ghia P, Marlton P, Kneba M, Wendtner C-M, Döhner H, Stilgenbauer S, Hallek M (2016) Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* 127:208–215
20. Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, Hunter ZR, Ciccarelli BT, Verselis S, Modica M, Cao Y, Manning RJ, Leleu X, Dimmock EA, Kortsaris A, Mitsiades C, Anderson KC, Fox EA, Treon SP (2007) Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the FcγRIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* 110:2561–2564
21. Jansohn MR S (2012) Isolierung von DNA. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
22. Kaddu-Mulindwa D, Altmann B, Held G, Angel S, Stilgenbauer S, Thurner L, Moritz Bewarder &, Schwier M, Pfreundschuh M, Löffler M, Menhart K, Grosse J, Ziepert M, Herrmann K, Dührsen U, Hüttmann A, Barbato F, Poeschel V, Hellwig D, Altmann B, Poeschel V, Hellwig D (2021) FDG PET/CT to detect bone marrow involvement in the initial staging of patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma: results from the prospective, multicenter PETAL and OPTIMAL>60 trials. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 48:3550–3559
23. Kaddu-Mulindwa D, Altmann B, Robrecht S, Ziepert M, Regitz E, Tausch E, Held G, Poeschel V, Lesan V, Bittenbring JT, Thurner L, Pfreundschuh M, Christofyllakis K, Truemper L, Loeffler M, Schmitz N, Hoth M, Hallek M, Fischer K, Stilgenbauer S, Bewarder M, Rixecker TM (2022) KIR2DS1–HLA-C status as a predictive marker for benefit from rituximab: a post-hoc analysis of the RICOVER-60 and CLL8 trials. *Lancet Haematol* 9:133–142
24. Karnofsky D, Burchenal JH (1949) The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. Columbia Univ Press 196–196
25. Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, Lieberman J (2005) Perforin Triggers a Plasma Membrane-Repair Response that Facilitates CTL Induction of Apoptosis. *Immunity* 23:249–262
26. Keilholz U, Knoth H, Sauer H (2006) Substanzprofile: Zytostatika, Hormone, Zytokine. In: Schmoll H, Höffken K, Possinger K (eds) *Kompendium Internistische*

- Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1547-1727
27. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436:709–713
  28. Kumari S, Mukherjee S, Sinha D, Abdisalaam S, Krishnan S, Asaithamby A (2020) Immunomodulatory Effects of Radiotherapy. *Int J Mol Sci* 21:8151
  29. Lamar Z (2016) The Role of Glucocorticoids in the Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma. *Ann Hematol Oncol* 3:3–7
  30. Lara S, Heilig J, Virtanen A, Kleinau S (2022) Exploring complement-dependent cytotoxicity by rituximab isotypes in 2D and 3D-cultured B-cell lymphoma. *BMC Cancer* 22:678
  31. Li H, Pascal V, Martin MP, Carrington M, Anderson SK (2008) Genetic control of variegated KIR gene expression: Polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLOS Genet* 4:1–11
  32. Lieberman J (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3:361–370
  33. Lin KT, Wang LH (2016) New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. *Steroids* 111:84–88
  34. Lister T, Crowther D, Sutcliffe S, Glatstein E, Canellos G, Young R, Rosenberg S, Coltman C, Tubiana M (1989) Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 7:1630–1636
  35. Liu AY, Robinson RR, Murray ED, Ledbetter JA, Hellström I, Hellström K (1987) Production of a mouse-human chimeric monoclonal antibody to CD20 with potent Fc-dependent biologic activity. *J Immunol* 139:3521–3526
  36. Ljunggren HG, Kärre K (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237–244
  37. Makanga DR, Jullien M, David G, Legrand N, Willem C, Dubreuil L, Walencik A, Touzeau C, Gastinne T, Tessoulin B, Le Gouill S, Mahé B, Gagne K, Chevallier P, Clemenceau B, Retière C (2021) Low number of KIR ligands in lymphoma patients favors a good rituximab-dependent NK cell response. *Oncol Immunology* 10:1–12
  38. Marsh SGE, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H (2003) Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 62:79–86
  39. Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA (2013) Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 87:146–171
  40. McKelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, Haut A, Talley RW, Stephens R, Lane M, Gamble JF, Jones SE, Grozea PN, Gutterman J, Coltman Jr. C, Moon TE (1976)

- Hydroxyldaunomycin (adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer* 38:1484–1493
41. Murphy K, Weaver C (2018) Induzierte angeborene Reaktionen auf eine Infektion. In: Janeway Immunologie. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 95-173
  42. Murphy K, Weaver C (2018) Die Zerstörung antikörperbeschichteter Krankheitserreger mithilfe von Fc-Rezeptoren. In: Janeway Immunologie. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 561-580
  43. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, Abbas K, Moinuddin, Hassan MI, Habib S, Islam S (2024) Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells* 13:1838
  44. Nadler LM, Ritz J, Hardy R, Pesando JM, Schlossman SF, Stashenko P (1981) A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J Clin Invest* 67:134–140
  45. Nigro CL, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC (2019) NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med* 7:105–105
  46. Niu C, Chen Y, Li M, Zhu S, Zhou L, Xu D, Li Z, Xu J, Li W, Wang Y, Cui J (2021) Non-Coated Rituximab Induces Highly Cytotoxic Natural Killer Cells From Peripheral Blood Mononuclear Cells via Autologous B Cells. *Front Immunol* 12:
  47. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP (1982) Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 5:649–655
  48. Parham P (2005) MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 5:201–214
  49. Parham P, Abi-Rached L, Matevosyan L, Moesta AK, Norman PJ, Aguilar AMO, Guethlein LA (2010) Primate-specific regulation of natural killer cells. *J Med Primatol* 39:194–212
  50. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, Belch A, Walewski J, Zinzani PL, Mingrone W, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Corrado C, Scheliga A, Loeffler M, Kuhnt E (2008) Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study. *Lancet Oncol* 9:435–444
  51. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N, Bokemeyer C, Eimermacher H, Ho A, Hoffmann M, Mertelsmann R, Trümper L, Balleisen L, Liersch R, Metzner B, Hartmann F, Glass B, Poeschel V, Schmitz N, Ruebe C, Feller AC, Loeffler M (2008) Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 9:105–116
  52. Pittari G, Liu X-R, Selvakumar A, Zhao Z, Merino E, Huse M, Chewning JH, Hsu KC, Dupont B (2013) NK Cell Tolerance of Self-Specific Activating Receptor KIR2DS1 in Individuals with Cognate HLA-C2 Ligand. *J Immunol* 190:4650–4660

53. QIAGEN (2023) Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol). QIAGEN, Hilden. URL: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
54. Ramírez-Labrada A, Pesini C, Santiago L, Hidalgo S, Calvo-Pérez A, Oñate C, Andrés-Tovar A, Garzón-Tituaña M, Uranga-Murillo I, Arias MA, Galvez EM, Pardo J (2022) All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. *Front Immunol* 13:
55. Ruppert AS, Dixon JG, Salles G, Wall A, Cunningham D, Poeschel V, Haioun C, Tilly H, Ghesquieres H, Ziepert M, Flament J, Flowers C, Shi Q, Schmitz N (2020) International prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma: a comparison of IPI, R-IPI, and NCCN-IPI. *Blood* 135:2041–2048
56. Sacchi S, Federico M, Dastoli G, Fiorani C, Vinci G, Clò V, Casolari B (2001) Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 monoclonal antibody Rituximab. *Crit Rev Oncol Hematol* 37:13–25
57. Sanseviero E (2019) NK Cell-Fc Receptors Advance Tumor Immunotherapy. *J Clin Med* 8:1667
58. Screpanti V, Wallin RPA, Ljunggren H-G, Grandien A (2001) A Central Role for Death Receptor-Mediated Apoptosis in the Rejection of Tumors by NK Cells<sup>1</sup>. *J Immunol* 167:2068–2073
59. Shahrokh Esfahani M, Alig S, Mehrmohamadi M, Hamilton EG, King DA, Schultz A, Steen CB, Macaulay C, Sworder B, Kurtz DM, Diehn M, Alizadeh AA (2021) Noninvasive Cell-of-Origin Classification of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using Inferred Gene Expression from Cell-Free DNA Sequencing. *Blood* 138:37–37
60. Shan D, Ledbetter JA, Press OW (1998) Apoptosis of Malignant Human B Cells by Ligation of CD20 With Monoclonal Antibodies. *Blood* 91:1644–1652
61. Shi Y, Sun Y, Seki A, Rutz S, Koerber JT, Wang J (2024) A real-time antibody-dependent cellular phagocytosis assay by live cell imaging. *J Immunol Methods* 531:113715–113715
62. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG (2001) High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR\*. *J Biol Chem* 276:6591–6604
63. Shipp MA (1993) A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 329:987–994
64. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2019) Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69:7–34
65. Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, Kidd KK, Carrington M (2007) Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet* 39:1114–1119
66. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF (1980) Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 125:1678–1685
67. Stringaris K, Marin D, Barrett AJ, Hills R, Sobieski C, Cao K, Saltarrelli JG, Daher M, Shaim H, Smith N, Linch D, Gale R, Allen C, Sekine T, Mehta R, Champlin R,

- Shpall EJ, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Rezvani K (2016) KIR gene haplotype: an independent predictor of clinical outcome in MDS patients. *Blood* 128:2819–2823
68. Swerdlow SH, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein HT, Thiele J (2017) WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon
69. Terszowski G, Klein C, Stern M (2014) KIR/HLA Interactions Negatively Affect Rituximab- but Not GA101 (Obinutuzumab)-Induced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J Immunol* 192:5618–5624
70. Thurner L, Ziepert M, Berdel C, Schmidt C, Borchmann P, Kaddu-Mulindwa D, Viardot A, Witzens-Harig M, Dierlamm J, Haenel M, Metzner B, Wulf G, Lengfelder E, Keller UB, Frickhofen N, Nickelsen M, Gaska T, Griesinger F, Mahlberg R, Marks R, Shpilberg O, Lindemann H-W, Soekler M, Fischer Von Weikersthal L, Kiehl M, Roemer E, Bentz M, Krammer-Steiner B, Trappe R, De Nully Brown P, Federico M, Merli F, Engelhard M, Glass B, Schmitz N, Truemper L, Bewarder M, Hartmann F, Murawski N, Stilgenbauer S, Rosenwald A, Altmann B, Schmidberger H, Fleckenstein J, Loeffler M, Poeschel V, Held G, on behalf of German Lymphoma Alliance (GLA) (2023) Radiation and Dose-densification of R-CHOP in Aggressive B-cell Lymphoma With Intermediate Prognosis: The UNFOLDER Study. *HemaSphere* 7:e904
71. Uhrberg M, Parham P, Wernet P (2002) Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 54:221–229
72. Van Sorge N m., Van Der Pol W-L, Van De Winkel J g. j. (2003) FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 61:189–202
73. Vega MI, Huerta-Yepe S, Martinez-Paniagua M, Baritaki S, Bonavida B (2010) An ADCC-Independent Mechanism of Rituximab-Mediated B-NHL Cells Depletion Via Sensitization to Cell Death through the Expression of TRAIL on NK Cells. *Blood* 116:4919
74. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, Gallagher MM, Malkki M, Petersdorf E, Dupont B, Hsu KC (2012) HLA-C – Dependent Prevention of Leukemia Relapse by Donor Activating KIR2DS1. *N Engl J Med* 367:805–816
75. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD (2012) Natural killer cell-produced IFN-γ and TNF-α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 91:299–309
76. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM (2015) NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 6:
77. Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT (1999) Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation* 68:1784–1789
78. Zöphel S, Küchler N, Jansky J, Hoxha C, Schäfer G, Weise JJ, Vialle J, Kaschek L, Stopper G, Eichler H, Yildiz D, Moter A, Wendel P, Ullrich E, Schormann C, Rixecker T, Cetin O, Neumann F, Orth P, Bewarder M, Hoth M, Thurner L, Schwarz EC

- (2024) CD16+ as predictive marker for early relapse in aggressive B-NHL/DLBCL patients. Mol Cancer 23:210
79. (2025) DSHNHL - Non-Hodgkin-Lymphome. URL: <https://www.dshnhl.org/>
80. (2025) Randomisierte Studie zum Vergleich einer kombinierten Immunochemotherapie mit 6 Zyklen des monoklonalen anti-CD20- Antikörpers Rituximab in Kombination mit 6 Zyklen einer Chemotherapie mit CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) in 21-tägigen Intervallen oder 14-tägigen Intervallen jeweils mit und ohne konsolidierende Strahlentherapie von großen Tumormassen und/oder Extranodalbefällen bei Patienten mit aggressiven CD20+ B-Zell-Lymphomen im Alter von 18-60 Jahren mit altersadaptiertem IPI = 1 (alle) oder IPI = 0 mit großen Tumormassen (Durchmesser  $\geq$  7.5 cm). URL: [https://cdn-links.lww.com/permalink/hs/a/hs\\_7\\_7\\_2023\\_06\\_21\\_turner\\_hemasphere-2022-0424\\_sdc2.pdf](https://cdn-links.lww.com/permalink/hs/a/hs_7_7_2023_06_21_turner_hemasphere-2022-0424_sdc2.pdf)

### 6.5. Danksagung

Für die Überlassung meiner Dissertation und das damit entgegengebrachte Vertrauen sowie für die herausragend gute Betreuung möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. Torben M. Rixecker und meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Lorenz Thurner meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Team des José Carreras Institut für Immun- und Genterapie des Univeristätsklinikums des Saarlandes und im Besonderen Frau Evi Regitz für das Beibringen aller relevanten praktischen Fähigkeiten der Laborarbeit und die Bereitschaft, mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Verfügung zu stehen.

Für die zur Verfügungstellung der Daten möchte ich mich beim Studiensekretariat der Klinik für Innere Medizin I und im Besonderen bei Frau Dr. med. Viola Pöschel und Frau Daniela Ehlert bedanken.

Für die statistische Analyse der Daten möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Frau Catherine die mich durch alle Höhen und Tiefen beim Erstellen dieser Dissertation begleitet hat.

Diese Arbeit möchte ich meiner Familie widmen, im Besonderen meinen Eltern Claus und Evamaria Fuchs die mich immer gefördert haben und mir beibrachten, dass man als Team mit Beharrlichkeit und Freude alles erreichen kann. Ebenso widme ich sie meinem Bruder Alexander Fuchs, der für mich allzeit als Freund und Unterstützer präsent war und meiner kleinen Tochter Noemi.

## 7. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 16.06.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Lorenz Thurner

Prof. Dr. Stefan Wagenpfeil