

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer, FRCPE

**Zytokingenpolymorphismen bei Kindern mit akuter
lymphatischer Leukämie**

**Genetic cytokine polymorphism in children with acute
lymphoblastic leukaemia**



Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität

vorgelegt von
Julia Taschik
aus Neumark (Vogtland)

Würzburg 2016

Eingereicht am: 21.Januar 2016

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender:	Professor Dr. med. Thomas Haaf
1. Betreuer:	Professor Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel
2. Betreuer:	PD Dr. med. Stefan Knop
3. Betreuer:	PD Dr. med. Verena Wiegering

Tag des Promotionskolloquiums: 09.Mai 2016

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter	1
1.1.1	Definition, Epidemiologie und historischer Hintergrund	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.3	Diagnostik, Klassifikation und Risikostratifizierung	4
1.1.4	Therapie und Prognose	8
1.2	Zytokine	9
1.2.1	Definition	9
1.2.2	Ausgewählte Zytokine	10
1.2.3	Polymorphismen	12
1.2.4	Therapeutische Anwendung von Zytokinen	15
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	17
2	Material	18
2.1	Studiendesign	18
2.2	Patienten	18
2.3	Geräte	19
2.4	Laborbedarf	20
2.5	Chemikalien, Enzyme, Kits und Primer	21
3	Methoden	22
3.1	DNA Extraktion	22
3.2	Photometrische Quantifizierung von DNA	23
3.3	Polymerase-Kettenreaktion	23
3.4	Primersequenzen	26
3.5	Gelelektrophorese	27
3.6	Statistische Analysen	29

4	Ergebnisse	30
4.1	Patientencharakteristika	30
4.2	Klinischer Befund und Blutbild	32
4.2.1	Vergleich der Risikogruppe mit dem Geschlecht, der Leukämieart und bei Stammzelltransplantation	32
4.2.2	Vergleich der Leukämieart mit der ZNS-Beteiligung	34
4.2.3	Vergleich der Rezidivfreiheitsrate mit dem Alter und der SZT-Indikation	34
4.2.4	Klinischer Befund, Translokationen und Leukozytenzahlen	36
4.3	Zytokine	37
4.3.1	Zytokingenfrequenzverteilung	37
4.3.2	Auswertung der Ergebnisse	39
4.4	Einfluss der Zytokingenpolymorphismen auf die Risikogruppe und die initialen Leukozytenzahlen	44
4.4.1	TNF- α	44
4.4.2	TGF- β 1	44
4.4.3	IL-10	45
4.4.4	IL-6	46
4.4.5	IFN- γ	46
4.5	Einfluss der lymphatischen Blasten auf die Zytokingenpolymorphismen	47
4.6	Einfluss der Zytokingenpolymorphismen auf die Rezidivrate und die Gesamtüberlebensrate	49
5	Diskussion	52
5.1	Einführende Bemerkungen	52
5.2	Klinische Parameter	52
5.3	Zytokingenpolymorphismen	53
5.3.1	TNF- α	54
5.3.2	IL-10	55
5.3.3	TGF- β 1	56
5.3.4	IL-6	58

5.3.5 IFN- γ	60
6 Zusammenfassung	61
7 Summary	64
8 Anhang	66
9 Abbildungsverzeichnis	68
10 Tabellenverzeichnis	70
11 Literaturverzeichnis	72
Danksagung	
Eidesstattliche Erklärung	
Affidavit	

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AIEOP	Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica
ALL-BFM	Berlin-Frankfurt-München Behandlungsprotokoll der akuten lymphatischen Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
B-ALL	akute lymphatische Leukämie der B-Zelllinie
BCR-ABL	breakpoint cluster region - Abelson Murine Leukemia Viral Onkogen Homolog 1
Bp	Basenpaare
CI	Konfidenzintervall
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIL	European Group for Immunological Characterization of Leukemias
g	Gramm
GvHD	Graft versus Host Disease
HR	high risk group (Hochrisikogruppe)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon gamma
m	männlich
M	Mol
mg	Milligramm
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
min	Minuten
mol/l	Mol pro Liter
ng	Nanogramm
n. s.	nicht signifikant

MR	medium risk group (mittleres Risiko)
MRD	Minimal residual disease (Minimale Resterkrankung)
MW	Mittelwert
RNAse	Ribonuklease
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline
SNP	single nucleotide polymorphism = Einzelnukleotidpolymorphismus
SR	standard risk group (Standardrisikogruppe)
SZT	Stammzelltransplantation
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
T-ALL	akute lymphatische Leukämie der T-Zelllinie
Taq Polymerase	Polymerase aus thermophilus aquaticus
TEL/AML1	Translokation ETS-like Leukemia / Acute myeloid Leukemia 1 protein
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
T _H	T-Helferzellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Unit
VK	Verlaufskontrolle
w	weiblich
y	Jahre
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter

1.1.1 Definition, Epidemiologie und historischer Hintergrund

Maligne Tumoren und Leukämien sind seltene Erkrankungen im Kindesalter. Jährlich erkranken in Deutschland circa 1800 Kinder unter 15 Jahren an einer Krebserkrankung. Aufgrund der Malignität sind Tumorerkrankungen nach Unfällen die zweithäufigste Todesursache nach dem ersten Lebensjahr. Leukämien, myeloproliferative und myelodysplastische Erkrankungen sind mit 34% aller Malignome die häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern im Alter von unter 15 Jahren, gefolgt von Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) mit etwa 24% und Lymphomen mit circa 11% [1]. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist mit 27% aller Malignome die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter und betrifft pro Jahr in Deutschland etwa 600 neue Patienten [1]. Eine ALL kann in allen Altersstufen auftreten und hat eine Inzidenz von 1,5/100.000 Einwohner pro Jahr. Der absolute Häufigkeitsgipfel (5,3/100.000) liegt mit 80% aller ALL im Kindesalter (jünger als 4 Jahre) gefolgt von einem zweiten Gipfel ab einem Alter von 80 Jahren (2,3/100.000). Darüber hinaus ist eine Prädominanz des männlichen Geschlechtes (1:1,4) zu verzeichnen [1-3].

Leukämien sind bösartige, hämatopoetische Erkrankungen, die durch eine klonale Vermehrung unreifer Leukozyten (Leukoblasten) im Knochenmark charakterisiert sind. Je nach Verlaufsform unterscheidet man akute und chronische Leukämien. Die akuten Leukämien können in zwei Erscheinungsformen auftreten, wobei es bei der ALL zu einer Entartung der lymphozytären Vorstufen des lymphatischen Gewebes kommt, während bei akuten myeloischen Leukämien (AML) die Zellen der Myelopoese im Knochenmark ein malignes Wachstum aufweisen. Das charakteristische Merkmal der ALL ist eine pathologische Proliferation in der B- oder T-Zellreihe. Diese undifferenzierten, bösartigen Vorläuferzellen (Leukoblasten) reifen nur bis zu einer bestimmten Differenzierungsebene aus und akkumulieren dann im Knochenmark, im Blut sowie in lymphatischen Geweben (Lymphknoten, Milz) und in nicht-lymphatischen Geweben (ZNS,

Knochen). Durch ihr ungesteuertes Wachstum wird die physiologische Hämatopoese im Knochenmark supprimiert und verdrängt. Die Folge sind Anämien, Thrombo- und Granulozytopenien mit den klinischen Symptomen von Blässe, Fatigue-Symptomatik, Hämatomneigung und Infektanfälligkeit. Darüber hinaus kommt es bei einer weiteren Vermehrung der lymphatischen Blasten zu einer extramedullären Infiltration, die sich klinisch durch Knochenschmerzen, einer generalisierten Lymphadenopathie, einer Hepatosplenomegalie sowie einer Meningeosis leucaemica darstellen kann.

Der früheste Bericht über Leukämien geht auf Alfred-Armand-Louis-Marie Valpeau im Jahr 1827 zurück [4]. In den Jahren 1844/45 beschrieben Alfred Donné [5], John Bennett [6] und Rudolf Virchow [7] unabhängig voneinander die starke Vermehrung von weißen Blutkörperchen, ehe 1847 Rudolf Virchow [8] den Begriff „Leukämie“ (griechisch für Weißblütigkeit) prägte. Erst mit der Entwicklung von Färbeverfahren für Blutaussstriche durch Paul Ehrlich [9] im Jahr 1878 und der Beschreibung der Myeloblasten und Myelozyten durch Otto Naegeli [10] konnte man neue Erkenntnisse über die Morphologie der Leukämie gewinnen und zwischen den verschiedenen Erscheinungsformen differenzieren. Mit der Erkenntnis des gemeinsamen Ursprungs von Erythrozyten und Leukozyten aus einer Stammzelle legte Hans Hirschfeld [11] den Grundstein für das heutige Verständnis des Krankheitsbildes.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Verschiedene bisher noch nicht bekannte Ursachen können zu Veränderungen einer lymphatischen Zelle mit maligner Entartung führen. Bei der Ursachenforschung konnten inzwischen diverse Faktoren identifiziert werden, die mit einer erhöhten Inzidenz akuter Leukämien assoziiert sind.

Die hohe Anzahl an Neuerkrankungen im Kindesalter spricht dafür, dass erbliche Komponenten eine entscheidende Rolle spielen. Diese verursachen unterschiedliche Modifikationen in den Stammzellen und stören den normalen Reifeprozess der weißen Blutkörperchen. Die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen untermauert diese Theorie. So konnte bewiesen werden, dass der nicht

erkrankte Zwilling ein um 20% erhöhtes Erkrankungsrisiko gegenüber einem nicht verwandten Kind besitzt [12]. Geschwisterkinder und zweieiige Zwillinge haben ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko, ebenfalls zu erkranken [13]. Auch bestimmte chromosomale Störungen wie das Down-Syndrom, die Fanconi Anämie, die Neurofibromatose, die Agammaglobulinämie oder kongenitale Defekte von DNA-Reparaturmechanismen, z. B. die Ataxia teleangiectasia, sind mit Leukämien assoziiert [14-16].

Andere Ansätze beschreiben eine monoklonale Entstehung präleukämisch veränderten Materials bei einem Zwilling und einer „Metastasierung“ über die placentare Gefäßverbindung in den anderen Zwilling. Karin B. Gale und Anthony M. Ford konnten beweisen, dass 70% aller erkrankten Zwillinge bis zum 13. Lebensjahr bereits zu Geburt präleukämische Zellen mit den gleichen molekulargenetischen Marker aufwiesen [17-19].

Laut der Knudson-Hypothese sind zwei genetische Veränderungen für die Entstehung eines Tumors ausreichend [20]. Diese Hypothese wurde von Mel Greaves auf die kindlichen Leukämien übertragen, wobei man davon ausgeht, dass eine erste genetische Veränderung bereits in utero stattfindet und die zweite, welche die Leukämie auslöst, durch bestimmte Expositionen hervorgerufen wird [21]. Studien bei erkrankten Kindern konnten durch retrospektive Untersuchungen aus Guthrie-Karten-Blut beweisen, dass Kinder, die später an einer Leukämie erkrankt sind, bereits kurz nach der Geburt präleukämische Anomalien aufwiesen [22]. Tatsächlich besitzen viel mehr Neugeborene diese veränderte präleukämischen Oberflächenexpression als später an Leukämie erkranken, sodass ein zusätzliches postnatales Ereignis unerlässlich ist, um den onkogenen Prozess in Gang zu setzen.

Zu diesen postnatalen Einflüssen zählen beispielsweise ionisierende Strahlungen. Aber auch das konventionelle Röntgen, besonders bei Exposition in utero oder im frühen Kindesalter, erhöht das Risiko, an einer ALL zu erkranken. Die hohe Inzidenz von Leukämien unter den Überlebenden der Atombombenexplosionen im zweiten Weltkrieg in Japan ist der traurige Beweis der leukämieauslösenden Wirkung ionisierender Strahlung [23].

Als weitere Risikofaktoren gelten karzinoide Chemikalien (u.a. Benzol und Pestizide), Strahlen- und Chemotherapie im Rahmen einer vorherigen Tumorbehandlung [24] sowie Tumoviren. Nach der Erkenntnis, dass das humane T-Zell-Leukämie-Virus-Typ I (HTLV I) mit der Erwachsenen T-Zell-Leukämie und das Epstein-Barr-Virus mit dem Hodgkin- und Burkitt-Lymphom assoziiert ist, wurden Mutmaßungen angestellt, dass die ALL bei Kindern eine durch Viren mitverursachte Krankheit sein könnte [25, 26].

1.1.3 Diagnostik, Klassifikation und Risikostratifizierung

Bei Verdacht einer Leukämieerkrankung ist die Durchführung einer Knochenmarkspunktion obligatorisch. Durch mikroskopische Untersuchung des Knochenmarks kann anhand der Zytomorphologie der Verdacht einer akuten Leukämie geäußert werden, wenn mindestens 20 bis 25% lymphatische Blasten im Knochenmark zu finden sind. Anhand bestimmter Proteine an der Zelloberfläche der Leukämiezellen unterscheidet man zwischen verschiedenen Subtypen der akuten lymphatischen Leukämie, die aufgrund verschiedener Therapieansätze Einfluss auf die Prognose haben. Zur Diagnosebestätigung und Klassifikation dient die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung. Mithilfe dieser Immunphänotypisierung konnte man herausfinden, dass circa 85% aller pädiatrischen ALL der B-Zell- und circa 15% der T-Zell-Reihe zuzuordnen sind. Darüber hinaus kann man Subtypen der ALL nach ihrem Reifegrad einteilen, wie in Abbildung 01 dargestellt ist:

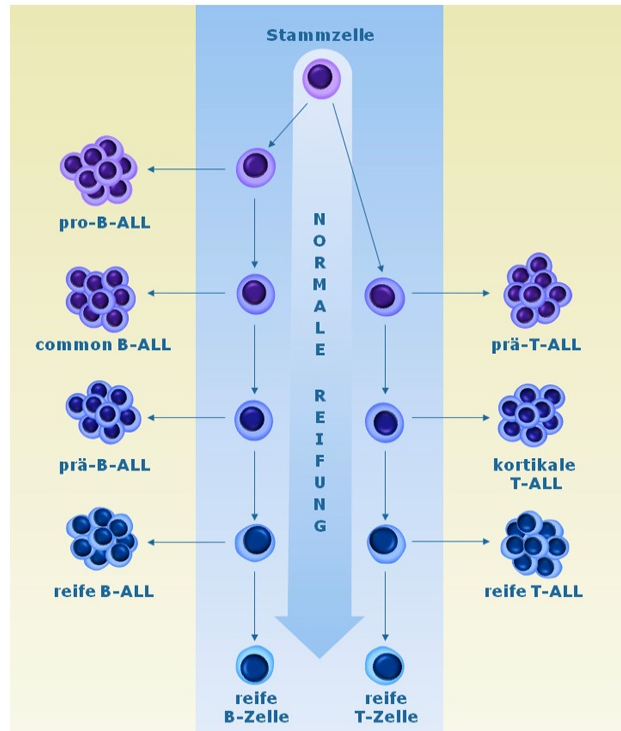


Abbildung 01: Subtypen der ALL aus den lymphatischen Zellen der verschiedenen Reifestufen. Grafik entnommen aus [27].

Unspezifische und unreife Zellen findet man bei der pro-B-ALL, gefolgt von der common-B-ALL, der prä-B-ALL bis zur reifen-B-ALL. Die reife B-ALL ähnelt am ehesten dem physiologischen Lymphozyten und wird auch als Burkitt Lymphom bezeichnet. Gleiches gilt für die T-Zell-Linie, die sich in pro-T, prä-T, kortikale und reife T-Zell-ALL unterscheidet (siehe Abbildung 02) [28].

Immunphänotypen bei ALL

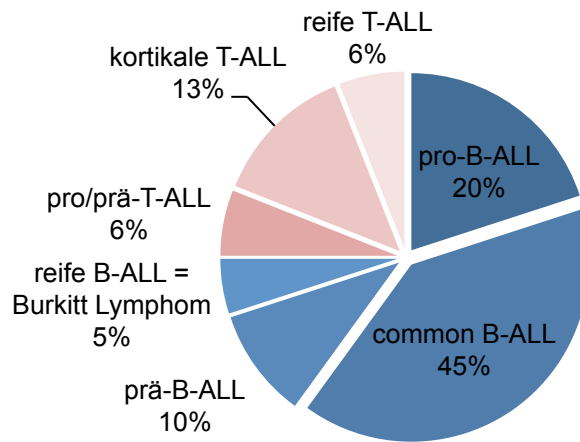


Abbildung 02: Relative Häufigkeit der Immunphänotypen bei Patienten mit ALL basierend auf der EGIL Klassifikation (European Group for Immunological Characterization of Leukemias) [29]. Daten entnommen von [27].

Eine wesentlich sensitivere Methode als die üblichen Verfahren (Zytomorphologie, Immunphänotypisierung) ist das molekulare Monitoring der Resttumorlast („Minimal Residual Disease“, MRD). Mithilfe einer Echtzeit Polymerasekettenreaktion (PCR) ist der Nachweis von lymphatischen Blasten weit unterhalb der zytologischen Nachweisgrenze noch möglich. Dabei kann eine einzelne Leukämiezelle unter 10.000 bis 100.000 gesunden Zellen detektiert werden, so dass es möglich ist, dass bei Patienten Leukämiezellen nachgewiesen werden, obwohl sie sich klinisch als auch zytologisch in Remission befinden. Der MRD-Wert wird im Therapieverlauf mehrfach ermittelt, um zu bestimmen, zu welchem Grad der Patient auf die Therapie anspricht. Derzeit ist der MRD-Wert, der wichtigste klinische Prognosefaktor, dem zugleich eine entscheidende Bedeutung bei der Risikostratifizierung und Therapiesteuerung zukommt [30, 31].

Zusätzlich werden strukturelle Aberrationen im Zellkern mittels Zytogenetik untersucht. So werden beispielsweise Translokationen zwischen Chromosomen

12 und 21 (TEL/AML1) detektiert. Patienten mit einem TEL/AML1 Fusionsgen haben im Vergleich zu Patienten mit einem Philadelphia Chromosom (t (9;22), BCR-ABL-Fusionsgen) und solchen ohne Translokationen eine gute Prognose [32]. In Tabelle 01 sind die wesentlichen zytogenetischen Aberrationen aufgelistet, die für die Risikostratifizierung von Bedeutung sind:

Zytogenetische Veränderung	Gen	Subtyp der Leukämie	Prognose
Hyperdiploidie (>50)			günstig
Hypodiploidie (<45)			ungünstig
Chromosomen-translokation t (12;21)	TEL/AML 1	B-Vorläufer ALL	günstig
Chromosomen-translokation t (1;19)	E2A-PBX1	prä-B-ALL	günstig
Chromosomen-translokation t (9;22)	BCR-ABL	Ph1-positive ALL	ungünstig, aber neue spezifische Therapieansätze durch Tyrosinkinaseinhibitoren
Chromosomen-translokation t (4;11)	AF4-MLL	pro-B-ALL	ungünstig

Tabelle 01: Risikostratifizierung, basierend auf [28, 33].

Ebenso sollte bei jedem Patient mit der morphologisch gesicherten Diagnose einer Leukämie eine Lumbalpunktion durchgeführt werden, um den prognostisch ungünstigen Faktor einer ZNS-Beteiligung auszuschließen. Finden sich mehr als 5 Leukämiezellen/ μ l Liquor ist der Patienten ZNS positiv und erhält zusätzlich eine adäquate ZNS-Behandlung [34].

Zunehmend werden biologische Marker bei verschiedenen Tumoren zur Risikostratifizierung herangezogen. Beispielweise gilt die Amplifikation von N-Myc bei Neuroblastomen als wichtigstes molekulares Kriterium und ist mit einer

schlechteren Prognose assoziiert [35]. Gleiches gilt für das BRCA1-Gen, welches die Wahrscheinlichkeit eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms erhöht [36]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist man beständig auf der Suche nach neuen Risikostratifizierungsmarkern, um die Krankheits- und Risikobeurteilung zu optimieren und die Therapie bei gleichzeitiger Prognoseverbesserung zu intensivieren. Im Zusammenspiel des Immunsystems nehmen Zytokine eine zentrale Rolle ein, weshalb nicht nur die Zytokine selbst, sondern auch ihre Genpolymorphismen, zunehmend in den Fokus von Risikostratifizierungsuntersuchungen rücken.

1.1.4 Therapie und Prognose

Die ALL ist keine einheitliche Erkrankung, sondern umfasst verschiedene Subgruppen, die sich hinsichtlich des Krankheitsverlaufs, der Prognose und der Therapie deutlich voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund sollte eine risikoadaptierte Therapiestrategie verschiedene biologische Parameter (initiale Blastenzahl, Zytogenetik, Therapieansprechen usw.) einbeziehen. Durch eine exakte Bestimmung der Risiko- und Prognosefaktoren werden Patienten gemäß der AIEOP-BFM ALL 2009 in verschiedene Risikogruppen eingeteilt (HR - Hochrisiko, MR - mittleres Risiko, SR - Standardrisiko). Dies gewährleistet eine individuelle Therapieintensivierung bei einer Hochrisikoleukämie und ermöglicht gleichzeitig bei günstiger Prognose einen Verzicht auf toxische Substanzen.

Die Therapie der ALL umfasst eine intensive zweijährige Polychemotherapie und unterteilt sich in mehrere Phasen: Induktions-, Konsolidierungs-, Reinduktionsphase. Nach diesen drei intensiven Behandlungsabschnitten schließt sich die Erhaltungstherapie bis zum Ende des zweijährigen Therapiezeitraums an. Der radikalen Reduktion der Tumorlast mit Wiederherstellung der normalen Hämatopoese und dem Erreichen einer kompletten Remission stehen viele Nebenwirkungen der Chemotherapeutika mit ihren Spätfolgen gegenüber. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, eine bestmögliche Risikostratifizierung vorzunehmen, um die Prognose im Rahmen einer individualisierten Therapie langfristig zu verbessern und darüber hinaus Nebenwirkungen zu minimieren.

Kinder, bei denen nach der Induktionsphase noch über 25% lymphatische Blasten im Knochenmark nachgewiesen werden oder aufgrund anderer Ursachen dem Hochrisikozweig zugeordnet wurden (z. B. zytogenetische Aberrationen), erhalten die Indikation für eine Stammzelltransplantation (SZT). Gleiches gilt für Patienten, die ein molekulares Therapieversagen oder ein molekulares Rezidiv (MRD $>10^{-4}$) während des Behandlungszeitraums oder kurz vor Ende der Therapie aufweisen [37, 38].

Durch systematische Erhebung und Auswertung von Daten im Rahmen der ALL-BFM-Studiengruppe konnte die Prognose kontinuierlich verbessert werden. Seit 1970 bis 2015 stieg die Heilungsrate durch eine einheitliche, multizentrische Therapie von 20% auf 80% bis 90% an. In einzelnen Gruppen, wie beispielsweise bei Patienten mit einer TEL-AML-Translokation, liegen die Heilungschancen derzeit bei bis zu 98% [1, 39, 40]. Im Falle ungünstiger Risikofaktoren kann die Heilungschance trotz intensiver Behandlung deutlich unter 80% liegen. Bei Kindern mit einem Rezidiv geht man von einer 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von etwa 35% bis 40% aus [41]. Unbehandelt verläuft eine akute lymphatische Leukämie innerhalb von Wochen bis Monaten tödlich [42].

1.2 Zytokine

1.2.1 Definition

Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die die Proliferation, Stimulation und Differenzierung verschiedener Zellen modulieren und somit Einfluss auf die Immunantwort nehmen. Sie werden unter anderem von Monozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet, sind äußerst potent und erzielen ihre Effekte bei Konzentrationen von weniger als 10^9 mol/l [43].

Generell unterscheidet man proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 von den antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-10, IL-11 und TGF- β 1. Eine durch IL-12 initiierte Typ 1 T-Helferzelle (T_H1) betonte Immunantwort hat eine vermehrte Produktion von IL-2, IFN- γ und TNF-

α zur Folge und begünstigt eine zellvermittelte Abwehr. Im Gegensatz dazu ist die T_H2 -Zelle Teil der humoralen Immunität und ist durch die Zytokine IL-4, IL-6, IL-10 und IL-13 charakterisiert. T-Helferzellen fördern durch die produzierten Zytokine ihre eigene Entwicklung und hemmen gleichzeitig die andere T-Helfersubpopulation. Sowohl T_H1 - als auch T_H2 -vermittelte Immunantworten werden durch Antigene induziert und können Entzündungsreaktionen auslösen. Dabei entscheidet letztlich das lokale Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, ob sich eine Entzündung chronifiziert oder der Patient gesundet [44].

Diese Einteilung ist eine vereinfachte Darstellung, da es durch deutlich verbesserte Untersuchungsmethoden immer schwieriger wird, T-Helferzellen in nur zwei Gruppen zu unterscheiden. Beispielweise zählt TGF- β 1 zu den Zytokinen, denen keine sichere pro- bzw. antiinflammatorische Funktion zugeordnet werden kann, weshalb man diesen Zellen die Bezeichnung T_H0 -Zellen gegeben hat. Aus diesem Grund spricht man heute von einer T_H1 - oder T_H2 -dominierten Immunantwort, da belegt werden konnte, dass unter verschiedenen Bedingungen ein und dieselbe Zelle sowohl eine T_H1 - als auch eine T_H2 -typische Immunantwort zeigen kann [45].

1.2.2 Ausgewählte Zytokine

Viele Infektions-, Autoimmun- oder Tumorerkrankungen scheinen durch das Produktionsprofil der Zytokine beeinflusst zu werden. Während TNF- α , und IFN- γ durch ihre proinflammatorischen Eigenschaften vor allem der Abwehr von intrazellulären Erregern dienen, modulieren TGF- β 1, IL-6 und IL-10 die B-Zellaktivierung, deren Wachstum sowie die Immunantwort auf bakterielle Infektionen [46, 47].

In Tabelle 02 wird auf die Funktion der für diese Arbeit relevanten Zytokine eingegangen:

Zytokin	Charakteristika
TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> • proinflammatorisches Zytokin • Produktionsort: T_H1-Zellen und Monozyten • verstärkt die lytische Wirkung von Makrophagen • stimuliert die Produktion von neutrophilen Granulozyten und verbessert ihre Funktion
TGF- β 1	<ul style="list-style-type: none"> • sowohl pro- also auch ein antiinflammatorisches Zytokin • Produktionsort: Makrophagen, Monozyten ggf. Tumorzellen (fortgeschrittenes Stadium) • inhibiert T_H1-Zellen, zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen und neutrophile Granulozyten • wirkt bei Tumoren als Tumorsuppressorgen antiangiogenetisch, antiproliferativ und proapoptisch • kann als Tumorpromotor bei gleichzeitiger Suppression des Immunsystems wirken • Förderung der Fibrosierung sowie der Neoangiogenese (Wundheilung) • stimuliert gemeinsam mit IL-10 den Klassenwechsel in B-Zellen auf Immunglobulin A Antikörper (IgA)
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • antiinflammatorisches Zytokin • Produktionsort: T_H2-Zellen und Monozyten • hemmt die lytische Wirkung von Makrophagen • fördert die Proliferation sowie Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle • stimuliert zytotoxische T-Zellen
IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> • proinflammatorisches Zytokin • Produktionsort: T_H1-Zellen und natürliche Killerzellen • verstärkt die lytische Wirkung von Makrophagen • bewirkt einen Klassenwechsel der Antikörper von IgM zu IgG

IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • proinflammatorisch (stimuliert IFN-γ-Ausschüttung) als auch anti-inflammatorisch (inhibiert die Synthese von TNF-α) • Produktionsort: T_H2-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Epithelien • stimuliert Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten • regt die Sekretion von Immunglobulinen an • diagnostische Bedeutung als Verlaufsparemeter bei bakteriellen Infektionen (Sepsis)
------	---

Tabelle 02: Zusammenfassende Charakterisierung der für diese Studie relevanten Zytokine, basierend auf [48-56].

1.2.3 Polymorphismen

Ein entscheidender Faktor zur Verbesserung der ALL-Therapie ist die Suche nach und Identifizierung von Risikofaktoren, die Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Prognose nehmen oder mit Komplikationen assoziiert sind. Da Zytokine eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Immunantwort spielen, könnten Varianten innerhalb dieser Gene Einfluss auf den Verlauf einer ALL nehmen.

Allele sind Variationen eines bestimmten Gens an einer bestimmten Position (Genlocus), die durch Amplifikation, Insertion, Deletion oder Substitution einzelner Nukleotide oder Genabschnitte sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen entstehen. Findet man mehr als ein Allel eines Gens innerhalb einer Population (>1% Frequenz der Genvariante) spricht man von genetischen Polymorphismen. Die häufigsten Polymorphismen des menschlichen Genoms sind die Ein-Basen-Austausche, sogenannte Einzelnukleotidpolymorphismen („Single Nucleotide Polymorphism“, SNP). Liegt ein SNP in einer regulatorischen Region vor, kann dies zu einer Verstärkung oder Abschwächung der Gentranskription führen [57]. Am Beispiel der Zytokine kommt es zu unterschiedlichen Zytokinexpressionen, die in Tabelle 03 zusammengefasst werden:

Zytokin	Position	Genotyp	Expressionsrate
TNF- α	-308 (Promoter)	G/G, G/A, A/A	G/G (niedrig) G/A (hoch) A/A (hoch)
TGF- β 1	Position +869 (Codon 10)	T/T, T/C, C/C	T/T G/G (hoch) T/C G/G (hoch)
	Position +915 (Codon 25)	G/G, G/C, C/C	T/C G/C (mittlere) C/C G/G (mittlere) T/T G/C (mittlere) C/C G/C (niedrig) C/C C/C (niedrig) T/T C/C (niedrig) T/C C/C (niedrig)
IL-10	-1082 (Promoter)	A/A, A/G, G/G	GCC/GCC (hoch)
	-819 (Promoter)		GCC/ACC (mittlere) GCC/ATA (mittlere)
	-592 (Promoter)		ACC/ACC (niedrig) ACC/ATA (niedrig) ATA/ATA (niedrig)
IL-6	-174 (Promoter)	G/G, G/C, C/C	G/G (hoch) G/C (hoch) C/C (niedrig)
IFN- γ	+874 (intron 1)	T/T, T/A, A/A	T/T (hoch) T/A (mittlere) A/A (niedrig)

Tabelle 03: Zytokingenpolymorphismen sowie deren Expressionsrate, Tabelle übernommen aus [58].

Die Bedeutung der Polymorphismen wurde bereits in verschiedenen klinischen Situationen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-10 durch ihre gegensätzlichen Wirkungsweisen Einfluss auf den Verlauf einer Erkrankung nehmen [59, 60]. Für den TNF- α -308 SNP konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Infektionen, Autoimmunerkrankungen (Rheumatoiden Arthritis, Psoriasisarthritis, M. Crohn) sowie Transplantatabstoßungen gefunden werden [50]. So haben Organempfänger mit einem TNF- α A-Allel („high producer“) und einem IL-10 -1082 A-Allel („low producer“) ein höheres Risiko, nach einer Herztransplantation eine akute Abstoßungsreaktion zu entwickeln [56]. Bei Nierentransplantationen hingegen kam es gehäuft zu Komplikationen, wenn ein homozygoter Polymorphismus im IL-10 -1082 G-Allel („high producer“) oder im TNF- α -Gen ein A-Allel („high producer“) vorlag [61, 62]. Ferner konnte bewiesen werden, dass das Auftreten der chronischen lymphatischen Leukämie in einem Zusammenhang mit dem TNF- α -308 A-Allel zu sehen ist [63]. Weitere Studien zeigten auch, dass das A-Allel von IL-10 („low producer“) bei Patienten mit einem aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom signifikant häufiger auftritt als bei gesunden Kontrollgruppen [64]. In Anbetracht dieser gegensätzlichen Wirkungsweisen geht man davon aus, dass IL-10 die Wirkung von TNF- α inhibiert. Darüber hinaus haben Zytokine Einfluss auf das Ansprechen von Kortison. Patienten, mit hohen TNF- α -Raten wiesen eine Kortisonresistenz auf [65, 66], wohingegen hohe IL-10 Raten die Bindungskapazität und damit die Wirkungsweise von Kortison hoch regulieren.

Der homozygote Polymorphismus im Codon 25 des TGF- β 1 Gens (G-Allel, „high producer“) ist mit einer erhöhten TGF- β 1-Synthese und damit einer gesteigerten Fibroseentwicklung assoziiert. So konnten bei Patienten, die nach einer Knochenmarkstransplantation eine Leber- oder Lungenfibrose entwickelten, bereits vor der Operation erhöhte TGF- β 1-Werte festgestellt werden [67]. Zusätzlich wurde bestätigt, dass die meisten Patienten, die eine Lungentransplantation aufgrund einer Lungenfibrose erhielten, TGF- β 1 deutlich ausgeprägter produzierten als gesunde Patienten [68].

Ein anderer Polymorphismus im IL-6 Gen in der Promotorregion -174 führte bei Patienten mit juveniler chronischer Arthritis zu einem veränderten IL-6 Stoffwechsel. Bei Trägern des homozygoten C-Allels wurden signifikant erniedrigte IL-6-Plasmakonzentrationen gemessen. Da die Häufigkeit dieses Allels bei Erkrankten stark reduziert ist, geht man von einem protektiven Effekt bei der Präsenz des IL-6 C Allels aus [55].

Bei Patienten mit atopischen Krankheitsbeschwerden (Atopische Dermatitis, Asthma Bronchiale oder Allergische Rhinitis) und einem homozygoten A-Allel („low producer“) an Position +874 des Zytokin IFN- γ wurden signifikant niedriger IFN- γ Konzentrationen bei gleichzeitiger Eosinophilie und IgE-Erhöhung im Blut gemessen. Somit konnte demonstriert werden, dass die Zytokingenvarianten bei IFN- γ eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung atopischer Erkrankungen spielen [69].

1.2.4 Therapeutische Anwendung von Zytokinen

Unter Zuhilfenahme von gentechnisch veränderten Organismen wurden verschiedene Mediatoren entwickelt, die eine überschießende proinflammatorische Zytokinbildung limitieren, die Entzündungskaskade zu einem frühen Zeitpunkt durchbrechen und das Gewebe vor Entzündungsreaktionen schützen. Dafür stehen unter anderem die monoklonalen Antikörper gegen TNF- α Adalimumab und Infliximab sowie das rekombinierte TNF- α -Rezeptor-Fusionsprotein Etanercept zur Verfügung. Insbesondere bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis haben TNF- α blockierende Substanzen entscheidende Fortschritte bewirkt [70]. Weitere Medikamente zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis sind der Interleukin-1-Rezeptorantagonist Anakinra sowie der seit 2009 erhältliche IL-6 Inhibitor Tozilizumab [71]. Ein weiterer Ansatz zur Wiederherstellung des Zytokin-gleichgewichts ist die Anwendung von rekombinant hergestelltem IL-10.

Um eine langfristige Verbesserung der Tumorthapieergebnisse zu erzielen, sollte ein gezielter Eingriff in die Pathophysiologie der Tumorentstehung vorgenommen werden. Dies ist einerseits möglich mittels einer gezielten Intervention in den gestörten Regelkreis zellulärer Wachstumskontrollen sowie andererseits

durch die Einflussnahme auf Wechselwirkungen zwischen Tumorzelle und Wirtsorganismus. Eine Tumorthherapie kann durch die Wirkung von Zytokinen auf das Immunsystem auf verschiedenen Wegen ergänzt werden. Beispiele hierfür sind Interferone und Tumornekrosefaktoren. Diese können die Tumorzellproliferation und Differenzierung durch ihre zytostatische, zytotoxische und regulatorische Wirkung modulieren und beeinflussen [72, 73]. IL-2 kann durch die Stimulierung des Immunsystems und damit zur Potenzierung der immunologischen Abwehr gegen Tumorzellen einen entscheidenden Beitrag zur Tumorbekämpfung leisten [74]. Zusätzlich stimulieren hämatopoetische Wachstumsfaktoren die unspezifische Immunabwehr sowie die Proliferation hämatopoetischer Zellen und ermöglichen dadurch eine aggressivere Chemotherapie [75]. Weiterhin kann man fehlende oder verringerte Zytokine, wie zum Beispiel Erythropoetin, selektiv ersetzen. Hierbei wurde bewiesen, dass die Transfusionsbedürftigkeit, auch unter Chemotherapie, gesenkt werden kann [75]. Ebenso findet die therapeutische Blockade von Zytokinen (TNF- α , IL-6 und IFN- γ) bereits Anwendung bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses [76].

Darüber hinaus spielen zunehmend immunmodulatorische, beziehungsweise stimulatorische, Therapieansätze mit Interferonen im Bereich der viralen (Hepatitis C) und malignen Erkrankungen (malignes Melanom) eine zentrale Rolle. Durch den Einsatz von IFN- α bei Patienten mit chronischer Hepatitis C kam es zu signifikanten Verbesserungen der langfristigen Überlebensraten [77, 78]. Ebenso im Bereich der adjuvanten Therapie des malignen Melanoms erzielte der Einsatz von IFN- α erstmals eine Verbesserung der Überlebensrate [79]. Das antiinflammatorische IFN- β konnte zudem den Krankheitsverlauf bei Patienten mit Multipler Sklerose verlangsamen [80].

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

In den komplexen Wirkungsmechanismen des Immunsystems kommt Zytokinen als Immunmodulatoren eine entscheidende Rolle zu. Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass Zytokingenpolymorphismen Einfluss auf verschiedene Erkrankungen haben. Darauf aufbauend ist es das Ziel dieser Arbeit, genetisch determinierte Polymorphismen von den Zytokingenen TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-6 und IFN- γ unter Verwendung von sequenzspezifischen PCR mit der folgenden Fragestellung zu untersuchen:

Gibt es genetische Risikofaktoren, die Einfluss auf die Risikogruppe, die Art der Leukämie, die Genfrequenz, die Rezidivrate und das Gesamtüberleben einer akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter haben und sich zudem durch Einzelnukleotidpolymorphismen in pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auszeichnen?

Zytokine könnten als biologische Marker etabliert werden und so zur Erkennung immunologischer Risikofaktoren dienen. Folglich kann es zur Anwendung einer weniger toxischen immunmodulierenden bzw. -suppressiven Therapie (z. B. Zytokininfusionen, Leukämie-spezifische zytotoxische T-Zellen) führen. Dadurch wäre es einerseits möglich, Patienten individuell abgestimmt zu therapieren und andererseits die Prognose einzelner Patienten zu verbessern.

2 Material

2.1 Studiendesign

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie auf die Polymorphismen der TNF- α -, TGF- β 1-, IL-10-, IL-6- und IFN- γ -Gene. Für jeden Patienten wurden Stamm- sowie Verlaufsdaten aus Patientenakten und Arztbriefen erhoben:

Stammdaten:

- Geschlecht
- Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose
- Leukozytenzahl bei Erstdiagnose
- initiale Blastenzahl im peripheren Blut, im Knochenmark und im Liquor
- Immunphänotyp der ALL (B-/T-ALL)
- Zytogenetik (Chromosomentranslokationen, Hypo-/Hyperdiploidie etc.)
- Zeitpunkt der Probe (bei Erstdiagnose, nach Therapiebeginn, (in Remission), Rezidiv)
- Therapieprotokoll (AIEOP-BFM, ALL-BFM, INTERFANT, ALL-REZ, Rockstocker T-ALL-Rezidiv, EsPhALL)

Verlaufsdaten:

- Risikozweig (Standardrisiko-, mittlere Risiko-, Hochrisikogruppe)
- Relevante Daten zur SZT
- Verlaufskontrolle (VK) in Tagen seit Diagnose bis Remission/Rezidiv/Tod
- Behandlungsergebnis (Remission, Rezidiv, verstorben)

2.2 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit sind 95 pädiatrische Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie untersucht wurden, die im Zeitraum vom 21.06.2004 bis zum 30.04.2013 in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg in Behand-

lung waren. 35 Proben wurden bei Erstdiagnose und 93 zum Zeitpunkt der Remission untersucht.

Bei der Durchführung von Routineuntersuchungen im Zeitraum von Oktober 2012 bis April 2013 ist aus EDTA-Blutproben mittels GF-1 DNA-Kit der Firma Vivantis, Berlin, die DNA-Isolierungen erfolgt. Die asservierten Patientenproben aus dem Zeitraum von Juni 2004 bis Oktober 2012 wurden mittels Ficoll aufgearbeitet, um dann aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) DNA zu gewinnen. Die DNA-Extraktion erfolgt aus diesen PBMC, die bei -80 °C gelagert waren (Details siehe 3 Methoden).

2.3 Geräte

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

Vortexgerät	Vortex REAX control	Heidolph, Nürnberg
Waage	EMB 200-2	Kern, Ballingen
Zentrifugen	Galaxy Mini Mikro 22 R Rotiva 50 RS Mikro 200 R Rotanta 460 RS	VWR Hettich, Tuttlingen Hettich, Tuttlingen Hettich, Tuttlingen Hettich, Tuttlingen

Tabelle 04: Geräte, Bezeichnungen nach Herstellerangaben.

2.4 Laborbedarf

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

Tabelle 05: Laborzubehör, Bezeichnungen nach Herstellerangaben.

2.5 Chemikalien, Enzyme, Kits und Primer

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

Tabelle 06: Chemikalien und sonstige Reagenzien, Bezeichnungen nach Herstellerangaben

3 Methoden

3.1 DNA Extraktion

Die Isolierung von DNA erfolgt mit dem GF-1 Blut DNA Extraction Kit von Vivan-tis, Berlin. Nach venöser Blutentnahme werden 200 µl Vollblut nach Herstellerprotokoll mit 20 µl Proteinase K und 200 µl Buffer BB gevortext, lysiert und bei 65 °C für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss werden 20 µl RNase A hinzugefügt und es erfolgt eine weitere Inkubation für 5 Minuten bei 37 °C. Nach Addition von 200 µl Ethanol (96-100%) wird die Probe in eine spezielle Säule (GF-1, Gel filtration Column) überführt. Nachdem die DNA, die sich an der Membran der Säule festsetzt, mit zwei verschiedenen Waschpuffer zu je 500 µl aufgereinigt wird, folgt ein weiterer Zentrifugierschritt (zweimal 1 Minute 5000 x g bzw. einmal 3 Minuten 14000 x g). Abschließend wird die DNA durch einen Elutionspuffer (100 µl) nach einminütiger Inkubation wieder gelöst.

Bei den asservierten Proben von Juni 2004 bis Oktober 2012 wurden zunächst mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, Lymphozyten und Monozyten) mittels Ficoll isoliert. Hierbei werden 2 ml Blut mit 2 ml PBS verdünnt und langsam auf 4 ml Ficoll geschichtet. Diesem Schritt folgt eine zwanzigminütige Zentrifugierung (800 x g, 20 °C (3 _Π_ R3)), mit dem Ziel der Dichtenaufteilung. Die Zellfraktion aus der Interphase zwischen Serum und Ficoll wird mit einer Pipette abgesaugt und das Serum für eine spätere Bearbeitung in ein Extragefäß abgefüllt. Im Anschluss folgt ein zweimaliger Waschgang für 5 Minuten bei 300 x g, um Rückstände der zytotoxischen Trennlösung zu entfernen (9 _Π_ R9). Nach Bestimmung der Zellkonzentration unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer, werden die gewonnenen Zellpellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

Nach dem Auftauen werden die Zellen 1 Stunde bei 56 °C mit Proteinase K (100 µg/ml) lysiert. Das Verhältnis zwischen Proteinase K und T-Zellen entspricht 10 µl pro 10⁵ Zellen. Anschließend wird das Produkt für 15 Minuten bei

95 °C denaturiert. Die Quantifizierung der gewonnenen DNA wird mittels photometrischer Messung vorgenommen.

3.2 Photometrische Quantifizierung von DNA

Zur Quantifizierung der gewonnenen DNA wird die photometrische Messung genutzt. Hierzu werden 2 µl der DNA-haltigen Lösung auf 98 µl aqua ad inject gegeben und die Konzentration der DNA bei 260 nm/280 nm im UV Spektroskop bestimmt. Eine optimale Konzentration liegt bei 25-200 ng/µl vor.

In DNA-Lösungen stellen Proteine eine häufige Verunreinigung dar. Durch die Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm wird die Reinheit der Nucleinsäuren abgeschätzt. Liegt der Quotient über 1,8 ist die DNA rein und wird nicht von Proteinen kontaminiert.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR (engl. Polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte und wurde 1983 von dem US-amerikanischen Biochemiker Kary Banks Mullis entwickelt [81]. Sie dient zur in vitro Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen. Ähnlich der körpereigenen DNA-Replikation synthetisiert eine DNA-Polymerase den komplementären Strang zum gewünschten Abschnitt der DNA. Durch mehrmalige Wiederholung der einzelnen Schritte werden Kopien von Kopien erstellt.

Als Primer dienen die sequenzspezifischen DNA-Oligonukleotide des Genotypisierungskits (Cytokine Genotyping Primers Kit, One-Lambda, Los Angeles) für TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ , IL-6 und IL-10. Zur internen Kontrolle beinhaltet das Testsystem zusätzlich ein Primerpaar für das humane β -Globulin-Gen.

Die Amplifikation erfolgt durch die hitzestabile DNA-Polymerase (Taq Polymerase). Die Taq Polymerase ist ein Enzym, welches aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) gewonnen wird und die Synthese von DNA-

Polynukleotiden katalysiert, bei der Nukleosidphosphate an einen DNA-Strang angehängt werden [82].

Die PCR läuft in drei Teilschritten ab: Denaturierung, Primerhybridisierung oder -annealing und Extension:

Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA auf 96 °C erhitzt, um die bestehenden Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen, wodurch sich die Primer spezifisch an die DNA anlagern können. Dabei werden die Produkte etwas länger erhitzt (Initialisierung), um sicherzustellen, dass sowohl die Primer als auch die Ausgangs-DNA vollkommen voneinander getrennt sind.

Im Rahmen der Primerhybridisierung beziehungsweise des Primerannealings werden die DNA-Einzelstränge auf 63 °C abgekühlt. Unter diesen Bedingungen können sich die Primer an der DNA anlagern. Meist binden die Primer schneller als der komplementäre DNA-Strang, da sie nicht nur im Überschuss vorliegen, sondern auch wendiger und kleiner sind. Dabei spielt die Temperatur eine entscheidende Rolle. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, kommt es zu thermischen Bewegungen der Primer, die eine optimale Anlagerung an das Template unmöglich machen. Bei zu niedrigen Temperaturen können sich die Primer an nicht-komplementäre Sequenzen anlagern und zu unspezifischen Produkten, sogenannten „Geisterbanden“, führen. Um diese Effekte bestmöglich auszuschließen, liegt die Temperatur üblicherweise 5 °C bis 10 °C unter der Schmelztemperatur der Primersequenz.

Bei der abschließenden Extension, Elongation oder Amplifikation synthetisiert die DNA-Polymerase aus den angelagerten Primern die komplementären Stränge zur DNA in Richtung 5'-Ende. Somit ist der gewünschte DNA-Abschnitt dupliziert und ein neuer Zyklus kann beginnen. Dabei wird der Primer nicht wieder abgelöst, denn er bildet den Anfang eines neuen Einzelstrangs.

Für einen PCR-Lauf im Rahmen dieser Arbeit wird ein „Master“- beziehungsweise D-Mix von 140 µl mit 1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) angesetzt.

PCR Ansatz:

- 140 µl dNTP-Buffer mix (D-Mix)
- 19 µl extrahierte DNA
- 1 µl Taq-Polymerase
- 1 µl destilliertes Wasser
- vorpipettierte Primerplatten zu 2 µl von TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ , IL-6 und IL-10

Für die Negativkontrolle werden 7 µl aus dem D-Mix und 1 µl destilliertes Wasser verwendet. Der restliche „Master“-Mix wird mit 19 µl extrahierter DNA gemischt und zu je 8 µl in die mit bereits zu je 2 µl vorpipettierte Primerplatte verteilt. Ein Ansatz besteht aus 16 Tubes, die mit unterschiedlichen Primern in folgender Reihenfolge angesetzt werden:

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

Tabelle 07: Pipettierschema der Primer.

Anschließend erfolgt die Amplifikation im Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil:

PCR-Zyklus Parameter:

1.) Denaturierung (1 Zyklus):

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

2.) Annealing (9 Zyklen):

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

3.) Polymerisation (20 Zyklen):

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

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

Einstellungen:

- Temp Mode: Standard
- Deckeltemperatur 105 °C

Die Proben werden anschließend mit Hilfe eines Agarosegels analysiert.

3.4 Primersequenzen

Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 08 zusammengefasst:

Zytokin	Primer	Primersequenz
TNF- α	-308G	5'-GAGGGGCATGQGGACGG-3'
	-308A	5'-CCCGTC~CATGCCCTC-3'
TGF- β 1	Codon 10C	5'-GCTGCTGCCGCTGCTGC-3'
	Codon 10T	5'-GCTGCTGTGCTGCTGCT-3'
	Codon 25G	5'-GCCTGGCCGGCCGGCCG-3'
	Codon 25C	5'-GCCTGGCCCGCCGGCCG-3'

IL-10	-1082G	5'-TTCTTTGGGAGGGGGAAG-3'
	-1082A	5'-ACTTCCCCTTCCCAAAGAA-3'
	-819C	5'-CAGGTGATGTAACATCTCTGTGC-3'
	-819T	5'-GCACAGAGATATTACATCACCTGT-3'
	-592C	5'-CCGCCTGTCCTGTAGGAA-3'
	-592A	5'-TTCCTACAGTACAGGCGGG-3'
IL-6	-174C	5'-GAGCTTCTCTTTCGTTCC-3'
	-174G	5'-CCCTAGTTGTGTCTTGCC-3'
IFN- γ	+874T	5'-GCTGTCATAATAATATTCAGAC-3'
	+874A	5'-CGAGCTTTAAAAGATAGTTCC-3'

Tabelle 08: Primersequenzen, entnommen aus [83].

3.5 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR Produkte wird mithilfe einer Gelelektrophorese [84] durchgeführt. Das Prinzip einer Gelelektrophorese besteht darin, dass eine elektrische Kraft auf ein Ion wirkt. Dabei wirken sich Ionengröße und Viskosität der Lösung umgekehrt proportional auf die Wanderungsgeschwindigkeit aus, während Ionenladung und Feldstärke die Wanderung der kolloidalen Teilchen beschleunigen.

Für die Herstellung eines 1,5%-igen Agarose Gels benötigt man 4,5 g Agarose sowie 300 ml vorverdünnten 10%igen Tris-Acetate-EDTA-Puffer (TAE). Das Agarose-TAE-Gemisch wird gelöst und für circa 10 Minuten aufgekocht, bis sich eine klare Lösung bildet. Im Anschluss wird dem Agarose-TAE-Gemisch 6 μ l Syto 60 als Farbstoff hinzugegeben und in eine horizontale Gelkammer gegossen. In diesen Gelschlitten werden 4 Kämme zu je 34 Taschen à 0,2 cm mit einem Fassungsvermögen von 10 μ l gesteckt. Nach Aushärtung des Gels bei Raumtemperatur werden die Kämme entfernt und das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt. Hinterher werden die PCR-Produkte mit 2 μ l Loading Puffer (Gel Loading Dye Orange) gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Zur Größenbestimmung der einzelnen Banden wird

eine benachbarte Geltasche mit 10 µl einer DNA-Leiter (100 bp DNA Ladder) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgt unter Gleichspannung bei 150 V, 500 mA und 150 W. Dabei bewegen sich kleinere Fragmente schneller durch das Gel als größere, was zu einer Auftrennung der DNA-Produkte führt.

Nach etwa 60 Minuten wird das Gel auf den Licor Odysee Scanner (Licor, Lincoln USA) gelegt und unter folgenden Einstellungen gescannt: DNA Gel, Resolution: 169 µm, Quality: lowest, Focus Offset 2,0 mm, Intensity 700 bei 2.0. Die Bilder werden computergestützt mittels Odyssey Software (Licor, Lincoln USA) ausgewertet und archiviert.

Im Anschluss daran können die Allele durch das spezifische Bandenmuster der Proben direkt zugeordnet werden. Die obere Bande stellt die interne Kontrolle des β-Globulin Gens dar. Die Primerfront befindet sich am weitesten entfernt von den Geltaschen und dient gemeinsam mit der internen Kontrolle als Größenmarker. Alle Banden zwischen interner Kontrolle und Primerfront stellen die spezifischen Zytokin-Polymorphismen der relevanten Banden dar (Abbildung 03).

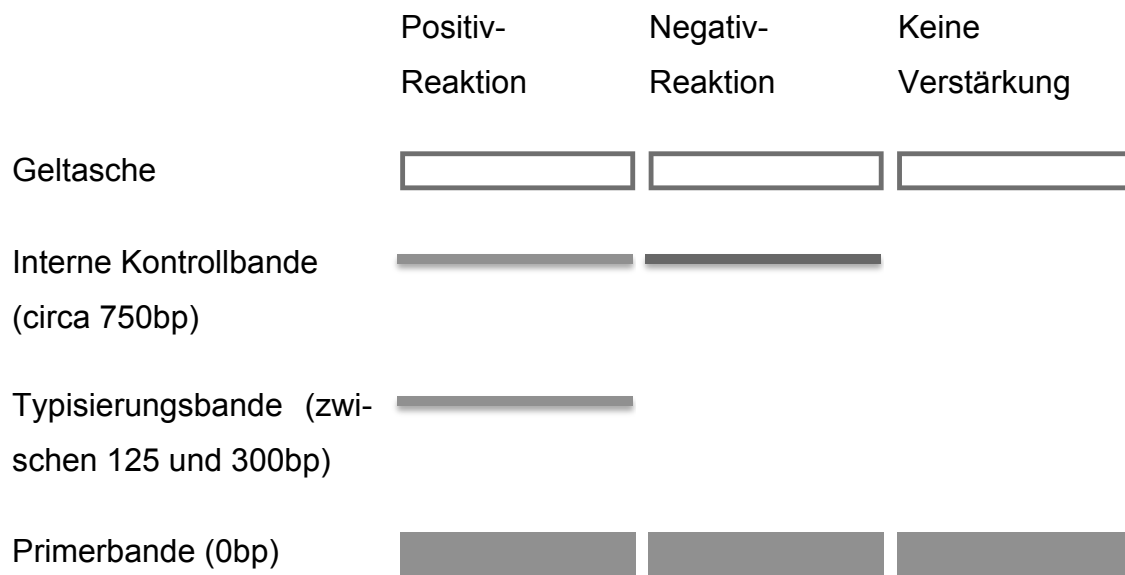


Abbildung 03: Darstellung eines schematischen Bandenmusters zur Gelauswertung.

In Gegenwart einer spezifischen Verstärkung eines Zytokin-Allels (positive Typosierungsbande) kann das Produkt der internen Kontrollbande schwach ausgeprägt sein oder ganz fehlen, was auf Unterschiede von Konzentration und Schmelztemperatur bei den spezifischen Primerpaaren und dem internen Kontroll-Primerpaar zurückzuführen ist.

3.6 Statistische Analysen

In Zusammenarbeit mit Dr. Imme Haubitz (Bioinformatikerin am Institut für Klinische Epidemiologie und Biometrie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg) wurde die statistische Auswertung durchgeführt.

Für die Korrelation zwischen Geschlecht, Alter, initialen Leukozytenzahlen, Art der ALL, Risikogruppe und ZNS-Beteiligung wird der U-Test nach Mann und Whitney angewendet. Die Zusammenhänge zwischen Geschlecht, Risikogruppe, ZNS-Status und der Art der ALL werden mittels Chi-Quadrat Test oder dem exakten Test nach Fisher und Yates untersucht. Der exakte Test nach Mehta und Patel wird herangezogen, wenn die Voraussetzungen für den Chi-Quadrat Test nicht erfüllt werden.

Darüber hinaus werden die Polymorphismen mit dem Geschlecht, dem ALL-Subtyp, der Risikogruppe, der ZNS-Beteiligung und der Stammzelltransplantation entweder mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests, dem Fisher Test oder dem exakten Test nach Mehta und Patel korreliert. Zusätzlich werden die Polymorphismen mit dem Alter, den Leukozyten- und den Leukoblastenzahlen aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis beziehungsweise mit der Kendallschen Rangkorrelation untersucht.

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

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse beziehen sich auf 95 pädiatrische Patienten, die im Zeitraum vom 21.06.2004 bis zum 30.04.2013 an einer ALL an der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg behandelt wurden. Tabelle 09 und Tabelle 10 fassen die wesentlichen klinischen Daten zusammen.

	Gesamt	B-Zell- Leukämie	T-Zell- Leukämie	Signifi- kanz
Patientenanzahl	95 (100%)	83 (87%)	12 (13%)	
Medianes Alter (y)	6,8 + 5,1	6,4 + 4,7	9,8 + 6,5	n. s.
Geschlecht	M: 54 (57%) W: 41 (43%)	M: 46 (55%) W: 37 (45%)	M: 8 (67%) W: 4 (33%)	n. s.
Risikozweig Anzahl SR/MR/HR (%)	52/23/20 55/24/21	49/22/12 59/27/14	3/1/8 25/8/67	P<0,001
ZNS Status positiv	5 (5%)	2 (2%)	3 (25%)	P<0,05
SZT	20 (21%)	13 (16%)	7 (58%)	P<0,01
Rezidiv	11 (100%)	10 (91%)	1 (9%)	n. s.
Leukozyten (/ µl)	48.750 + 122.493	32.595 + 90.000	153.760 + 224.000	P<0,005
Leukoblasten (%)	35 ± 32	33 ± 32	49 ± 31	n. s.
Translokationen	23 (24%)	21 (91%)	2 (9%)	n. s.
Gesamtüberleben nach 1/2/5 Jahren	99/99/93%	98,7/98,7/ 94%	100/100/ 83,3%	P=0,6
Rezidivfreies Überleben nach 1/2/5 Jahren	99/96/85%	99/97/85%	100/91/ 91%	n. s.

Tabelle 09: Patientencharakteristika I, Vergleich von B- und T-Zell Leukämie.

	Gesamt	SR / MR (nicht HR)	HR	Signifi- kanz
Patientenanzahl	95 (100%)	75 (79%)	20 (21%)	
Medianes Alter (y)	6,8 ± 5,1	6,1 ± 4,7	9,5 ± 6,0	P<0,5
Geschlecht	M: 54 (56%) W: 41 (44%)	M: 38 (51%) W: 37 (49%)	M: 16 (80%) W: 4 (20%)	P=0,05
ZNS Status positiv	5 (5%)	2 (3%)	3 (15%)	P<0,05
SZT	20 (21%)	6 (8%)	14 (70%)	P<0,001
Rezidiv	11 (12%)	8 (11%)	3 (15%)	n. s.
Leukozyten (/ µl)	48.750 ± 122.493	32.784 ± 90	117.321 ± 202	P<0,005
Leukoblasten (%)	35 ± 32	31 ± 30	53 ± 36	P<0,05
Translokationen	23 (24%)	18 (24%)	4 (25%)	n. s.
Gesamtüberleben nach 1/2/5 Jahren	99/99/93%	100/100/97%	94/94/71%	P=0,015
Rezidivfreies Überleben nach 1/2/5 Jahren	99/96/85%	99/97/87%	100/93/70%	n. s.

Tabelle 10: Patientencharakteristika II, Vergleich von Nicht-Hochrisikogruppe (SR/MR) mit Hochrisikogruppe (HR).

Ein vollständiger Überblick über alle Studienteilnehmer liegt der Arbeit im Anhang bei (vgl. Tabelle 19).

4.2 Klinischer Befund und Blutbild

4.2.1 Vergleich der Risikogruppe mit dem Geschlecht, der Leukämieart und bei Stammzelltransplantation

Das Patientenkollektiv umfasst 54 männliche und 41 weibliche Patienten im Alter von 66 Tagen bis 22 Jahren bei einem medianen Erstdiagnosealter von 4,7 Jahren (68%-KI von 2,2 bis 13,1 Jahren). Tabelle 11 verdeutlicht, dass männliche Patienten (30%) signifikant häufiger dem Hochrisikozweig zugeordnet wurden als weibliche Patienten (9,7%).

		Männlich		Weiblich		p-Wert
		Anzahl	%	Anzahl	%	
Risiko	SR/MR	38	70	37	90,3	0,019
	HR	16	30	4	9,7	

Tabelle 11: Vergleich der Risikogruppe nach dem Geschlecht.

Von den 95 diagnostizierten ALL wurden 83 den B-Zell-Leukämien (87%) und zwölf den T-Zell-Leukämien (13%) zugeordnet. Abbildung 04 verdeutlicht, dass Patienten mit einer B-ALL häufiger im SR- oder MR-Zweig (85,5%) therapiert wurden als im HR-Zweig (14,5%). Im Gegensatz dazu wurden 8 der 12 T-Zell-Leukämien (66,6%) im HR-Zweig behandelt. Die T-ALL-Linien stellen somit einen prognostisch ungünstigen Risikofaktor dar ($p < 0,001$).

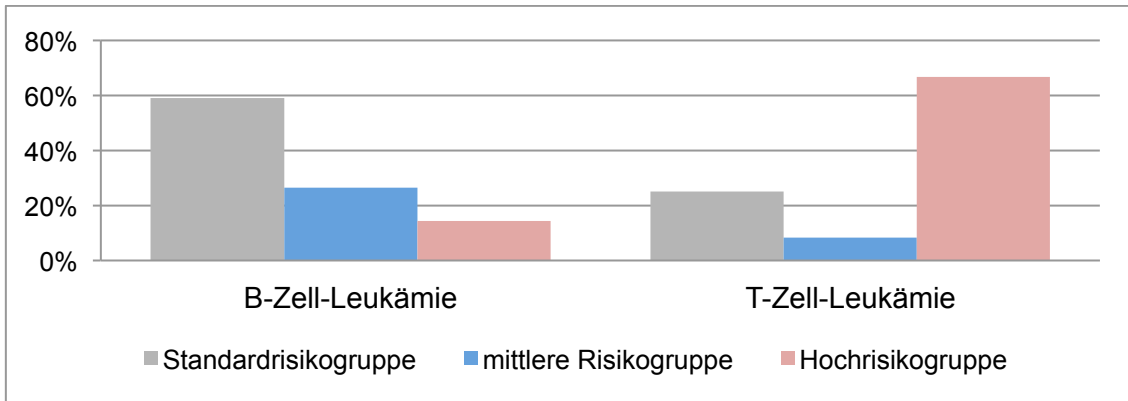


Abbildung 04: Vergleich der B-Zell- und T-Zell-Leukämie in der Standard-, mittleren- und Hochrisikogruppe.

Alle Patienten, die aufgrund einer HR-Konstellation stammzelltransplantiert wurden, überlebten – bis auf einen Patienten (Patientennummer: 7 in Tabelle 19), der aufgrund einer transplantations-assoziierten Komplikation (TRM) verstarb. In Übereinstimmung mit den Studienleitlinien wurden signifikant mehr Kinder aus der Hochrisikogruppe (14 Kinder) transplantiert als aus der Standard- oder der mittleren Risikogruppe (6 Kinder, $p < 0,0001$, Vergleich Abbildung 05 sowie Tabelle 10). Patienten aus der Standard- oder mittleren Risikogruppe wurden nur im Falle eines Rezidivs oder bei schlechtem Ansprechen auf die Chemotherapie (Non-/Late-Responder) transplantiert (Patientennummer: 26, 53, 54, 55, 66, 73 in Tabelle 19).

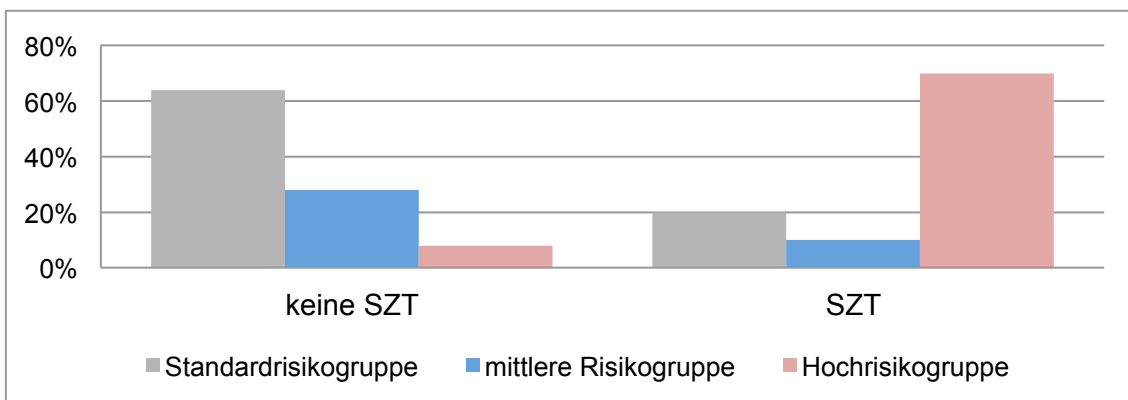


Abbildung 05: Vergleich der Indikationsstellung zur SZT bei Standard-, mittleren- und Hochrisikozweig.

4.2.2 Vergleich der Leukämieart mit der ZNS-Beteiligung

Der Befall des ZNS ist ein weiterer prognostisch ungünstiger Faktor und tritt vermehrt bei T-Zell-Leukämien auf (Abbildung 06). Nur 2 von 83 Patienten (2,4%) mit einer B-Zell-Leukämie waren ZNS positiv. Im Vergleich dazu hatten 3 der 12 T-ALL-Patienten (25%) einen positiven ZNS-Befall.

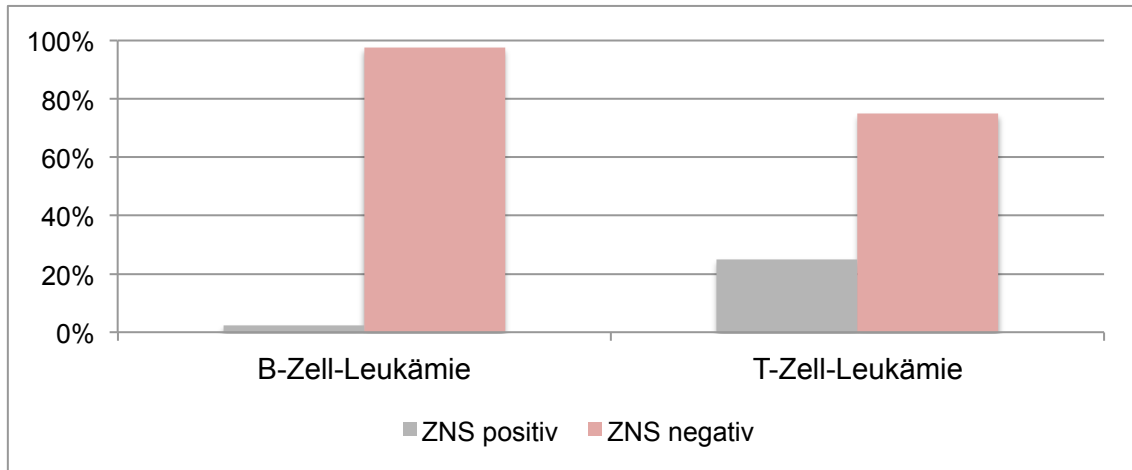


Abbildung 06: Vergleich der Leukämieart mit dem Befall des ZNS.

4.2.3 Vergleich der Rezidivfreiheitsrate mit dem Alter und der SZT-Indikation

11 Patienten erkrankten an einem Rezidiv, wovon sich am 30. April 2014 2 Kinder in Remission befanden und 9 Kinder stammzelltransplantiert wurden. Im Anschluss an die SZT sind dennoch 6 Patienten an einem Rezidiv verstorben. Dabei wird deutlich, dass ältere Patienten (>11 Jahre) eine signifikant höhere Rezidivrate haben als jüngere Patienten ($p < 0,0001$, Abbildung 07).

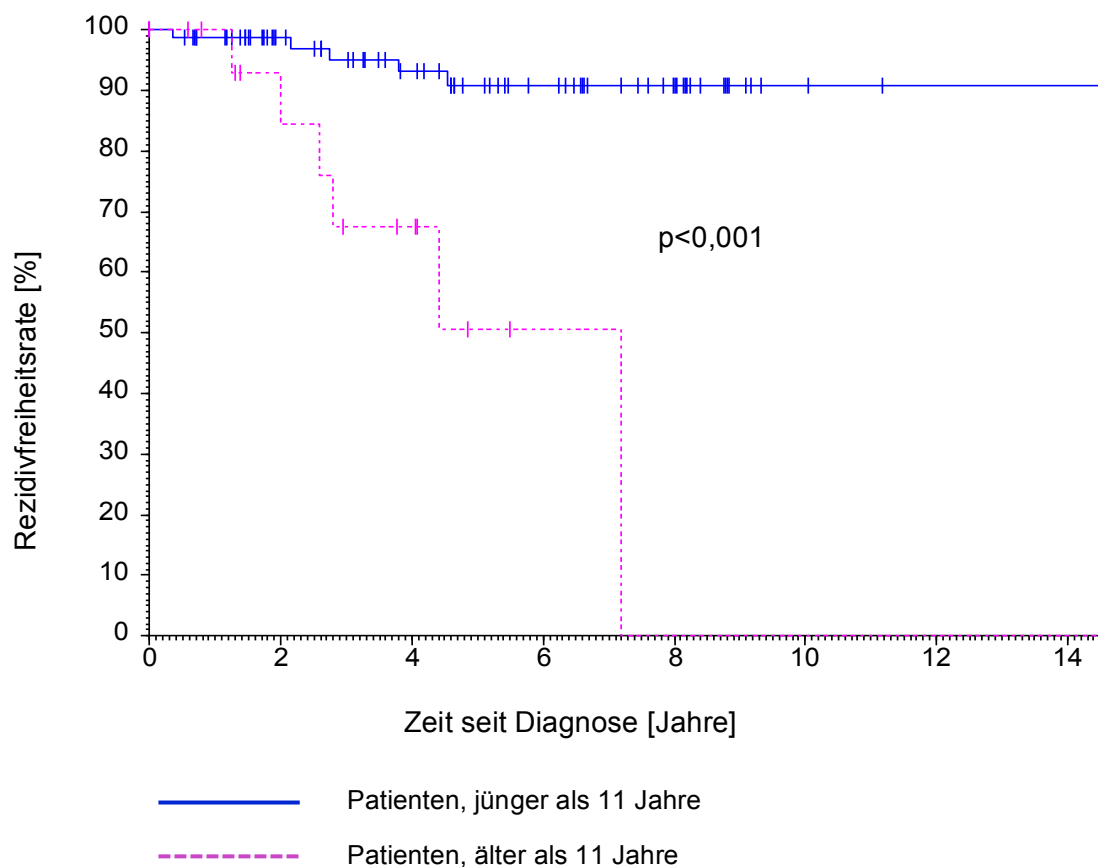


Abbildung 07: Rezidivfreiheitsrate nach Alter der Patienten. Die senkrechten Striche markieren Patienten, die ohne Rezidiv aus der Studie ausgeschieden sind.

Im Rahmen dieser Studie wurden 20 Patienten stammzelltransplantiert. 5 Kinder verstarben, die aufgrund eines Rezidivs eine SZT erhalten hatten. Dabei zeigt sich, dass Patienten mit einer SZT ein signifikant höheres Risiko haben, an einem Rezidiv zu erkranken ($p < 0,0001$) als Patienten ohne SZT (Abbildung 08).

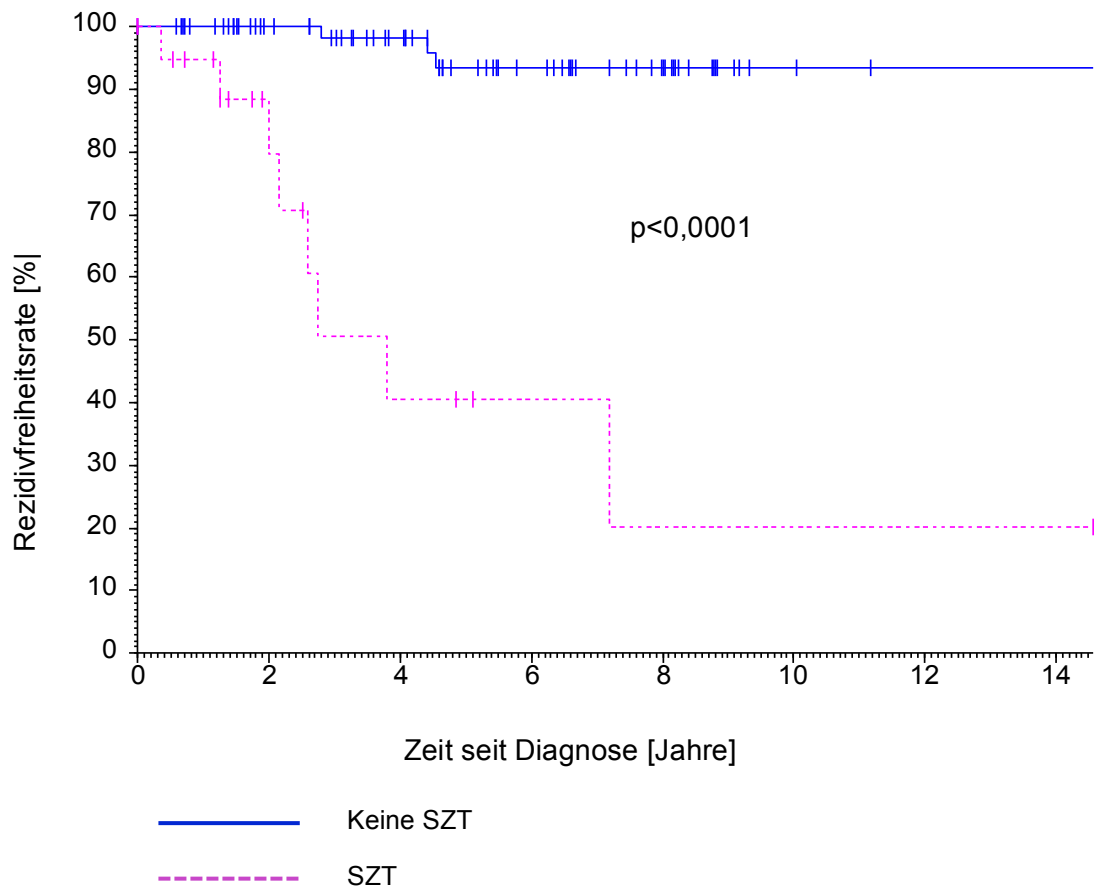


Abbildung 08: Rezidivfreiheitsrate nach Indikation zur SZT.

4.2.4 Klinischer Befund, Translokationen und Leukozytenzahlen

Die Leukozytenzahlen lagen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zwischen 660 – 818.000/ μl (Median von 11.702/ μl). Der initiale Blastenanteil im peripheren Blut lag zwischen 0% und 92% (Median 32%), im Knochenmark bei weniger als 5% und über 90% sowie im Liquor zwischen 0% und 6%. Patienten mit einer T-ALL ($p=0,0021$), einem Hochrisikozweig ($p=0,0028$), einer ZNS-Beteiligung ($p=0,0096$) sowie einer Indikation zur SZT ($p=0,016$) zeigten signifikant erhöhte Leukozytenzahlen zum Zeitpunkt der Diagnose, siehe Abbildung 09.

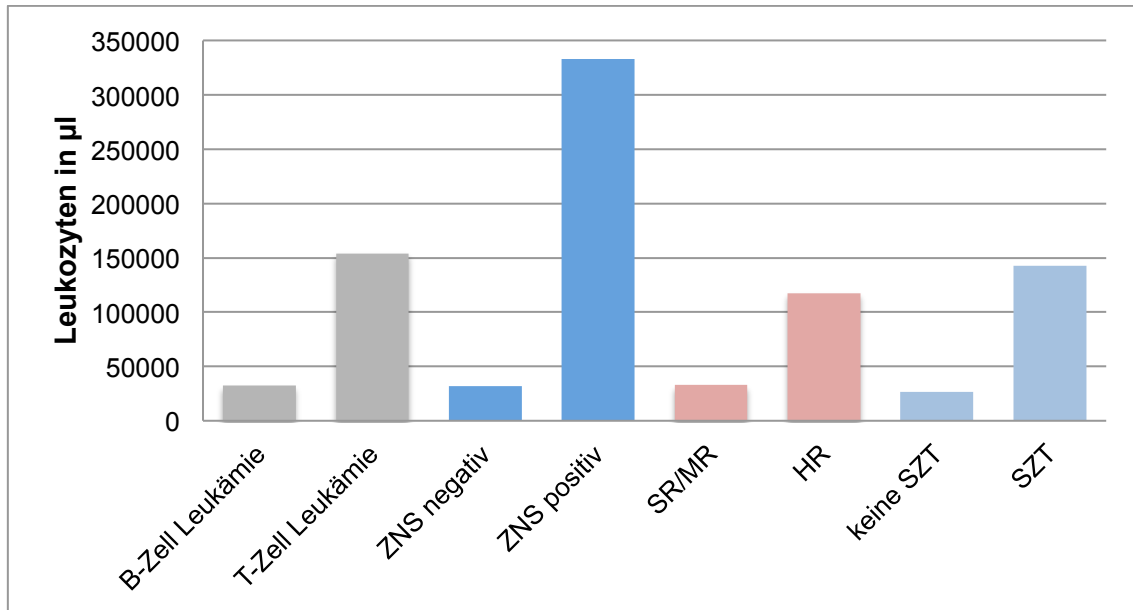


Abbildung 09: Leukozytenzahlen bei Diagnose im Vergleich zu verschiedenen Leukämieformen, ZNS-Beteiligung, Risikozweig und SZT Indikation.

Bei der Untersuchung der Translokationen konnten keine Zusammenhänge zwischen Blutbild und Translokationen festgestellt werden.

4.3 Zytokine

4.3.1 Zytokingenfrequenzverteilung

Um die Zytokingenpolymorphismen der Leukämiepatienten sinnvoll auswerten zu können, wurden die verschiedenen Genfrequenzen der ALL-Patienten mit einer publizierten Kontrollgruppe verglichen und in Tabelle 12 zusammengefasst [85-87]. Zusätzlich wurden 2 ALL-Patienten ausgeschlossen, bei denen lediglich Zytokingenpolymorphismen bei Erstdiagnose und nicht in Remission erhoben wurden, da eine exakte Differenzierung zwischen Leukozyten und Leukoblasten nicht möglich war.

	Genotyp	Anzahl Kontroll- troll- gruppe	%	Anzahl ALL- Patienten	%	p-Wert
TNF- α	G/G (niedrig)	65	61	53	57	n. s.
	G/A (hoch)	24	23	26	28	
	A/A (hoch)	17	16	14	15	
TGF- β 1 Codon 10	T/T (hoch)	44	41	31	33	n. s.
	T/C (mittel)	51	48	44	47	
	C/C (niedrig)	12	11	18	19	
TGF- β 1 Codon 25	G/G (hoch)	87	81	73	78	n. s.
	G/C (mittel)	19	18	16	17	
	C/C (niedrig)	1	1	4	4	
IL-10	ACC/ACC (niedrig)	26	8	1	1	0,002
	ACC/ATA (niedrig)	40	12	14	15	
	ATA/ATA (niedrig)	25	8	6	6	
	GCC/ACC (mittel)	69	21	37	40	
	GCC/ATA (mittel)	69	21	14	15	
	GCC/GCC (hoch)	99	30	21	23	
IL-6	G/G (hoch)	152	51	20	22	<0,001
	G/C (hoch)	106	35	5	5	
	C/C (niedrig)	42	14	68	73	
IFN- γ	T/T (hoch)	72	24	23	25	n. s.
	T/A (mittel)	174	58	46	49	
	A/A (niedrig)	54	18	24	26	

Tabelle 12: Genfrequenzen der Zytokingenpolymorphismen in der Gruppe der ALL-Patienten (n=93) im Vergleich zu einer publizierten Kontrollkohorte [85-87].

4.3.2 Auswertung der Ergebnisse

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

Anhand der Bandenkonstellation von TNF- α kann auf den Genotyp und seine Expressionsraten geschlossen werden. Abbildung 10 stellt schematisch die Auswertungsmaske für den SNP von TNF- α dar. Sobald eine Bande zwischen der internen Kontrolle und der Primerfront erscheint, geht man von einem positiven Typisierungsband aus:

























	TNF- α Promo- tor - 308A (125 bp)	TNF- α Promo- tor - 308G (125 bp)	TNF- α Promo- tor - 308A (125 bp)	TNF- α Promo- tor - 308G (125 bp)	TNF- α Promo- tor - 308A (125 bp)	TNF- α Promo- tor - 308G (125 bp)
Gel- tasche						
Interne Kontroll- bande						
Typisie- rungs- bande	 Negativ	 Positiv	 Positiv	 Positiv	 Positiv	 Negativ
Primer- bande						
Genotyp	G/G (niedrig)		G/A (hoch)		A/A (hoch)	

Abbildung 10: Schematische Bandenkonstellation der TNF- α Polymorphismen.

Das Ergebnis des Patienten in Abbildung 11 zeigt aufgrund einer Bande an Position -308G bei 125bp einen homozygoten G/G Genotyp, welcher mit einer niedrigen Expressionsrate assoziiert ist.

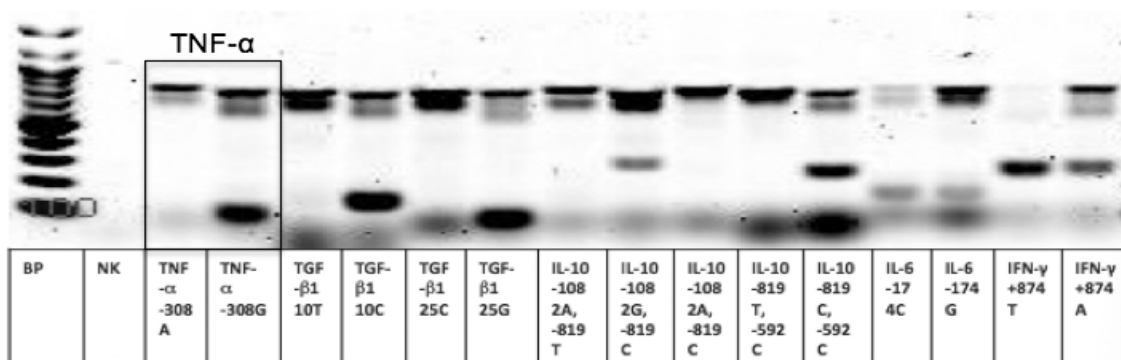


Abbildung 11: Ergebnis eines Patienten mit G/G Polymorphismus im TNF-α Gen.

Die Untersuchungen aller Patientenproben zu den TNF-α-SNP zeigen, dass 57% der Patienten einen G/G-, 28% Patienten einen G/A- und 15% der Patienten A/A-SNP aufweisen. Dagegen haben 61% aus der Kontrollgruppe einen G/G Haplotypen, 23% einen heterozygoten G/A-Genotyp und 17% weisen einen A/A-SNP auf (siehe Tabelle 12). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen der Kontrollgruppe und der ALL-Patienten gibt.

4.3.2.2 Auswertung von TGF-β1-SNP

Analog zur Analyse von TNF-α wurde das Zytokin TGF-β1 untersucht, welches in Abbildung 12 markiert ist. Das Agarosegel zeigt eine Bande an dem TGF-β1 Codon 10C bei 175bp und eine weitere Bande bei TGF-β1 an Codon 25G bei 125bp. Diese Bandenkonstellation führt zu einem homozygoten SNP an Codon 10 und 25 und resultiert in einem C/C G/G Genotypen, welcher eine mittlere Zytokinexpression induziert.

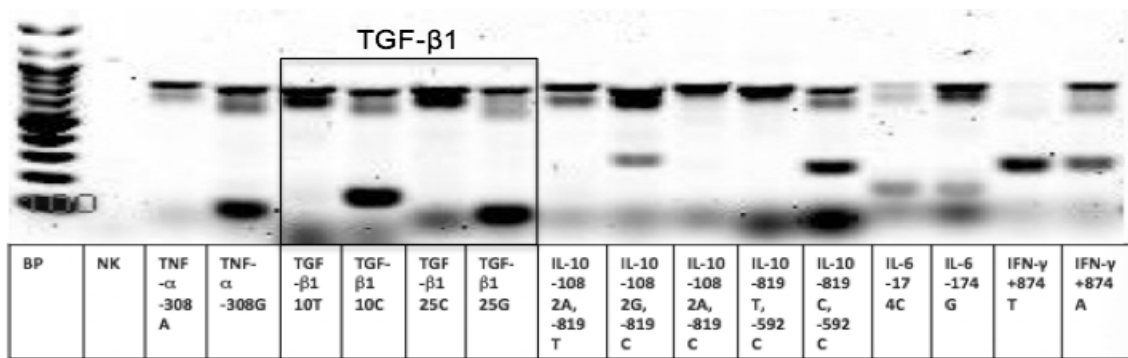


Abbildung 12: Ergebnis eines Patienten mit C/C SNP an Codon 10 und einem G/G SNP an Codon 25 im TGF-β1-Gen.

Unter allen ALL-Patienten sind der T/C G/G-Genotyp mit 38% und der T/T G/G-Genotyp mit 29% am häufigsten vertreten. Beide Genotypen exprimieren TGF-β1 in einem hohem Maße. Ein ähnliches Bild stellt sich in der Kontrollgruppe dar, wo 48% der Patienten den T/C-SNP an Codon 10 und 81% den G/G-SNP an Codon 25 nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 12). Diese Untersuchungen zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Patientenkohorte gibt.

4.3.2.3 Auswertung von IL-10-SNP

Bei der Betrachtung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 kann unter allen ALL-Patienten der GCC/ACC Genotyp mit 40% am häufigsten nachgewiesen werden. Gemeinsam mit GCC/ATA führen beide Haplotypen zu einer mittleren Zytokinexpression und wurde signifikant häufiger bei Patienten mit ALL exprimiert (55% bei ALL-Patienten, 42% in der Kontrollgruppe). Im Gegensatz dazu findet man bei 30% der Kontrollen den Genotyp GCC/GCC deutlich häufiger als bei ALL-Patienten (23%, $p=0,002$), welcher mit einer hohen Zytokinproduktion assoziiert ist (siehe Tabelle 12).

Gemäß der Analyse zu TNF-α und TGF-β1, findet man bei der Auswertung zu IL-10 in Abbildung 13 einen GCC/GCC Genotypen, welcher durch zwei Bande an den Promotorregionen -1082G, -819C bei 300bp sowie -819C, -592C bei 250bp charakterisiert ist.

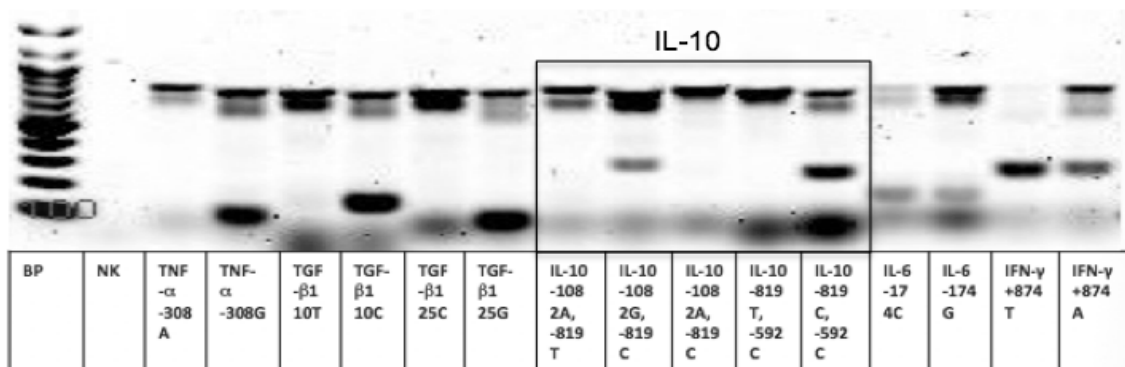


Abbildung 13: Ergebnis eines Patienten mit GCC/GCC Genotypen des Zytokins IL-10 an den Promotorregionen von -1082, -819 und -592.

4.3.2.4 Auswertung von IL-6-SNP

Die Betrachtung des IL-6-SNP ergibt bei dem Patienten in Abbildung 14 einen heterozygoten G/C Genotypen, der unter den ALL-Patienten am seltensten vertreten war. Durch die Banden in den Promotorregion -174C und -174G bei 175bp kann der G/C Genotyp detektiert werden. Dieser führt zu einer hohen IL-6 Expression. Am häufigsten und mit 73% aller Patienten wird der homozygoten C/C Genotyp unter den ALL-Patienten nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist in der Kontrollgruppe der homozygote G/G SNP (51%) häufiger vertreten als der G/C (35%) und der C/C (14%) Genotyp ($p < 0,0001$), (siehe Tabelle 12).

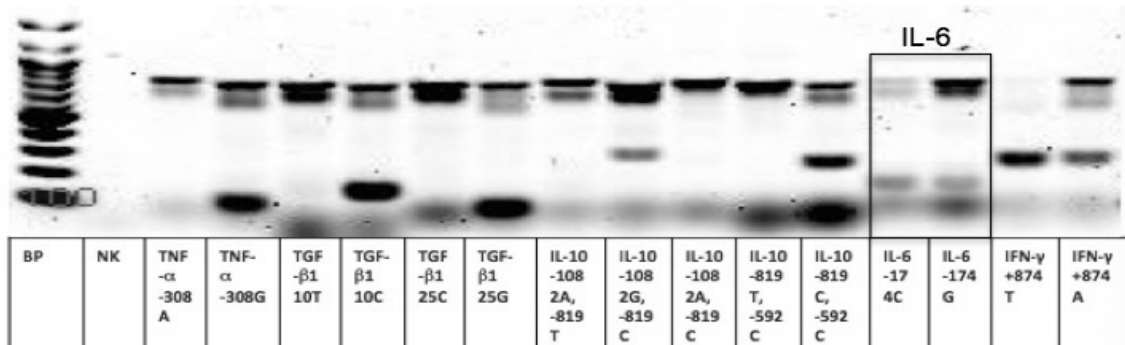


Abbildung 14: Patient mit einem G/C Genotyp des IL-6 an der Promotorregion -174.

4.3.2.5 Auswertung von IFN- γ -SNP

Die Markierung in Abbildung 15 zeigt das Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ welches durch Banden an Position +874 bei 250bp charakterisiert ist. Hier wird an der ersten Position des IFN- γ (IFN- γ +874T) deutlich, dass in Gegenwart eines Zytokin-Allels das Produkt der internen Kontrolle ganz fehlen oder schwächer ausgeprägt sein kann. Aus dieser Bandenkonstellation resultiert ein heterozygoter Genotypen (T/A) mit einer mittleren Expressionsrate. Unter allen ALL-Patienten weisen 49% einen T/A Genotyp, 26% einen A/A und 25% einen T/T Genotyp auf. In den Kontrollen wird vermehrt das heterozygote T/A (58%) nachgewiesen, gefolgt von dem homozygoten T/T (24%) und dem selteneren A/A-Allel (18%), (siehe Tabelle 12). Dennoch konnte keine Signifikanz zwischen Patienten und Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

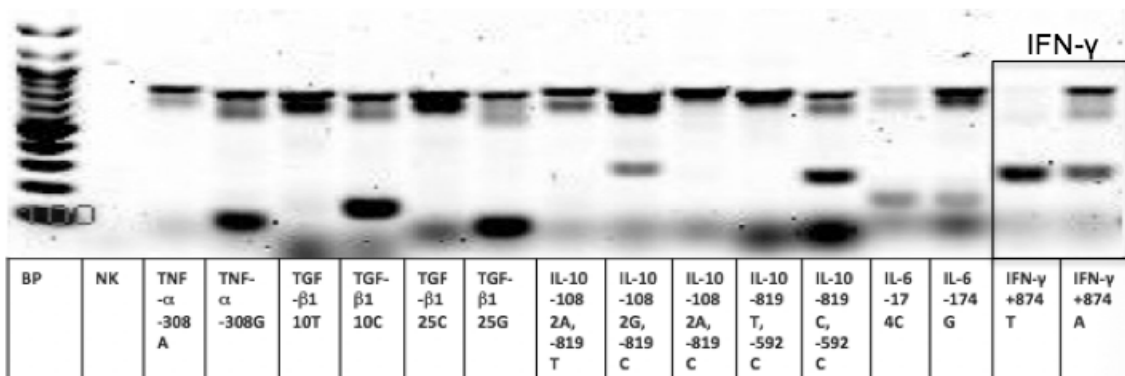


Abbildung 15: Patient mit einem T/A Genotyp des IFN- γ am Intron 1 +874.

4.4 Einfluss der Zytokingenpolymorphismen auf die Risikogruppe und die initialen Leukozytenzahlen

4.4.1 TNF- α

Für TNF- α kann kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Risikogruppe oder der initialen Leukozytenzahl und dem TNF- α -Polymorphismus nachgewiesen werden.

4.4.2 TGF- β 1

Vergleicht man die verschiedenen Risikogruppen (HR und Nicht-HR) mit den Genotypen von TGF- β 1, stellt man fest, dass Patienten in der Hochrisikogruppe häufiger einen T/T Genotyp auf Codon 10 von TGF- β 1 (58%) besitzen als Patienten in der Standard- oder mittleren Risikogruppe (28%) (Tabelle 13, $p < 0,01$). Keiner der 19 Hochrisikopatienten ist homozygot für C/C, wohin gegen 24% der Nicht-Hochrisikogruppe C/C exprimieren.

		Gesamt (n=94)	SR/MR		HR		p-Wert
			Anzahl	%	Anzahl	%	
TGF- β 1 Codon 10	T/T (hoch)	32	21	28	11	58	<0,01
	T/C (mittel)	44	36	48	8	42	
	C/C (niedrig)	18	18	24	0	0	

Tabelle 13: TGF- β 1 Polymorphismen im Vergleich von Nicht-Hochrisikogruppe und Hochrisikogruppe bei Kindern mit ALL.

Bei der Auswertung der Leukozyten- und lymphatischen Blastenzahlen zeigt sich, dass Patienten mit einem homozygoten Genotyp an Codon 25 des TGF- β 1 (G/G) signifikant höhere Leukozytenzahlen aufweisen als Patienten mit einem G/C oder C/C Haplotyp (G/G: $51.843 \pm 135/ \mu\text{l}$, G/C und C/C: $30.428 \pm 55/ \mu\text{l}$, $p < 0,03$, Tabelle 14). Lymphatische Blasten sind im G/G Genotyp zwar erhöht, aber nicht signifikant im Vergleich zu den Haplotypen G/C und C/C. Zu-

sätzlich kann bei 9 der 11 Patienten mit Hyperleukozytose (>80.000 Leukozyten bei Erstdiagnose) ein G/G Genotyp auf Codon 25 von TGF-β1 nachgewiesen werden. Die restlichen 2 Patienten exprimieren G/C.

		Anzahl (n=89)	%	Leukozyten- (1000/μl)	p-Wert
TGF-β1	G/G (hoch)	69	77,5	51.843	0,029
Codon	G/C (mittel) und C/C	20	22,5	30.428	
25	(niedrig)				

Tabelle 14: TGF-β1-Polymorphismus und Leukozyten.

4.4.3 IL-10

Ein signifikanter Unterschied kann ebenso beim Vergleich der Risikogruppen (HR versus Nicht-HR) mit den IL-10-Zytokingenpolymorphismen festgestellt werden. Patienten mit einem IL-10 Genotyp ACC/ACC und ACC/ATA sind häufiger in die Hochrisikogruppe (37%) als in der Nicht-Hochrisikogruppe (11%). Darüber hinaus werden weniger Patienten mit einem ATA/ATA Genotyp in die Hochrisikogruppe (0%), als in die Nicht- Hochrisikogruppe (9%) eingeteilt (Tabelle 15):

		Gesamt (n=94)	SR/MR		HR		p-Wert
			An- zahl	%	An- zahl	%	
IL-10	ACC/ACC (niedrig)	1	0	0	1	5	<0,05
	ACC/ATA (niedrig)	14	8	11	6	32	
	ATA/ATA (niedrig)	7	7	9	0	0	
	GCC/ACC (mittel)	37	30	40	7	37	
	GCC/ATA (mittel)	14	13	17	1	5	
	GCC/GCC (hoch)	21	17	23	4	21	

Tabelle 15: IL-10 Polymorphismen im Vergleich von Nicht-Hochrisikogruppe und Hochrisikogruppe bei Kindern mit ALL.

Es kann keine Signifikanz zwischen den Leukozytenzahlen und den IL-10 Polymorphismen festgestellt werden.

4.4.4 IL-6

Weder bei der Analyse der Risikogruppe noch bei den initialen Leukozytenzahlen können signifikante Zusammenhänge mit dem IL-6 Polymorphismus nachgewiesen werden.

4.4.5 IFN- γ

Die Auswertung des Zusammenhangs zwischen den Polymorphismen von IFN- γ und den lymphatischen Blasten ergibt (Tabelle 16), dass Patienten mit einem T/T Genotyp prozentual mehr lymphatische Blasten (45,6%) aufweisen als Patienten mit einem A/A oder einem T/A Genotypen (31,6%).

		Anzahl (n=90)	%	Lymphatische Blasten (%)	p-Wert
IFN- γ	T/T (hoch)	21	23	45,6	0,049
	T/A (mittel) und A/A (niedrig)	69	77	31,6	

Tabelle 16: IFN- γ -Polymorphismus im Vergleich mit lymphatischen Blasten.

Es wurden keine signifikanten Relationen zwischen der Risikogruppe oder den initialen Leukozytenzahlen und dem IFN- γ -Polymorphismus festgestellt.

4.5 Einfluss der lymphatischen Blasten auf die Zytokingenpolymorphismen

Insgesamt sind 33 Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gefunden wurden, bei denen 37 Veränderungen in den Zytokingenen bei Erstdiagnose und nach Therapiebeginn detektiert wurden. 10 Patienten zeigen Genveränderungen bei TNF- α , 7 Patienten bei TGF- β 1, 5 Patienten bei IL-10, 11 Patienten bei IL-6 und 4 Patienten bei IFN- γ .

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose haben signifikant mehr Patienten mit ZNS-Beteiligung einen G/A-Polymorphismus (100%) als Patienten ohne ZNS-Befall (9,4%), siehe Tabelle 17. Bei der Untersuchung im Therapieverlauf kann diese Tendenzen nicht bestätigt werden, jedoch konnte bei einem der ZNS positiven Patienten (Patientennummer 11 in Tabelle 19) ein Zytokingenpolymorphismuswechsel von G/A auf A/A nachgewiesen werden.

		ZNS-Beteiligung				p-Wert
		positiv		negativ		
		Anzahl	%	Anzahl	%	
TNF- α bei Erstdiagnose	G/G	0	0	25	78,1	0,0037
	G/A	3	100	3	9,4	
	A/A	0	0	4	12,5	
TNF- α in Remission	G/G	1	20	52	59	n. s.
	G/A	2	40	24	27	
	A/A	2	40	12	14	

Tabelle 17: TNF- α Polymorphismus und ZNS-Beteiligung bei Diagnose und nach Therapiebeginn.

Weiterhin kann gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Patienten mit einem C/C Genotyp im IL-6 Gen häufiger eine B-ALL (75%) haben als eine T-ALL (16,78%). Weiterhin tritt G/C (50%) häufiger bei T-ALL als bei B-ALL (3,45%) auf (Tabelle 18, $p=0,0032$). Diese Signifikanz wurde nach Therapiebeginn nicht bestätigt, jedoch vollzog sich bei allen 3 Patienten (Patientennummer: 11, 42, 58 in Tabelle 19) mit einem G/C Genotyp einen Zytokinwechsel von G/C auf C/C.

		B-ALL		T-ALL		p-Wert
		Anzahl	%	Anzahl	%	
IL-6 bei Erstdi- agnose	G/G (hoch)	6	20,7	2	33,3	0,0032
	G/C (hoch)	1	3,4	3	50	
	C/C (niedrig)	22	75,9	1	16,67	
IL-6 in Remis- sion	G/G (hoch)	18	21	2	18	n. s.
	G/C (hoch)	4	5	1	9	
	C/C (niedrig)	61	74	8	73	

Tabelle 18: IL-6 Polymorphismus und Risikogruppe bei Erstdiagnose und nach Therapiebeginn.

4.6 Einfluss der Zytokingenpolymorphismen auf die Rezidivrate und die Gesamtüberlebensrate

TNF- α , IL-6 oder IFN- γ haben keinen Einfluss auf die Rezidivrate oder Gesamtüberlebensrate. Patienten mit einem G/C in TGF- β 1 an Codon 25 haben eine niedrigere Rate an Rezidiven als Patienten mit einem G/G oder C/C Genotyp (5-Jahresrezidivfreiheit: G/C: 100%, G/G: 82,46% und C/C: 75%; $p=0,05$; siehe

Abbildung 16). Gleiche Tendenzen können auch in der Gesamtüberlebensdauer (5-JÜR: G/C:100% und G/G:83%) festgestellt werden, welche jedoch aufgrund der kleinen Patientenzahl nicht signifikant ist.

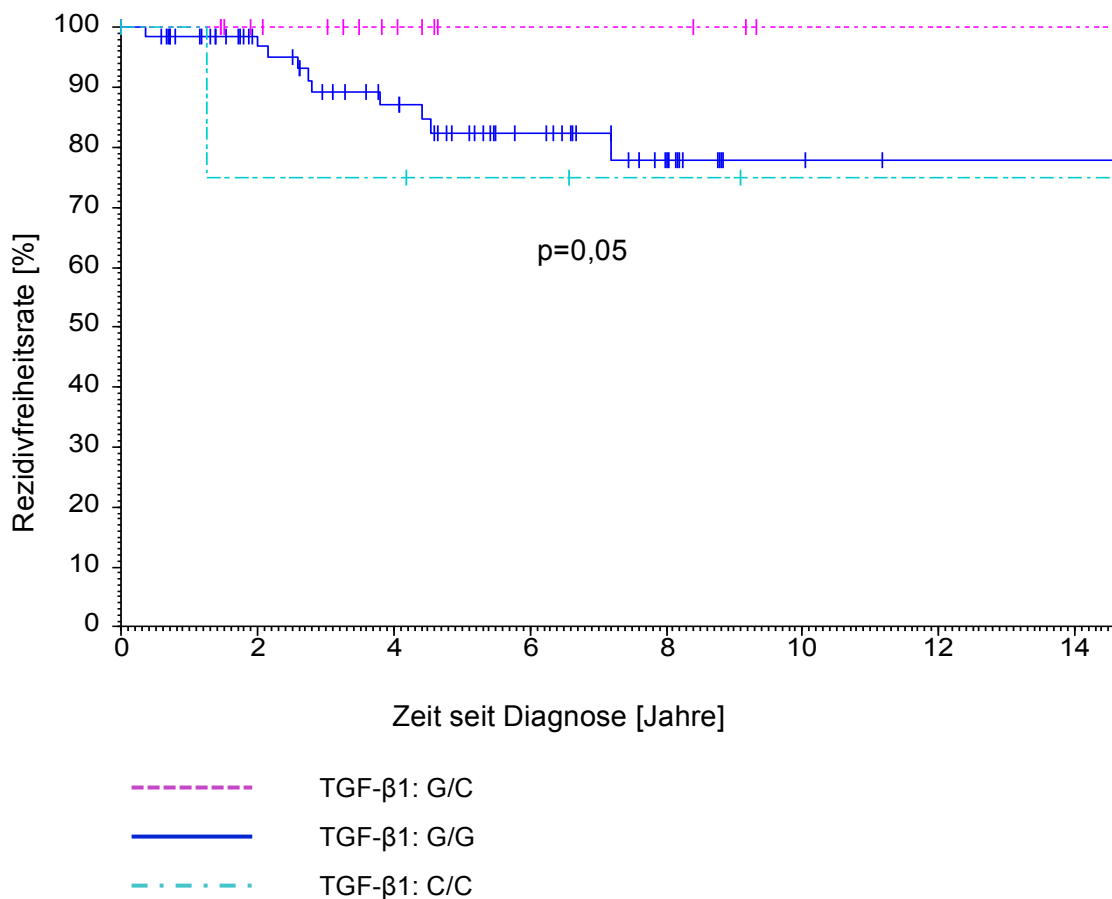


Abbildung 16: Einfluss von TGF- β 1 Codon 25 auf die Rezidivfreiheitsrate bei Patienten mit ALL.

Darüber hinaus ergibt die Auswertung, dass Patienten mit einer mittlerer oder hohen IL-10 Produktion (GCC/ACC, GCC/ATA und GCC/GCC, Tabelle 03) im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen Produktionsrate (ACC/ACC, ACC/ATA und ATA/ATA) weniger Rezidive und zusätzlich eine verlängerte Überlebensdauer haben (Abbildung 17 und Abbildung 18).

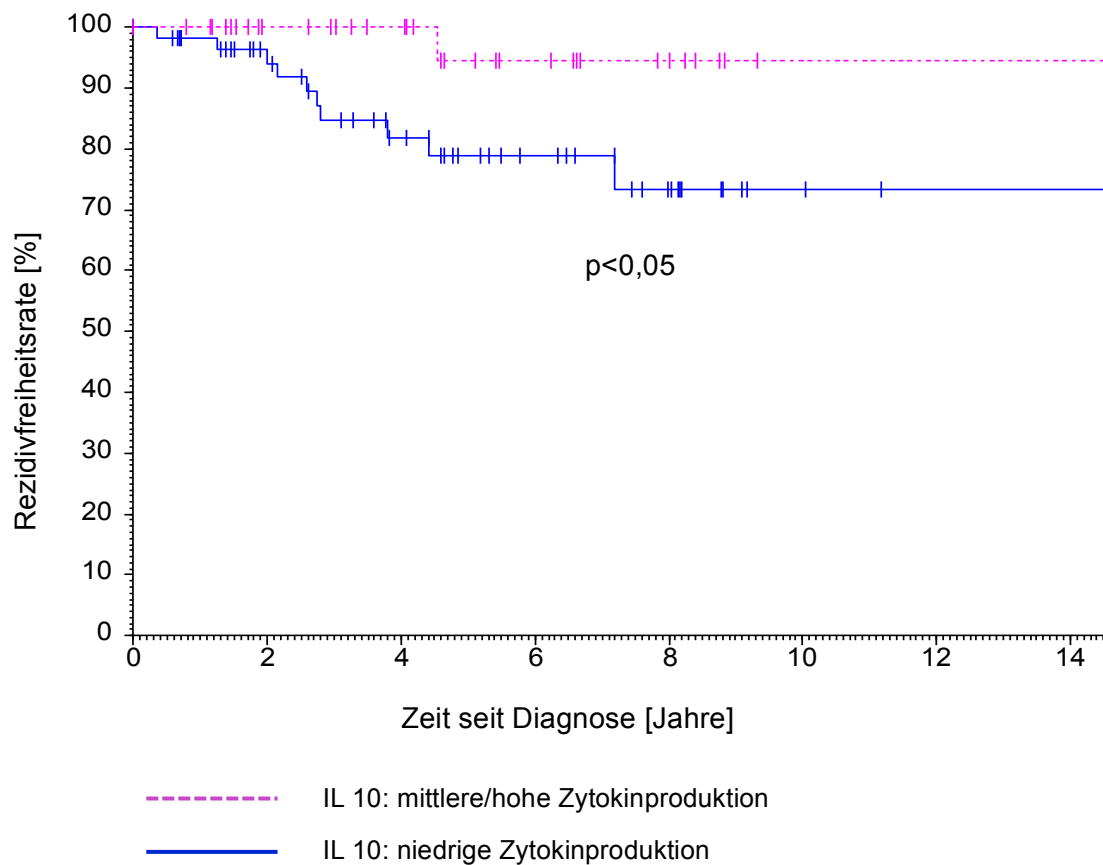


Abbildung 17: Einfluss von IL-10 Genotypen auf die Rezidivfreiheitsrate bei Patienten mit ALL.

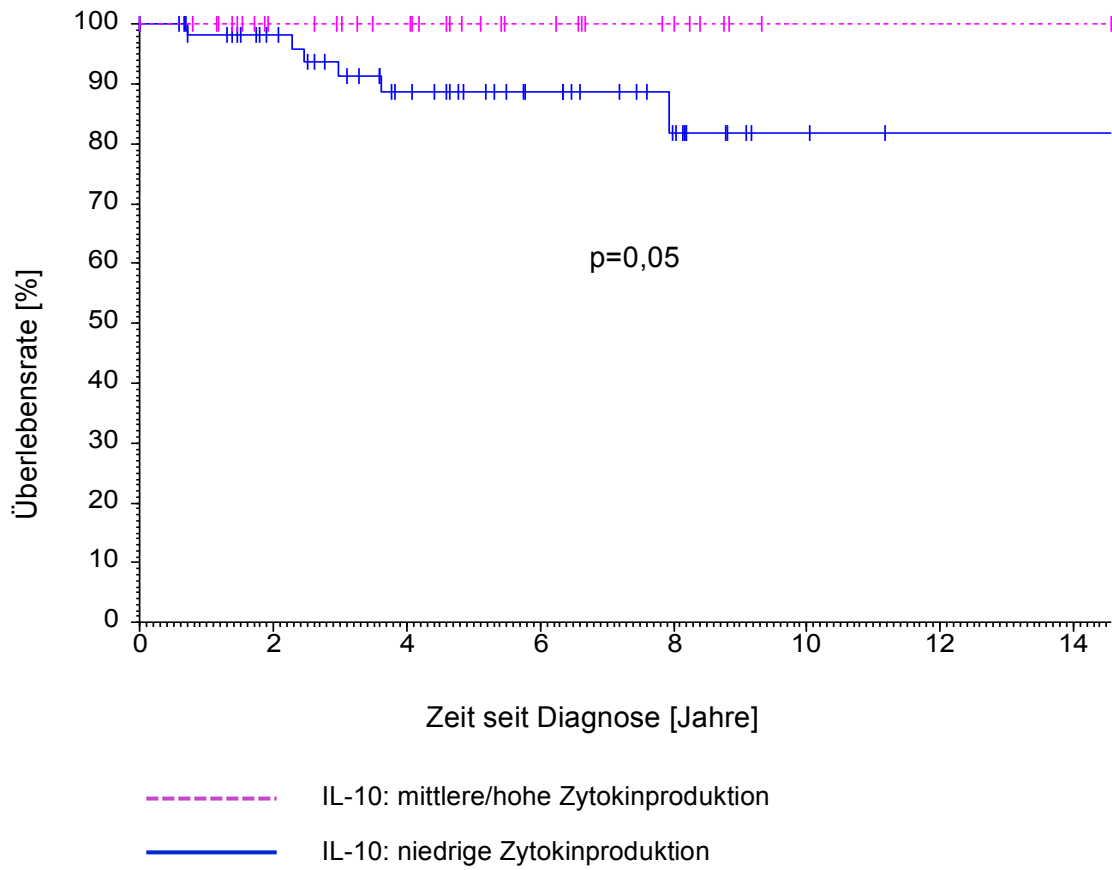


Abbildung 18: Einfluss von IL-10 Genotypen auf das Überleben bei Patienten mit ALL.

5 Diskussion

5.1 Einführende Bemerkungen

Akute lymphatische Leukämien sind die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter. Jedes Jahr werden in Deutschland circa 600 Kinder behandelt. Pathophysiologisch präsentieren sich ALL durch eine gesteigerte Zellproliferation auf Blastenebene sowie einer Inhibition der lymphatischen Differenzierung. Trotz einer Vielzahl an Theorien und Studien konnte bisher noch keine eindeutige Ursache für die Entstehung einer Leukämie gefunden werden. Dennoch kam es in den letzten Jahren zu einer ständigen Verbesserung der Therapie, die jedoch gleichzeitig mit einer erhöhten Zahl an Nebenwirkungen, wie beispielsweise schweren Infektionen, den Behandlungserfolg limitieren. Aus diesem Grund ist es umso wichtiger, Risikofaktoren zu detektieren, um darauf basierend eine gezielte und individuell abgestimmte Therapie zu etablieren. Zu den bereits bekannten Risikofaktoren zählen beispielsweise chromosomale Veränderungen wie das Fusionsgen BCR-ABL. Aufgrund dieser Erkenntnis konnte der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib als fester Bestandteil der ALL-Therapie bei Patienten mit einer BCR-ABL Chromosomentranslokation etabliert und dadurch die Prognose der Patienten entscheidend verbessert werden [88, 89].

5.2 Klinische Parameter

Es ist bekannt, dass verschiedene klinische Patientenmerkmale einen Einfluss auf die Risikogruppe, den Verlauf sowie die Prognose bei Kindern mit ALL haben. So konnte bereits in diversen Studien gezeigt werden, dass männliche Patienten trotz verbesserter Therapieprotokolle ein schlechteres Risikoprofil haben als weibliche Patienten [90-92]. Weitere, bereits beschriebene Risikofaktoren sind: Patienten, die älter als 11 Jahre sind [93], an einer T-ALL erkranken [92], eine ZNS-Beteiligung aufweisen [90], im Hochrisikozweig angesiedelt sind [94], eine Indikation zur SZT erhalten haben [93] oder eine Hyperleukozytose zum Zeitpunkt der Erstdiagnose aufweisen [95].

Diese Erkenntnisse konnten im untersuchten Patientenkollektiv bestätigen werden. 30% der männlichen Patienten und nur 9% der weiblichen Patienten wurden im Hochrisikozweig behandelt. Dabei ist deutlich geworden, dass Patienten, die jünger als 11 Jahre alt sind, signifikant seltener an einem Rezidiv erkranken (9%) als Patienten, die älter als 11 Jahre sind (50%). Ferner konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer T-ALL im Vergleich zur B-ALL vermehrt im Hochrisikozweig therapiert wurden (66,6% versus 14,5%) und häufiger eine ZNS-Beteiligung (25% versus 2,5%) aufwiesen. Zugleich bestätigte sich, dass Patienten in der Hochrisikogruppe im Krankheitsverlauf deutlich häufiger eine Indikation zur SZT erhalten (70%) als Patienten aus dem mittleren- oder Standardrisikozweig (30%). Weiterhin konnte bewiesen werden, dass Patienten mit einem mittleren- oder Standardrisikoprofil eine bessere 5-JÜR aufweisen (97%) als Patienten im Hochrisikozweig (71%). Signifikant erhöhte Leukozytenzahlen konnten bei Patienten mit T-ALL und ZNS-Beteiligung im HR-Zweig sowie bei Patienten mit nachfolgender SZT nachgewiesen werden.

5.3 Zytokingenpolymorphismen

Zytokine dienen als Botenstoff bei der Interaktion verschiedener Zellpopulationen. Sie können das biologische Verhalten der lymphatischen Blasten und der Zellen des Immunsystems beeinflussen, indem sie z. B. die Leukämieogenese fördern, eine Apoptose unterdrücken (IL-10, IL-15), die Immunantwort modulieren (IL-10) oder die Zellproliferation (IL-7, IL-10, IL-15) fördern [96]. Da genetische Veränderungen in den Zytokinen mit unterschiedlichen Zytokinexpressionsraten assoziiert sind, rückte die vorliegende Arbeit die Frage in den Fokus, inwieweit Einzelnukleotidpolymorphismen in pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-6 und IFN- γ) Einfluss auf die Risikogruppe, die Art der Leukämie, die Genfrequenzen, die Rezidivrate und das Gesamtüberleben einer akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter haben.

5.3.1 TNF- α

TNF- α ist ein multifunktionales Zytokin, welches nicht nur Einfluss auf die Zelldifferenzierung oder die lytische Aktivität von Makrophagen nimmt, sondern auch einen entscheidenden Beitrag zur Transkriptionsaktivität des Glukokortikoidrezeptors leistet [65]. Da die Glukokortikoidgabe ein wesentlicher Bestandteil der ALL-Therapie und der Prednisolon-Response ein wichtiger Prognosefaktor ist, könnten TNF- α -Polymorphismen einen Beitrag zur Detektion der Ursache von ALL leisten oder als zukünftige Marker für eine optimale Risikostratifizierung dienen [90, 97].

In verschiedenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass TNF- α mit Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantation sowie einer Kortisonresistenz assoziiert ist [61, 66, 98]. Andere Arbeitsgruppen zeigten jedoch auch, dass TNF- α bei Patienten mit ALL keinen Einfluss auf die Pathogenese, den klinischen Verlauf oder das Behandlungsergebnis haben [99, 100].

Im untersuchten Patientenkollektiv konnte kein Zusammenhang zwischen dem -308 TNF- α Polymorphismus und der Prognose gefunden werden. Interessanterweise konnten bei Patienten mit einer ZNS-Beteiligung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose häufiger der G/A-Genotyp (100%) nachgewiesen werden als bei Patienten ohne ZNS-Befall (9,4%, $p=0,004$). Diese Signifikanz konnte im Therapieverlauf nicht bestätigt werden. Zusätzlich wurde jedoch eine Änderung des Genotyps bei einem Patienten mit ZNS-Beteiligung festgestellt. Folglich kann angenommen werden, dass lymphatischen Blasten ein anderes Genpolymorphismusprofil aufzeigen, welches zum Zeitpunkt der Remission nicht mehr nachzuweisen war. Diese Beobachtungen könnten Hinweise auf einen blastenspezifischen „immune escape“-Mechanismus geben beziehungsweise einen Malignitätsmarker darstellen.

Der Mechanismus der ALL-Blasten, der natürlichen Immunantwort zu entkommen, ist dennoch bisher ungeklärt, wobei einige Daten daraufhin weisen, dass abnorme Zytokinexpressionen eine klonale Expansion der malignen transformierten Zelle bewirken und dass ALL-Zellen ineffizient Antigene präsentieren

[96, 101, 102]. Die Expression von Zytokinen und damit die fehlende T-Zellstimulation wäre eine mögliche Erklärung für diesen „immune escape“. Lucynski et al. haben bereits zeigen können, dass lymphatische Blasten eine niedrige Expressionsrate an Adhäsions- bzw. kostimulierenden Molekülen und darüber hinaus eine erhöhte Zytokinexpression für die Zytokine IFN- γ , IL-4 und TGF- β 1 auf mRNA-Ebene aufweisen [103].

In der Literatur wurden diese Beobachtungen zum Zytokin TNF- α bisher noch nicht beschrieben. Da den Ergebnissen dieser Arbeit nur eine geringe Patientenzahl zugrunde liegt, ist deren Aussagekraft limitiert. Deshalb sollten weitere Analysen sowie Studien durchgeführt werden, um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu replizieren, kontrollieren und deren Gültigkeit in größeren Patientenpopulationen zu testen und um gegebenenfalls neue Risikofaktoren und Ursachen zu detektieren.

5.3.2 IL-10

Oftmals wird IL-10 als Gegenspieler von TNF- α beschrieben, der Einfluss auf das Langzeitüberleben sowie das Ansprechen von Kortison hat [98, 104]. IL-10 wirkt überdies immunsuppressiv auf die Tumorantigenpräsentation, da sowohl kostimulierende Moleküle (CD40) auf den Tumorzellen als auch die MHC II Expression auf antigenpräsentierenden Zellen herunterreguliert werden. Dadurch wird sowohl die antigenpräsentierende Kapazität der Immunzellen als auch die Immunogenität der Tumorzellen verringert und die Elimination maligner Zellen durch das Immunsystem gehemmt [105]. IL-10 trägt ebenso zur abschließenden Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen bei und konnte beispielsweise als Wachstumsfaktor für das Multiple Myelom nachgewiesen werden [106].

Für den IL-10-Polymorphismus konnte bereits in anderen Studien mit Leukämiepatienten gezeigt werden, dass SNP in Promotorregionen von IL-10 das Krankheitsgeschehen beeinflussen. Dabei wiesen AML-Patienten Unterschiede in den Promotorgenregionen an den Positionen -592 und -819 auf [107], wohingegen bei pädiatrischen ALL-Patienten ein Polymorphismus an Position -1082 beschrieben wurde [108].

In dieser Arbeit wurden die erwähnten 3 SNP (-592, -819, -1082) der IL-10 Promotorregion untersucht. Patienten mit den Genotypen ACC/ACC oder ACC/ATA wurden häufiger der Hochrisikogruppe zugeteilt als Patienten mit einem ATA/ATA Genotypen ($p < 0,05$). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Patienten, die IL-10 (GCC/GCC) in hohem Maße produzieren im Vergleich zu ALL-Patienten häufiger in der gesunden Kohorte vorkommen [85]. Ergänzend dazu erkrankten Patienten mit niedrigen IL-10 Produktionsraten (ACC/ACC, ACC/ATA und ATA/ATA) häufiger an einem Rezidiv und hatten darüber hinaus eine schlechtere 5-JÜR als Patienten mit einer hohen Zytokinexpression (GCC/ACC, GCC/GCC, oder GCC/ATA, $p < 0,05$).

Lauten et al. fanden bereits einen Zusammenhang zwischen hohen IL-10 Spiegeln und einem guten Therapieansprechen auf Kortison, was per se ein positiv prognostisches Kriterium ist [98]. Da die Prednisolon-Response in der Induktionsphase ein wichtiger Prognosefaktor ist [90, 97], haben Patienten mit hohen IL-10-Expressionsraten („high producer“ -1082G) einen protektiven Einfluss auf die Prognose bei Kindern mit ALL.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder bei der Analyse der Art der Leukämie noch bei den initialen Leukozytenzahlen oder ZNS-Beteiligung eine Signifikanz festgestellt werden.

5.3.3 TGF- β 1

TGF- β 1 ist ein pluripotentes Zytokin, welches sich durch seine duale Funktion als Tumorsuppressor und Tumorpromotor charakterisieren lässt [109] und damit eine zentrale Rolle bei Tumorerkrankungen einnimmt. Am Beispiel von Hirntumoren ist eine wachstumshemmende Funktion vor allem in den frühen Tumorstadien festzustellen, die während der Tumorprogression aufgrund von bisher unbekanntem Ursachen verloren geht. Der fehlende antiproliferative Effekt von TGF- β 1 führt zu einer ungehinderten Zellproliferation, einem erhöhten Metastasierungspotential, einer Tumordinvasion und darüber hinaus zu einer gesteigerten TGF- β 1-Produktion. Zusätzlich kommt es einerseits zu einer gesteigerten TGF- β 1-Produktion. Andererseits vollzieht sich aus ungeklärten Gründen

ein TGF- β 1-Wechsel vom Tumorsuppressor zum Tumorpromoter, welcher mit einer Suppression des Immunsystems assoziiert ist [110-113]. Nicht nur in Hirntumoren sind erhöhte TGF- β 1 Serumkonzentrationen nachzuweisen, sondern auch bei Lungen-, Mamma-, Kolorektal-, Magen-, Hepatozellulärem- und Nierenkarzinomen oder Gliomen [114, 115].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- β 1 nicht nur Einfluss auf die Fibroseneigung bei Lungentransplantationen hat [68], sondern auch mit Komplikationen bei Nierentransplantationen assoziiert ist. Organempfänger mit niedrigen TGF- β 1-Produktionsraten (Codon 10 Genotyp: C/C, Codon 25 Genotyp: C/C) wiesen häufiger eine Abstoßungsreaktion bei einer Nierentransplantation auf als Patienten mit hohen TGF- β 1 Produktionsraten. Sobald bei Organspendern hohe TGF- β 1-Raten (Codon 10 Genotyp: T/T, Codon 25 Genotyp: G/G) nachgewiesen wurden, stieg die Anzahl an Patienten mit Chronischer Dysfunktion des Nierentransplantats [116]. Darüber hinaus wurde in weiteren Arbeiten zur Karzinogenese sowie zur Graft-versus-Host-Diseases (Transplantat-Wirt-Reaktion) der immunmodulatorische Effekt von TGF- β 1 aufgezeigt [110, 117, 118]. Damit scheint TGF- β 1 eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese und Risikoabschätzung verschiedener Tumorentitäten zuzukommen.

Bereits andere Arbeitsgruppen demonstrierten, dass Genpolymorphismen von TGF- β 1 keinen Einfluss auf die Inzidenz bei Kindern mit ALL haben [119]. Die vorliegende Arbeit bestätigt dieses Ergebnis. Signifikante Unterschiede ergaben sich bei der Analyse der Leukozytenzahlen. Es wurde deutlich, dass Patienten, die ein G/G („high producer“) im TGF- β 1 Codon 25 aufweisen, höhere initiale Leukozytenzahlen haben als die Genotypen G/C und C/C.

Patienten, bei denen G/C im Codon 25 nachgewiesen wurde, hatten eine niedrigere Wahrscheinlichkeit, an einem Rezidiv zu erkranken als Patienten mit einem G/G oder G/C Genotypen ($p=0,05$). Diese Beobachtungen wurden bisher noch nicht in der Literatur beschrieben, weshalb eine umfangreichere Untersuchung angestrebt werden sollte.

Signifikante Unterschiede ergaben sich weiterhin beim Vergleich der Risikogruppe mit den Zytokingenpolymorphismen. Patienten, die hohe TGF- β 1 Produktionsraten (Codon 10 Genotyp: T/T) aufwiesen, waren häufiger im Hochrisikozweig zu finden als Patienten mit niedrigen Produktionsraten (Genotyp: T/C, T/T). Im Rahmen der Studie von Omrani et al. wurde bestätigt, dass das T-Allel von Codon 10 mit einem größeren Risiko für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms beziehungsweise einer benignen Prostatahyperplasie assoziiert ist [120].

Daraus resultiert, dass hohe TGF- β 1 Produktionsraten das Risikoprofil und die Prognose, jedoch nicht die Inzidenz einer ALL zu beeinflussen scheinen. Dennoch bleibt TGF- β 1 ein viel diskutiertes Zytokin, welches beispielsweise durch seine ausgeprägte antiinflammatorische Komponente eine starke T_H2 Reaktion induziert und damit einen entscheidenden Beitrag zu Immunprozessen im Krankheitsverlauf beitragen könnte [121].

5.3.4 IL-6

Interleukin 6 gehört zu den Zytokinen, welche die Entzündungsreaktionen eines Organismus regulieren. Während IL-6 bei lokalen oder akuten Infektionen die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen stimuliert und die Expression von proinflammatorischen (TNF- α , IFN- γ) Zytokinen inhibiert, wirkt es bei chronischen intrazellulären Infektionen oder Tumorerkrankungen proinflammatorisch und regt die Immunglobulinsekretion sowie die B-Zell-Differenzierung an [52, 122]. Es konnte gezeigt werden, dass hohe IL-6 Serumkonzentrationen nicht nur einen Einfluss auf die juvenile chronische Arthritis bei Kindern [55] haben, sondern auch bei Patienten mit Morbus Hodgkin, Non Hodgkin Lymphom und dem multiplen Myelom [123, 124] einen Beitrag zum Krankheitsprozess leisten. Überdies wurde nachgewiesen, dass IL-6 auch bei soliden Tumoren (Ovarial-, Mamma- oder Kolorektalekarzinom) im fortgeschrittenem Krankheitszustand mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [125-128]. Durch die immunsuppressive Wirkung von IL-6 werden dendritische Zellen inhibiert, die dadurch wiederum das weitere Tumorstadium unterstützen.

Sowohl Fishman et al., als auch Cussigh et al. kamen in ihren Studien zu dem Ergebnis, dass das G-Allel häufiger in der Gesundkohorte auftritt und eine höhere Zytokinexpressionsrate aufweist als das C-Allel [55, 129]. Im Vergleich zum gesunden Kollektiv, bei dem das G-Allel vermehrt auftritt, wiesen ALL-Patienten dieser Studie signifikant häufiger das C-Allel auf ($p < 0,0001$), welches mit einer niedrigen Zytokinproduktion assoziiert ist. Folglich haben pädiatrische ALL-Patienten signifikant niedrigere IL-6 Produktionsraten als gesunde Patienten [85].

Diese Feststellung steht im Widerspruch zu den bisherigen Thesen, die besagen, dass erhöhte IL-6 Raten einen Einfluss auf die Karzinogenese haben [123, 124]. Daher sollten diese Thesen im Rahmen von umfangreicheren Studien noch einmal überprüft werden, da IL-6 durch seine unterschiedlichen Wirkungsweisen zum einen als Botenstoff im Rahmen einer Akute-Phase-Reaktion bei Infektionen sowie zum anderen als Immunsuppressivum fungieren kann. Da viele ALL Patienten initial mit Infektionen und Fieber als Folge ihrer Abwehrschwäche im Rahmen ihrer Grunderkrankung aufgenommen werden, weisen diese Patienten allein aufgrund ihrer Infektion einen erhöhten IL-6 Spiegel auf. Es bleibt deshalb unklar, ob die hohe IL-6 Expression als ein Teil der Grunderkrankung und als Produkt der Blasten anzusehen ist oder ob es sich vielmehr um ein infektiöses Ereignis handelt, bei dem Immunzellen inflammatorische Mediatoren produzieren.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose signifikant mehr Patienten mit B-ALL einen C/C-Genotypen (76%) und seltener einen G/C-Genotypen (3,4%) aufweisen als Patienten mit einer T-ALL (Genotyp: C/C: 16,6%, G/C: 50%) [85]. Ebenso wie bei TNF- α kam es hier wahrscheinlich aufgrund eines „immune escape“-Mechanismus zu einer Änderung des Genotyps, da diese Genotypen in Remission nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Diese Erkenntnisse sollten im Rahmen umfangreicherer Studien und größerer Patientenzahlen noch einmal überprüft werden.

5.3.5 IFN- γ

IFN- γ ist ein klassisches T_H1-Zytokin, welches aufgrund seiner proinflammatorischen Wirkung Einfluss auf die Tumorprogression nehmen kann [130, 131]. In den vergangenen Jahren wurde in einer Vielzahl von Studien der Zusammenhang zwischen dem IFN- γ -Polymorphismus und einer erhöhten Krebsinzidenz beschrieben. Unter anderem wurden bei Patienten mit Mamma- [130, 132] oder Cervixkarzinom [133] nachgewiesen, dass IFN- γ das Erkrankungsrisiko signifikant erhöht. Jedoch konnten Ge et al. beweisen, dass diese Erkenntnisse nicht eindeutig beziehungsweise umstritten waren. Im Rahmen einer Metaanalyse konnten Ge et al. beweisen, dass es keine signifikante Assoziation zwischen dem IFN- γ Polymorphismus und verschiedenen Tumorerkrankungen gibt [134]. Unabhängig davon wurde jedoch bereits in einer Studie bei Kindern mit ALL ein Zusammenhang zwischen dem IFN- γ und dem Alter beziehungsweise der Risikogruppe bei B-ALL nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einer B-ALL und einer schlechten Prednisolon-Response häufiger das A-Allel („low producer“) exprimieren [135].

Im untersuchten Patientenkollektiv wurden bei Patienten mit einem T/T-Allel und einer hohen IFN- γ -Expressionsrate zum Zeitpunkt der Erstdiagnose signifikant mehr lymphatische Blasten nachgewiesen als bei Patienten mit niedrigen IFN- γ -Raten (T/A, A/A). Das daraus resultierende schlechtere Risikoprofil könnte Einfluss auf die Prognose nehmen [95].

Interessanterweise ist ebenso wie für das T_H1 Zytokin TNF- α kein Zusammenhang zwischen IFN- γ und der Inzidenz, Risikogruppe oder Prognose festgestellt worden. Eine leukämie-assoziierte Immunmodulation könnte als Ursache der gestörten T_H1 Zytokinproduktion angesehen werden und müsste im Rahmen weiterer Studien sowie anderer Methoden untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die akute lymphatische Leukämie ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Trotz systematischer Erhebung und Auswertung von Daten im Rahmen der ALL-BFM-Studiengruppe und der damit verbundenen kontinuierlichen Verbesserung der Prognose hat man noch immer keine Ursache für eine ALL gefunden. Daher nimmt eine umfangreiche Risikostratifizierung eine zentrale Rolle in der Behandlungsplanung einer ALL ein. Basierend auf einer exakten Stratifizierung kann die Therapie risikoadaptiert und individualisiert werden, um eine Übertherapie zu vermeiden und letztlich die Heilungschancen zu verbessern.

Pro- und antiinflammatorische Zytokine kommt in den komplexen Wirkungsmechanismen des Immunsystems eine Schlüsselrolle zu. Viele Infektions-, Autoimmun- oder Tumorerkrankungen werden durch das Produktionsprofil der Zytokine beeinflusst. Da genetisch determinierte Zytokingenpolymorphismen Krankheitsverläufe beeinflussen und verändern, wurde untersucht, ob Zytokine einen Einfluss auf pädiatrische Patienten mit einer ALL haben.

Im Zuge dieser Arbeit wurden 95 pädiatrische Patienten mit ALL auf Polymorphismen der Zytokine TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-6 und IFN- γ analysiert, die im Zeitraum vom 21.06.2004 bis zum 30.04.2014 an der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg behandelt wurden. Mittels DNA-Extraktion, sequenzspezifischer PCR und Gelelektrophorese wurden 35 Proben bei Erstdiagnose und 93 zum Zeitpunkt der Remission mit folgender zentralen Fragestellung untersucht:

Gibt es genetische Risikofaktoren, die Einfluss auf

- die Risikogruppe
- die Art der Leukämie
- die Genfrequenz
- die Rezidivrate und
- das Gesamtüberleben

einer akuten lymphatische Leukämie im Kindesalter haben und sich zudem durch Einzelnukleotidpolymorphismen in pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auszeichnen?

Im Rahmen dieser Studie konnte festgestellt werden, dass das immunsuppressive Zytokin IL-10 einen Einfluss auf die Genfrequenz, die Risikogruppe, die Rezidivrate sowie die Prognose bei Kindern mit ALL hat. Patienten mit niedrigen Zytokinexpressionsraten (Genotypen ACC/ACC und ACC/ATA) wurden häufiger in der Hochrisikogruppe therapiert, hatten mehr Rezidive und eine schlechtere Prognose als Patienten mit hohen Zytokinexpressionsraten. Darüber hinaus ist der Genotyp GCC/ACC signifikant häufiger bei ALL-Patienten anzutreffen als im gesunden Kollektiv. Beim immunsuppressiven IL-6 konnte festgestellt werden, dass der Genotyp C/C signifikant häufiger bei Patienten mit einer ALL auftritt als bei gesunden Patienten. Ferner zeigte sich, dass es sowohl für IL-6 als auch für TNF- α eine Änderung des Genotyps zwischen Erstdiagnose und in Remission auftrat, die Hinweise auf einen blastenspezifischen „immune-escape“-Mechanismus geben. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das immunmodulatorische Zytokin TGF- β 1 einen Einfluss auf die Risikogruppe sowie die Rezidivrate hat. Patienten, die eine T/T Kombination am Codon 10 aufwiesen wurden häufiger im Hochrisikozweig therapiert als Patienten mit den Genotypen T/C oder C/C. Des Weiteren wurde demonstriert, dass Patienten mit einem C/C an Codon 25 häufiger an Rezidiven erkrankten als Patienten mit einem G/C oder G/G. Für die T_H1 Zytokine IFN- γ sowie TNF- α wurde kein Zusammenhang zwischen der Genfrequenz, der Risikogruppe, der Art der Leukämie, der Rezidivrate oder dem Gesamtüberleben gefunden.

Auch wenn man bisher noch nicht genau weiß, wie Zytokingenpolymorphismen Einfluss auf pädiatrische ALL nehmen, wird anhand dieser Arbeit gezeigt, dass Zytokine einen Beitrag zur Pathogenese der ALL leisten und daher zukünftig für eine umfassendere Risikostratifizierung geeignet sind. Darüber hinaus können diese Ergebnisse dazu beitragen, dass Zytokine als biologische Marker etabliert werden, um eine weniger toxische immunmodulierende bzw. -suppressive Therapie zu gewährleisten. Dies führt dazu, dass eine Therapie anhand des Risi-

koprofils individuell und prognoseverbessernd abgestimmt werden kann. Jedoch wäre für eine nachfolgende Untersuchung eine größere multizentrische Stichprobe sowie eine prospektive Evaluation der Daten erstrebenswert. Gerade bei hereditären Erkrankungen haben einzelne Gene nur einen geringen Einfluss auf das Gesamtrisiko, sodass größere Fallzahlen erforderlich wären, um auch schwache Effekte zu detektieren.

7 Summary

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most common malignant disease in childhood. Although survival rates in paediatric patients with ALL have greatly improved since effective drug combinations and risk-adapted therapy protocols were introduced, possible causes for ALL are yet to be determined. The incomplete information on the pathogenesis of ALL heightens the need for extensive risk stratification in order to develop and improve treatment methods. Exact stratification helps to continuously improve and develop risk-adapted and individual therapy approaches to minimise over- or under-treatment.

Based on the empirical finding that cytokines play a decisive role in immune responses and that many autoimmune and malignant diseases are influenced by cytokine production, this study hypothesized that genetically determined cytokine gene polymorphisms might have an impact on children with ALL.

95 pediatric ALL patients were examined between June 2004 and April 2013 at the Children's Hospital of the University of Würzburg with regard to cytokine gene polymorphisms in TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-6 and IFN- γ . Applying DNA extraction, sequence-specific PCR and gel electrophoresis, 35 samples at initial diagnosis and 93 samples in remission were obtained in order to find an answer to the following question:

Are there any genetic risk factors, which influence the

- risk group
- type of leukaemia
- gene frequency
- relapse rate
- overall survival

with acute lymphoblastic leukaemia in childhood?

Within the scope of this study the immunosuppressive IL-10 has an influence on gene frequency, risk group, relapse rate and overall survival. IL-10 high-producer-haplotypes were reduced in ALL-patients compared with healthy con-

trols and resulted in a reduced relapse rate, a superior overall survival and resulted more often in the low risk group compared with IL-10 low producer haplotypes. By analysing immunosuppressive IL-6, it was demonstrated, that the genotype C/C is significantly more frequent in ALL-patients in comparison to healthy patients. Interestingly, with regard to IL-6 as well as to TNF- α genotypes a change in the genotype from initial diagnosis to remission was found in some patients, which may indicate a blast specific immune-escape mechanism. Moreover, the immune-modulatory cytokine TGF- β 1 has an influence on risk group and relapse rate. Patients with a C/C in Codon 10 suffered more often from relapses than patients with G/C or G/G. TGF- β 1 high producer haplotypes were correlated with a high initial blast-count (Codon 25 G/G) and were elevated in high-risk ALL-patients (Codon 10 T/T). For the T_H1 cytokines IFN- γ and TNF- α no correlation between frequencies, risk group, type of leukaemia, relapse rate or overall survival could be found.

Even though the mechanisms by which the cytokine polymorphisms influence the outcome of paediatric ALL remain to be determined, the data of the present study suggest an important contribution of cytokines to the pathogenesis of ALL and demonstrate their potential applicability in the clinical evaluation of prognosis in paediatric patients. Confirmatory studies correlating cytokine alleles with disease markers will support the concept of cytokine-mediated immune surveillance in humans as well as the importance of the genetic background of the patient for strong anti-tumour immunity and responses to therapy. These data can finally help to establish biomarkers for therapy stratification as well as immune-therapeutic tools in childhood ALL for a more risk-adapted therapy, in order to adapt the therapy intensity. However, for further studies an increase in sample size and a prospective multicentre evaluation would be desirable. Especially in hereditary diseases, single genes have only a small influence on the overall risk. That is why it is crucial to have a sufficiently high number of cases to detect even small effects.

8 Anhang

Die folgende Tabelle fasst alle Patienten noch einmal umfassend zusammen:

Nr.	m/w	Alter bei ED in y	Diagnose	Risikozweig	Translokationen	ZNS-Befall	SZT - Indikation	Behandlungsergebnis	VK seit ED bis Rezidiv/ Todesdatum/ Remission/ zuletzt bekannt
01	w	0,6	B-ALL	MR	andere	-	nein	Remission	1395
02	m	8	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	2919
03	w	1	B-ALL	SR	keine	+	nein	Remission	4079
04	m	2	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	957
05	w	5	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	696
06	w	7	B-ALL	MR	andere	-	nein	Remission	623
07	w	9	B-ALL	HR	andere	-	ja	verstorben	258
08	m	4	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1314
09	m	6	B-ALL	SR	Trisomie 21	-	nein	Remission	2403
10	w	5	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	951
11	m	15	T-ALL	SR	keine	+	nein	Remission	479
12	m	3	B-ALL	HR	TEL/AML1, Trisomie 8	-	nein	Remission	2924
13	m	14	B-ALL	MR	TEL/AML1	-	nein	Remission	1486
14	m	4	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	3408
15	w	7	B-ALL	SR	Trisomie 21	-	nein	Remission	756
16	m	14	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	289
17	m	9	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	289
18	m	15	T-ALL	HR	keine	+	ja	Remission	1698
19	m	4	T-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	503
20	w	3	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	1940
21	m	17	T-ALL	HR	keine	+	ja	Remission	553
22	m	15	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	1771
23	m	13	B-ALL	MR	keine	-	nein	Rezidiv	1076
24	m	6	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	1614
25	w	3	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	685
26	m	13	B-ALL	SR	andere	-	ja	verstorben	2105
27	w	1	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	894
28	m	16	B-ALL	HR	keine	-	ja	Rezidiv	2624
29	m	22	T-ALL	HR	keine	-	ja	verstorben	946
30	m	4	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1324
31	m	11	B-ALL	HR	keine	-	nein	Remission	2983
32	m	2	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	260
33	w	3	T-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	3011
34	m	2	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1489
35	m	1	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1276
36	w	15	B-ALL	SR	keine	-	nein	Rezidiv	2441
37	w	4	T-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	1016
38	w	2	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	3324
39	w	9	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	2994
40	m		B-ALL	HR	keine	-	ja	unbekannt	3226
41	w	4	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	
42	m	8	T-ALL	HR	keine	-	ja	Remission	2421
43	m	3	B-ALL	HR	keine	-	ja	verstorben	631
44	w	5	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	1084
45	m	7	B-ALL	HR	BCR-ABL +	-	nein	Remission	3195
46	w	8	B-ALL	MR	TEL/AML1	-	nein	Remission	239
47	m	7	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	2312
48	m	10	T-ALL	HR	keine	-	nein	Remission	1982

49	m	16	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	3205
50	w	11	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1481
51	m	2	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	2408
52	m	6	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	652
53	m	3	B-ALL	MR	Trisomie 21	-	ja	Remission	2364
54	w	12	B-ALL	SR	keine	-	ja	Rezidiv	5326
55	m	1	B-ALL	SR	keine	-	ja	verstorben	2629
56	w	2	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	2629
57	m	11	B-ALL	HR	keine	-	nein	Remission	2902
58	w	2	T-ALL	HR	keine	-	ja	Remission	1892
59	m	2	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	3672
60	m	2	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	690
61	m	1	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	530
62	w	4	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1995
63	w	9	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	1129
64	w	4	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1190
65	m	6	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	425
66	w	0,2	B-ALL	SR	keine	+	ja	verstorben	505
67	w	5	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	3218
68	m	3	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	828
69	w	3	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	1673
70	m	4	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1692
71	m		B-ALL	HR	keine	-	ja	unbekannt	245
72	w	9	T-ALL		BCR-ABL	-	ja	Remission	1608
73	m	1	B-ALL	MR	andere	-	ja	Rezidiv	
74	w	2	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	421
75	m	14	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	789
76	w	2	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	1528
77	w	5	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1381
78	w	5	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	2933
79	m	3	T-ALL	HR	andere	-	ja	Remission	1107
80	m	1	B-ALL	HR	keine	-	ja	Remission	1741
81	w	4	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	453
82	m	10	B-ALL	HR	keine	-	ja	Remission	1861
83	m	17	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	3348
84	m	4	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	916
84	m	4	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Remission	215
85	m	16	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	556
86	w	2	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	2010
87	w	1	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	1199
88	m	1	B-ALL	MR	keine	-	nein	Remission	2779
89	m	2	B-ALL	SR	TEL/AML1	-	nein	Rezidiv	1680
90	m	8	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	1660
91	w	7	B-ALL	HR	keine	-	nein	Remission	432
92	w	3	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	531
93	w	3	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	2274
94	w	10	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	2722
95	w	2	B-ALL	SR	keine	-	nein	Remission	2861

95	54 m, 41 w	Alters- me- dian: 4,71 Jahre	83 B- ALL, 12 T- ALL	52 SR, 23 MR, 20 HR	23 Trans- lokationen: 2 BCR – ABL, 9 andere, 12 TEL/AML	5 ZNS +, 90 ZNS -	20 SZT- Ind., 75 ohne SZT- Ind.	81 in Rem ission, 6 Rezidive, 6 ver- storben, 2 un- bekannt	VK: Medi- an von 1568 Ta- gen
-----------	-----------------------	---	---	------------------------------------	--	--------------------------------------	--	--	--

Tabelle 19: Patientencharakteristika ED - Erstdiagnose, Mo.- Monate, SZT - Stammzelltransplantation, SR - Standardrisiko, MR - mittleres Risiko, HR - hohes Risiko.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: Subtypen der ALL aus den lymphatischen Zellen der verschiedenen Reifestufen. Grafik entnommen aus [27].	5
Abbildung 02: Relative Häufigkeit der Immunphänotypen bei Patienten mit ALL basierend auf der EGIL Klassifikation (European Group for Immunological Characterization of Leukemias) [29]. Daten entnommen von [27].	6
Abbildung 03: Darstellung eines schematischen Bandenmusters zur Gelauswertung.	28
Abbildung 04: Vergleich der B-Zell- und T-Zell-Leukämie in der Standard-, mittleren- und Hochrisikogruppe.	33
Abbildung 05: Vergleich der Indikationsstellung zur SZT bei Standard-, mittleren- und Hochrisikozweig.	33
Abbildung 06: Vergleich der Leukämieart mit dem Befall des ZNS.	34
Abbildung 07: Rezidivfreiheitsrate nach Alter der Patienten.	35
Abbildung 08: Rezidivfreiheitsrate nach Indikation zur SZT.	36
Abbildung 09: Leukozytenzahlen bei Diagnose im Vergleich zu verschiedenen Leukämieformen, ZNS-Beteiligung, Risikozweig und SZT Indikation.	37
Abbildung 10: Schematische Bandenkonstellation der TNF- α Polymorphismen.	39
Abbildung 11: Ergebnis eines Patienten mit G/G Polymorphismus im TNF- α Gen.	40
Abbildung 12: Ergebnis eines Patienten mit C/C SNP an Codon 10 und einem G/G SNP an Codon 25 im TGF- β 1-Gen.	41
Abbildung 13: Ergebnis eines Patienten mit GCC/GCC Genotypen des Zytokins IL-10 an den Promotorregionen von -1082, -819 und -592.	42

Abbildung 14: Patient mit einem G/C Genotyp des IL-6 an der Promotorregion -174.	42
Abbildung 15: Patient mit einem T/A Genotyp des IFN- γ am Intron 1 +874.	43
Abbildung 16: Einfluss von TGF- β 1 Codon 25 auf die Rezidivfreiheitsrate bei Patienten mit ALL.	49
Abbildung 17: Einfluss von IL-10 Genotypen auf die Rezidivfreiheitsrate bei Patienten mit ALL.	50
Abbildung 18: Einfluss von IL-10 Genotypen auf das Überleben bei Patienten mit ALL.	51

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 01: Risikostratifizierung, basierend auf [28, 33].	7
Tabelle 02: Zusammenfassende Charakterisierung der für diese Studie relevanten Zytokine, basierend auf [48-56].	12
Tabelle 03: Zytokingenpolymorphismen sowie deren Expressionsrate, Tabelle übernommen aus [58].	13
Tabelle 04: Geräte, Bezeichnungen nach Herstellerangaben.	20
Tabelle 05: Laborzubehör, Bezeichnungen nach Herstellerangaben.	20
Tabelle 06: Chemikalien und sonstige Reagenzien, Bezeichnungen nach Herstellerangaben	21
Tabelle 07: Pipettierschema der Primer.	25
Tabelle 08: Primersequenzen, entnommen aus [83].	27
Tabelle 09: Patientencharakteristika I, Vergleich von B- und T-Zell Leukämie.	30
Tabelle 10: Patientencharakteristika II, Vergleich von Nicht-Hochrisikogruppe (SR/MR) mit Hochrisikogruppe (HR).	31
Tabelle 11: Vergleich der Risikogruppe nach dem Geschlecht.	32
Tabelle 12: Genfrequenzen der Zytokingenpolymorphismen im Vergleich in der Gruppe der ALL-Patienten (n=93) zu einer publizierten Kontrollkohorte [85-87].	38
Tabelle 13: TGF- β 1 Polymorphismen im Vergleich von Nicht-Hochrisikogruppe und Hochrisikogruppe bei Kindern mit ALL.	44
Tabelle 14: TGF- β 1-Polymorphismus und Leukozyten.	45
Tabelle 15: IL-10 Polymorphismen im Vergleich von Nicht-Hochrisikogruppe und Hochrisikogruppe bei Kindern mit ALL.	46
Tabelle 16: IFN- γ -Polymorphismus im Vergleich mit lymphatischen Blasten.	47
Tabelle 17: TNF- α Polymorphismus und ZNS-Beteiligung bei Diagnose und nach Therapiebeginn.	48

Tabelle 18: IL-6 Polymorphismus und Risikogruppe bei Erstdiagnose und nach Therapiebeginn.	48
Tabelle 19: Patientencharakteristika	67

11 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P. and Spix, C., 2013/2014, Jahresbericht 2013/2014. Deutsches Kinderkrebsregister, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz, Online verfügbar unter: http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/26650/0/22cb72c5a76a0e46c1fe00358768d9ab8ecd3c1e/jb2014_s.pdf, Zuletzt abgerufen im: Dezember 2015
2. SEER, Surveillance, Epidemiology and End Results Program, Online verfügbar unter: www.seer.cancer.gov, Zuletzt abgerufen im: Dezember 2015
3. Gökbüget, N., Hauswirth, A., Kneba, M., Schanz, U., and Ottmann, O., 2012, Akute lymphatische Leukämie, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.], Online verfügbar unter: <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/akute-lymphatische-leukaemie>, Zuletzt abgerufen im: Dezember 2015
4. Valpeau, A., 1827, Sur la resorption du pus et sur l'alteration du sang dans les maladies, Clinique de persection nenemant, Premier observation. *Rev Med* 1827. 26:216.
5. Donné, A., 1844, Cours de microscopie complémentaire des études médicales. Anatomie microscopique et physiologie des fludes de l'Economie. *Ballière, Paris*: p. 551.
6. Bennett, J., 1845, Case hypertrophy of the spleen, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Surg*: p. 64:413-423.
7. Virchow, R., 1845, Weisses Blut. *Notiz Geg Natur Keilk*: p. 36:152.
8. Virchow, R., 1847, Weisses Blut und Milztumoren. *Arch Path Anat Physiol*: p. 1:565.
9. Ehrlich, P., 1878, Beiträge zur Theorie und Praxis histologischen Färbung. (Leipzig, Diss.): p. 65.
10. Naegeli, O., 1900, Über rotes Knochenmark und Myeloblasten. *Deutsch Med Wochenschr*. 26:287.

11. Hirschfeld, H., 1898, Zur Kenntniss der Histogenese der granulierten Knochenmarkzellen. *Arch Path Anat*: p. 153, 335.
12. Pombo de Oliveira, M., Awad el Seed, F., Foroni, L., Matutes, E., Morilla, R., Luzzatto, L., and Catovsky, D., 1986, Lymphoblastic leukaemia in Siamese twins: evidence for identity. *Lancet*. 2(8513): p. 969-70.
13. Ford, A., Ridge, S., Cabrera, M., Mahmoud, H., Steel, C., Chan, L., and Greaves, M., 1993, In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*. 363(6427): p. 358-60.
14. McEvoy, M. and Mann, J., 1971, Neurofibromatosis with leukaemia. *Br Med J*. 3(5775): p. 641.
15. Robison, L., Nesbit, M., Sather, H., Level, C., Shahidi, N., Kennedy, A., and Hammond, D., 1984, Down syndrome and acute leukemia in children: a 10-year retrospective survey from Childrens Cancer Study Group. *J Pediatr*. 105(2): p. 235-42.
16. Hasle, H., 2001, Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol*. 2(7): p. 429-36.
17. Gale, K., Ford, A., Repp, R., Borkhardt, A., Keller, C., Eden, O., and Greaves, M., 1997, Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(25): p. 13950-4.
18. Taub, J., Konrad, M., Ge, Y., Naber, J., Scott, J., Matherly, L., and Ravindranath, Y., 2002, High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 99(8): p. 2992-6.
19. Wiemels, J., Cazzaniga, G., Daniotti, M., Eden, O., Addison, G., Masera, G., Saha, V., Biondi, A., and Greaves, M., 1999, Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*. 354(9189): p. 1499-503.
20. Knudson, A., 1971, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68(4): p. 820-3.
21. Greaves, M., 2002, Childhood leukaemia. *BMJ*. 324(7332): p. 283-7.
22. Dickinson, H., 2005, The causes of childhood leukaemia. *BMJ*. 330(7503): p. 1279-80.

23. Shimizu, Y., Kato, H., and Schull, W., 1990, Studies of the mortality of A-bomb survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86). *Radiat Res.* 121(2): p. 120-41.
24. Bhatia, S., Robison, L., Oberlin, O., Greenberg, M., Bunin, G., Fossati-Bellani, F., and Meadows, A., 1996, Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 334(12): p. 745-51.
25. Lehtinen, T., 1998, Common and emerging infectious causes of hematological malignancies in the young. *APMIS.* 106(6): p. 585-97.
26. Weinreb, M., Day, P., Niggli, F., Green, E., Nyong'o, A., Othieno-Abinya, N., Riyat, M., Raafat, F., and Mann, J., 1996, The consistent association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease in children in Kenya. *Blood.* 87(9): p. 3828-36.
27. Gökbüget, N., 2015, Akute lymphatische Leukämie (ALL), Online verfügbar unter: http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/all/index_ger.html, Zuletzt abgerufen im: Dezember 2015
28. Jaffe, E., Harris, N., Stein, H., and Vardiman, J., 2001, World Health Organization Classification of Tumours, Pathology & Genetics, Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC Press, Lyon.*
29. Bene, M., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M., 1995, Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 9(10): p. 1783-6.
30. Marshall, G., Haber, M., Kwan, E., Zhu, L., Ferrara, D., Xue, C., Brisco, M., Sykes, P., Morley, A., Webster, B., Dalla Pozza, L., Waters, K., and Norris, M., 2003, Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 21(4): p. 704-9.
31. Kerst, G., Kreyenberg, H., Roth, C., Well, C., Dietz, K., Coustan-Smith, E., Campana, D., Koscielniak, E., Niemeyer, C., Schlegel, P., Müller, I., Niethammer, D., and Bader, P., 2005, Concurrent detection of minimal

- residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol.* 128(6): p. 774-82.
32. Harrison, C. and Foroni, L., 2002, Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 6(2): p. 91-113; discussion 200-2.
 33. Speer, C. and Gahr, M., 2013, Pädiatrie. Springer: Berlin. p. 638-44.
 34. Burger, B., Zimmermann, M., Mann, G., Kuhl, J., Loning, L., Riehm, H., Reiter, A., and Schrappe, M., 2003, Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol.* 21(2): p. 184-8.
 35. Seeger, R., Brodeur, G., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S., Wong, K., and Hammond, D., 1985, Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* 313(18): p. 1111-6.
 36. Boulton, S., 2006, Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 5): p. 633-45.
 37. Schrappe, M., Hunger, S., Pui, C., Saha, V., Gaynon, P., Baruchel, A., Conter, V., Otten, J., Ohara, A., Versluys, A., Escherich, G., Heyman, M., Silverman, L., Horibe, K., Mann, G., Camitta, B., Harbott, J., Riehm, H., Richards, S., Devidas, M., and Zimmermann, M., 2012, Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 366(15): p. 1371-81.
 38. Gökbuget, N., 2011, GMALL-Empfehlung zur Stammzelltransplantation, Online verfügbar unter: <http://www.onkologie-haematologie.med.uni-goettingen.de/media/project/GMALL-Empfehlung-SZT.pdf>, Zuletzt abgerufen im: Mai 2014
 39. Henze, G., 2004, 20 Jahr Studien zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL-REZ BFM), Online verfügbar unter: http://www.kinderkrebsstiftung.de/fileadmin/KKS/files/zeitschriftWIR/2004_3/ALL-REZ.pdf, Zuletzt abgerufen im: Mai 2014

40. Stanulla, M. and Schrappe, M., 2009, Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 46(1): p. 52-63.
41. Moricke, A., Reiter, A., Zimmermann, M., Gadner, H., Stanulla, M., Dordelmann, M., Loning, L., Beier, R., Ludwig, W., Ratei, R., Harbott, J., Boos, J., Mann, G., Niggli, F., Feldges, A., Henze, G., Welte, K., Beck, J., Klingebiel, T., Niemeyer, C., Zintl, F., Bode, U., Urban, C., Wehinger, H., Niethammer, D., Riehm, H., and Schrappe, M., 2008, Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood.* 111(9): p. 4477-89.
42. Miller, D., 1990, Blood diseases of infancy and childhood *6th edition* (Mosby Company, St. Louis, Philadelphia, Washington DC, Toronto): p. 604-721.
43. Loppnow, H., 2001, Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action. *Internist (Berl).* 42(1): p. 13-14, 17-27.
44. MacDonald, T., Monteleone, G., and Pender, S., 2000, Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol.* 51(1): p. 2-9.
45. Neuhaus, O., Farina, C., Yassouridis, A., Wiendl, H., Then Bergh, F., Dose, T., Wekerle, H., and Hohlfeld, R., 2000, Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(13): p. 7452-7.
46. Li, M., Sanjabi, S., and Flavell, R., 2006, Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity.* 25(3): p. 455-71.
47. Gold, L., 1999, The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog.* 10(4): p. 303-60.
48. Wilson, A., di Giovine, F., Blakemore, A., and Duff, G., 1992, Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha)

- gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1(5): p. 353.
49. Curfs, J., Meis, J., and Hoogkamp-Korstanje, J., 1997, A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 10(4): p. 742-80.
 50. Wahn, U., Seger, R., Wahn, V., and Holländer, G., 2005, Pädiatrische Allergologie und Immunologie. Urban & Fischer Verlag: München, Jena. p. 147-82.
 51. Borish, L. and Steinke, J., 2003, 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 111(2 Suppl): p. 460-75.
 52. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S., 2011, The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 1813(5): p. 878-88.
 53. Lio, D., Marino, V., Serauto, A., Gioia, V., Scola, L., Crivello, A., Forte, G., Colonna-Romano, G., Candore, G., and Caruso, C., 2002, Genotype frequencies of the +874T-->A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet.* 29(5): p. 371-4.
 54. Zhang, Y., Hayes, A., Pritchard, A., Thaker, U., Haque, M., Lemmon, H., Harris, J., Cumming, A., Lambert, J., Chartier-Harlin, M., St Clair, D., Iwatsubo, T., Mann, D., and Lendon, C., 2004, Interleukin-6 promoter polymorphism: risk and pathology of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 362(2): p. 99-102.
 55. Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J., Humphries, S., and Woo, P., 1998, The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 102(7): p. 1369-76.
 56. Turner, D., Grant, S., Yonan, N., Sheldon, S., Dyer, P., Sinnott, P., and Hutchinson, I., 1997, Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation.* 64(5): p. 776-9.

57. Heinrich, C., Müller, M., and Graeve, L., 2014, Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer: Heidelberg. p. 146, 654.
58. Lambda, O., 2009, Cytokine Genotyping Tray, Lot 4, 004, Online verfügbar unter: <http://www.onelambda.com/product-attachment.aspx?c1=biomarker-detection&c2=cytokine-genotyping&c3=11&c4=38&c5=106>, Zuletzt abgerufen im: August 2014.
59. Joyce, D. and Steer, J., 1996, IL-4, IL-10 and IFN-gamma have distinct, but interacting, effects on differentiation-induced changes in TNF-alpha and TNF receptor release by cultured human monocytes. *Cytokine*. 8(1): p. 49-57.
60. Oswald, I., Wynn, T., Sher, A., and James, S., 1992, Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(18): p. 8676-80.
61. Sankaran, D., Asderakis, A., Ashraf, S., Roberts, I., Short, C., Dyer, P., Sinnott, P., and Hutchinson, I., 1999, Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int*. 56(1): p. 281-8.
62. Hutchinson, I., Turner, D., Sankaran, D., Awad, M., Pravica, V., and Sinnott, P., 1998, Cytokine genotypes in allograft rejection: guidelines for immunosuppression. *Transplant Proc*. 30(8): p. 3991-2.
63. Demeter, J., Porzsoft, F., Ramisch, S., Schmidt, D., Schmid, M., and Messer, G., 1997, Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 97(1): p. 107-12.
64. Cunningham, L., Chapman, C., Dunstan, R., Bell, M., and Joske, D., 2003, Polymorphisms in the interleukin 10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 44(2): p. 251-5.
65. Franchimont, D., Martens, H., Hagelstein, M., Louis, E., Dewe, W., Chrousos, G., Belaiche, J., and Geenen, V., 1999, Tumor necrosis factor

- alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(8): p. 2834-9.
66. Van Bogaert, T., Vandevyver, S., Dejager, L., Van Hauwermeiren, F., Pinheiro, I., Petta, I., Engblom, D., Kleyman, A., Schutz, G., Tuckermann, J., and Libert, C., 2011, Tumor necrosis factor inhibits glucocorticoid receptor function in mice: a strong signal toward lethal shock. *J Biol Chem.* 286(30): p. 26555-67.
67. Anscher, M., Peters, W., Reisenbichler, H., Petros, W., and Jirtle, R., 1993, Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 328(22): p. 1592-8.
68. Awad, M., El-Gamel, A., Hasleton, P., Turner, D., Sinnott, P., and Hutchinson, I., 1998, Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation.* 66(8): p. 1014-20.
69. Hussein, Y., Ahmad, A., Ibrahim, M., El Tarhouny, S., Shalaby, S., Elshal, A., and El Said, M., 2009, Interferon gamma gene polymorphism as a biochemical marker in Egyptian atopic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 19(4): p. 292-8.
70. Baumgartner, S., 2000, Tumor necrosis factor inactivation in the management of rheumatoid arthritis. *South Med J.* 93(8): p. 753-9.
71. Kremer, J., Fleischmann, R., and J., B., 2009, Tocilizumab inhibits structural joint damage, improves physical function, and increases DAS28 remission rates in RA patients who respond inadequately to methotrexate: the LITHE study *Ann Rheum Dis* 2009. 68(Suppl 3): p. 122.
72. van Horssen, R., Ten Hagen, T., and Eggermont, A., 2006, TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist.* 11(4): p. 397-408.

73. Ferrantini, M., Capone, I., and Belardelli, F., 2007, Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie*. 89(6-7): p. 884-93.
74. Cheever, M., Thompson, J., Peace, D., and Greenberg, P., 1986, Potential uses of interleukin 2 in cancer therapy. *Immunobiology*. 172(3-5): p. 365-82.
75. Bruhn, H., Fölsch, U., Kneba, M., and Löffler, H., 2004, Onkologische Therapie. Schattauer: Stuttgart. p. 125-7.
76. Aringer, M., Feierl, E., and Smolen, J., 2008, Cytokine blockade - a promising therapeutic option in SLE. *Z Rheumatol*. 67(4): p. 315-7.
77. Jaeckel, E., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Santantonio, T., Mayer, J., Zankel, M., Pastore, G., Dietrich, M., Trautwein, C., and Manns, M., 2001, Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med*. 345(20): p. 1452-7.
78. McHutchison, J. and Fried, M., 2003, Current therapy for hepatitis C: pegylated interferon and ribavirin. *Clin Liver Dis*. 7(1): p. 149-61.
79. Kirkwood, J., Strawderman, M., Ernstoff, M., Smith, T., Borden, E., and Blum, R., 1996, Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*. 14(1): p. 7-17.
80. Group, T.I.M.S.S., 1993, Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*. 43(4): p. 655-61.
81. Mullis, K. and Faloona, F., 1987, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*. 155: p. 335-550.
82. Lawyer, F., Stoffel, S., Saiki, R., Chang, S., Landre, P., Abramson, R., and Gelfand, D., 1993, High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl*. 2(4): p. 275-87.

83. Perrey, C., Turner, S., Pravica, V., Howell, W., and Hutchinson, I., 1999, ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transpl Immunol.* 7(2): p. 127-8.
84. Adkins, S. and Burmeister, M., 1996, Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem.* 240(1): p. 17-23.
85. Perrey, C., Pravica, V., Sinnott, P., and Hutchinson, I., 1998, Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol.* 6(3): p. 193-7.
86. Cox, E., Hoffmann, S., DiMercurio, B., Wesley, R., Harlan, D., Kirk, A., and Blair, P., 2001, Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation.* 72(4): p. 720-6.
87. Sobti, R., Berhane, N., Mahedi, S., Kler, R., Hosseini, S., Kuttiat, V., and Wanchu, A., 2010, Polymorphisms of IL-6 174 G/C, IL-10 -592 C/A and risk of HIV/AIDS among North Indian population. *Mol Cell Biochem.* 337(1-2): p. 145-52.
88. Schultz, K., Bowman, W., Aledo, A., Slayton, W., Sather, H., Devidas, M., Wang, C., Davies, S., Gaynon, P., Trigg, M., Rutledge, R., Burden, L., Jorstad, D., Carroll, A., Heerema, N., Winick, N., Borowitz, M., Hunger, S., Carroll, W., and Camitta, B., 2009, Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol.* 27(31): p. 5175-81.
89. Ottmann, O. and Pfeifer, H., 2009, Management of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program:* p. 371-81.
90. Schrappe, M., Reiter, A., Ludwig, W., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., Kornhuber, B., Ritter, J., Welte, K., Gadner, H., and Riehm, H., 2000, Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite

- reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*. 95(11): p. 3310-22.
91. Shuster, J., Wacker, P., Pullen, J., Humbert, J., Land, V., Mahoney, D., Jr., Lauer, S., Look, A., Borowitz, M., Carroll, A., and Camitta, B., 1998, Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 16(8): p. 2854-63.
 92. Pui, C., Boyett, J., Relling, M., Harrison, P., Rivera, G., Behm, F., Sandlund, J., Ribeiro, R., Rubnitz, J., Gajjar, A., and Evans, W., 1999, Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 17(3): p. 818-24.
 93. Chessells, J., Hall, E., Prentice, H., Durrant, J., Bailey, C., and Richards, S., 1998, The impact of age on outcome in lymphoblastic leukaemia; MRC UKALL X and XA compared: a report from the MRC Paediatric and Adult Working Parties. *Leukemia*. 12(4): p. 463-73.
 94. Sary, J., Kobyłka, P., Sedlacek, P., Komrska, V., Vavra, V., Syručkova, Z., Smisek, P., Hrubá, A., Korinková, P., Matejková, E., Cukrova, V., Doležalová, L., Loudová, M., Sejkorová, J., and Kvech, J., 1998, Allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells in the treatment of children with high-risk acute leukemia. *Cas Lek Cesk*. 137(12): p. 363-7.
 95. Lauten, M., Moricke, A., Beier, R., Zimmermann, M., Stanulla, M., Meissner, B., Odenwald, E., Attarbaschi, A., Niemeyer, C., Niggli, F., Riehm, H., and Schrappe, M., 2012, Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. *Haematologica*. 97(7): p. 1048-56.
 96. Kebelmann-Betzing, C., Korner, G., Badiali, L., Buchwald, D., Moricke, A., Korte, A., Kochling, J., Wu, S., Kappelmeier, D., Oettel, K., Henze, G., and Seeger, K., 2001, Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of

- bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all. *Cytokine*. 13(1): p. 39-50.
97. Reiter, A., Schrappe, M., Ludwig, W., Hiddemann, W., Sauter, S., Henze, G., Zimmermann, M., Lampert, F., Havers, W., Niethammer, D., and et al., 1994, Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood*. 84(9): p. 3122-33.
98. Lauten, M., Matthias, T., Stanulla, M., Beger, C., Welte, K., and Schrappe, M., 2002, Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia*. 16(8): p. 1437-42.
99. Zhao, H., Chen, Y., Lin, X., Zhong, X., Zhong, L., Ou, R., Jiang, W., and Guan, Z., 2003, Relationship between tumor necrosis factor genetic polymorphisms and acute lymphocytic leukemia. *Ai Zheng*. 22(8): p. 861-6.
100. Takeuchi, S., Takeuchi, N., Tsukasaki, K., Bartram, C., Zimmermann, M., Schrappe, M., Taguchi, H., and Koefler, H., 2002, Genetic polymorphisms in the tumour necrosis factor locus in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 119(4): p. 985-7.
101. Cardoso, A., Schultze, J., Boussiotis, V., Freeman, G., Seamon, M., Laszlo, S., Billet, A., Sallan, S., Gribben, J., and Nadler, L., 1996, Pre-B acute lymphoblastic leukemia cells may induce T-cell anergy to alloantigen. *Blood*. 88(1): p. 41-8.
102. Wu, S., Gessner, R., von Stackelberg, A., Kirchner, R., Henze, G., and Seeger, K., 2005, Cytokine/cytokine receptor gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: correlation of expression and clinical outcome at first disease recurrence. *Cancer*. 103(5): p. 1054-63.
103. Luczynski, W., Stasiak-Barmuta, A., Ilendo, E., Kovalchuk, O., Krawczuk-Rybak, M., Malinowska, I., Mitura-Lesiuk, M., Chyczewski, L., Matysiak, M., Kowalczyk, J., and Jaworowski, R., 2006, Low expression of costimulatory molecules and mRNA for cytokines are important

- mechanisms of immunosuppression in acute lymphoblastic leukemia in children? *Neoplasma*. 53(4): p. 301-4.
104. Wilson, A., 1999, Genetics of tumour necrosis factor (TNF) in autoimmune liver diseases: red hot or red herring? *J Hepatol*. 30(2): p. 331-3.
 105. Schulz, U., Munker, R., Ertl, B., Holler, E., and Kolb, H.J., 2001, Different types of human leukemias express the message for TNF-alpha and interleukin-10. *Eur J Med Res*. 6(8): p. 359-63.
 106. Klein, B., Lu, Z., Gu, Z.J., Costes, V., Jourdan, M., and Rossi, J., 1999, Interleukin-10 and Gp130 cytokines in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 34(1-2): p. 63-70.
 107. Chenjiao, Y., Zili, F., Haibin, C., Ying, L., Sheng, X., Lihua, H., and Wei, D., 2013, IL-10 promoter polymorphisms affect IL-10 production and associate with susceptibility to acute myeloid leukemia. *Pharmazie*. 68(3): p. 201-6.
 108. de Deus, D., Lugo, K., and Muniz, M., 2012, Influence of IL10 (G1082A) and TNFalpha (G308A) Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with ALL. *Leuk Res Treatment*. 2012: p. 1-6.
 109. Bachman, K. and Park, B., 2005, Duel nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr Opin Oncol*. 17(1): p. 49-54.
 110. Derynck, R., Akhurst, R., and Balmain, A., 2001, TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 29(2): p. 117-29.
 111. Luwor, R., Kaye, A., and Zhu, H., 2008, Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and brain tumours. *J Clin Neurosci*. 15(8): p. 845-55.
 112. Massague, J., 2008, TGFbeta in Cancer. *Cell*. 134(2): p. 215-30.
 113. Wojtowicz-Praga, S., 1997, Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J Immunother*. 20(3): p. 165-77.
 114. Lippitz, B., 2013, Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol*. 14(6): p. 218-28.

115. Wiegering, V., Schlegel, P., and Winkler, B., 2012, Immune function in newly diagnosed children with malignancy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 34(7): p. 559-64.
116. Park, J., Park, M., Park, H., Ha, J., Kim, S.J., and Ahn, C., 2004, TNF-alpha and TGF-beta1 gene polymorphisms and renal allograft rejection in Koreans. *Tissue Antigens.* 64(6): p. 660-6.
117. Shah, R., Selby, S., Yokley, B., Slack, R., Hurley, C., and Posch, P., 2009, TNF, LTA and TGFB1 genotype distributions among acute graft-vs-host disease subsets after HLA-matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. *Tissue Antigens.* 74(1): p. 50-6.
118. Sheen, Y., Kim, M., Park, S., Park, S., and Nam, J., 2013, Targeting the Transforming Growth Factor-beta Signaling in Cancer Therapy. *Biomol Ther (Seoul).* 21(5): p. 323-31.
119. Dai, L., Gast, A., Horska, A., Schrappe, M., Bartram, C., Hemminki, K., Kumar, R., and Bermejo, J., 2009, A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF-beta and receptor genes. *Pediatr Blood Cancer.* 52(7): p. 819-23.
120. Omrani, M., Taghipour-Bazargani, S., Salari-Lak, S., and Bagheri, M., 2009, Association of codon 10 polymorphism of the transforming growth factor beta 1 gene with prostate cancer and hyperplasia in an Iranian population. *Urol Int.* 83(3): p. 329-32.
121. Galon, J., Angell, H., Bedognetti, D., and Marincola, F., 2013, The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity.* 39(1): p. 11-26.
122. Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X., and Achong, M., 1998, IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 101(2): p. 311-20.
123. Fayad, L., Cabanillas, F., Talpaz, M., McLaughlin, P., and Kurzrock, R., 1998, High serum interleukin-6 levels correlate with a shorter failure-free survival in indolent lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 30(5-6): p. 563-71.

124. Fayad, L., Keating, M., Reuben, J., O'Brien, S., Lee, B.N., Lerner, S., and Kurzrock, R., 2001, Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*. 97(1): p. 256-63.
125. Berek, J., Chung, C., Kaldi, K., Watson, J., Knox, R., and Martinez-Maza, O., 1991, Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 164(4): p. 1038-43.
126. Zhang, G. and Adachi, I., 1999, Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res*. 19(2B): p. 1427-32.
127. Belluco, C., Nitti, D., Frantz, M., Toppan, P., Basso, D., Plebani, M., Lise, M., and Jessup, J.M., 2000, Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 7(2): p. 133-8.
128. Bachelot, T., Ray-Coquard, I., Menetrier-Caux, C., Rastkha, M., Duc, A., and Blay, J., 2003, Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer*. 88(11): p. 1721-6.
129. Cussigh, A., Falletti, E., Fabris, C., Bitetto, D., Cmet, S., Fontanini, E., Bignulin, S., Fornasiere, E., Fumolo, E., Minisini, R., Pirisi, M., and Toniutto, P., 2011, Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C. *Immunogenetics*. 63(1): p. 33-41.
130. Oldford, S., Robb, J., Codner, D., Gadag, V., Watson, P., and Drover, S., 2006, Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol*. 18(11): p. 1591-602.
131. Fridman, W., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J., 2012, The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 12(4): p. 298-306.

132. Liu, F., Li, B., Wei, Y., Chen, X., Ma, Y., Yan, L., Wen, T., Xu, M., Wang, W., and Yang, J., 2011, IFN-gamma+874 A/T polymorphism and cancer risk: an updated analysis based on 32 case-control studies. *Cytokine*. 56(2): p. 200-7.
133. Mi, Y., Yu, Q., Xu, B., Zhang, L., Min, Z., Hua, L., Feng, N., and Yao, Y., 2011, Interferon gamma +874 T/A polymorphism contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis based on 17 case-control studies. *Mol Biol Rep*. 38(7): p. 4461-7.
134. Ge, Y., Wang, Y., Xu, Z., Xu, L., Wang, Y., Gu, M., Ding, A., Zhu, X., Wu, R., Li, W., Xu, Y., and Jia, R., 2014, Lack of association between interferon gamma +874 T/A polymorphism and cancer risk: an updated meta-analysis. *Tumour Biol*.
135. Cloppenborg, T., Stanulla, M., Zimmermann, M., Schrappe, M., Welte, K., and Klein, C., 2005, Immunosurveillance of childhood ALL: polymorphic interferon-gamma alleles are associated with age at diagnosis and clinical risk groups. *Leukemia*. 19(1): p. 44-8.

Danksagung

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

Einen besonderen Dank möchte ich Professor Dr. Paul-Gerhardt Schlegel aussprechen, der mir nicht nur die Bereitstellung der technischen und materiellen Voraussetzungen ermöglicht hat, sondern auch als mein Supervisor der Graduate School of Life Sciences Würzburg mit konstruktiven Anregungen zur kritischen Diskussion geholfen hat.

In besonderer Weise möchte ich mich bei Frau Dr. Verena Wiegering für die stetige Unterstützung während der Laborarbeit und der Erstellung der Arbeit, trotz fordernden Klinikalltags, bedanken. Ohne ihre Unterstützung, große Geduld, vertrauensvolle sowie offene Umgangsweise und ihre zahlreichen Vorarbeiten wäre meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich ebenso bei Frau Dr. Beate Winkler für die gemeinsame Ausarbeitung des Themas und die Möglichkeit, eine Famulatur in der Onkologischen Tagesklinik der Universitäts-Kinderklinik Würzburg zu absolvieren.

Weiterhin möchte ich mich bei der medizinisch-technischen Assistentin Frau Barbara Bünting bedanken, die durch ihre geduldige Hilfe bei allen praktischen Arbeiten mir nicht nur den Anfang der experimentellen Phase erleichtert hat.

Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Imme Haubitz für ihr Hilfe bei der statistischen Auswertung und ihre besonnene Hilfestellung bei Fragen jeglicher Art.

Zuletzt und ganz besonders danke ich meiner Familie für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre fortwährende Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation *Zytokingenpolymorphismen bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie* eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 21. Januar 2016

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled *Genetic cytokine polymorphism in children with acute lymphoblastic leukaemia* is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Würzburg, 21st January 2016
