

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

Der Immunstatus bei Kindern mit Hirntumoren

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jens Niklas Hachenberg

aus Magdeburg

Würzburg, Oktober 2017

Referent: Prof. Dr. Paul-Gerhardt Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Herrmann

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2018

Der Promovend ist Arzt.

*Meiner Familie gewidmet.*

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	WHO-Klassifikation der Hirntumore .....	2
1.2.	Gliome mit niedriger Malignität.....	3
1.3.	Gliome mit hoher Malignität und Ponsgliome .....	5
1.4.	Medulloblastome und primitive neuroektodermale Tumoren .....	6
1.5.	Sonstige Hirntumore .....	9
1.5.1.	Ependymome .....	9
1.5.2.	Craniopharyngeome .....	9
1.5.3.	Keimzelltumoren.....	9
1.5.4.	Plexustumoren.....	10
1.5.5.	Meningeome.....	10
1.5.6.	Neurocytome .....	10
1.6.	Symptome .....	10
1.7.	Histiogenese.....	13
1.8.	Das Immunsystem.....	14
1.8.1.	Allgemeine Übersicht über das Immunsystem .....	14
1.8.2.	Lymphozyten .....	14
1.8.3.	Das Cluster of Differentiation System .....	15
1.8.4.	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	15
1.8.5.	Transforming growth factor- $\beta$ .....	16
1.8.6.	Interferon- $\gamma$ .....	17
1.8.7.	Interleukine.....	18
1.8.8.	Tumorimmunität.....	18
1.9.	Gen-Polymorphismen .....	19
1.9.1.	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	19
1.9.2.	Interleukin-6.....	19
1.9.3.	Interferon- $\gamma$ .....	20
1.9.4.	Transforming Growth Factor- $\beta_1$ .....	21
1.9.5.	Interleukin-10.....	22
1.10.	Ziel der Arbeit.....	23
2.	Material und Methoden .....	24
2.1.	Patienten .....	24
2.1.1.	Einschlusskriterien der Patienten und Ethikvotum .....	24
2.1.2.	Blutentnahme .....	24

## Inhaltsverzeichnis

2.1.3.	Patientenkollektiv.....	24
2.1.4.	Klinische Daten.....	25
2.2.	Methoden .....	26
2.2.1.	Isolierung der Desoxyribonukleinsäure .....	26
2.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion.....	27
2.2.3.	Polymorphismen.....	28
2.2.4.	Elektrophorese .....	29
2.2.5.	Färbung der Oberflächenmarker-FACS-Isolierung der Peripheral Blood Mononuclear Cells .....	30
2.2.6.	Anfertigung des Cytokinmediums .....	32
2.2.7.	In vitro-Stimulation T-Lymphozyten.....	32
2.2.8.	Intra-und extrazelluläre Zellfärbung .....	33
2.2.9.	Grundlagen Durchflusszytometrie.....	34
2.2.10.	Gating.....	36
2.3.	Materialien.....	48
2.3.1.	Feinchemikalien, Puffer und sonstige Reagenzien und Materialien .....	48
2.3.2.	Antikörper.....	49
2.3.3.	Geräte und Materialien .....	51
2.3.4.	Software .....	52
3.	Ergebnisse.....	53
3.1.	Klinische Charakteristika.....	53
3.1.1.	Studienkohorte .....	53
3.1.2.	Rezidiv.....	53
3.2.	Cytokin Gen-Polymorphismen .....	54
3.2.1.	Vergleich der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung.....	55
3.2.2.	Vergleich der Allelfrequenzen aller Hirntumorpatienten mit der Normalbevölkerung.....	57
3.2.3.	Vergleich der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung.....	59
3.2.4.	Vergleich Allelfrequenzen der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung.....	61
3.2.5.	Vergleich der LGG-Patienten mit der Normalbevölkerung .....	63
3.2.6.	Vergleich Allelfrequenzen der LGG-Patienten mit der Normalbevölkerung.....	65
3.3.	Einfluss der Polymorphismen auf die Prognose.....	66

## Inhaltsverzeichnis

3.3.1.	Alle Hirntumorpatienten: Unterschied in der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen bei Patienten mit und ohne Rezidiv .....	66
3.3.2.	Medulloblastompatienten: Unterschied in der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen bei Patienten mit und ohne Rezidiv .....	68
3.3.3.	LGG-Patienten: Unterschied in der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen bei Patienten mit und ohne Rezidiv .....	69
3.4.	Einfluss der Polymorphismen auf das Event-Free-Survival – Kaplan-Meier-Analyse.....	70
3.4.1.	Alle Hirntumorpatienten: TNF- $\alpha$ und Rezidiv .....	71
3.4.2.	Alle Hirntumorpatienten: TGF- $\beta_1$ (10) und Rezidiv .....	72
3.4.3.	Alle Hirntumorpatienten: IL-10 (-592/ -819) und Rezidiv .....	73
3.4.4.	Medulloblastompatienten: IL-10 (-1082) und Rezidiv .....	74
3.4.5.	LGG-Patienten: TGF- $\beta_1$ (-10) und Rezidiv .....	75
3.4.6.	LGG-Patienten: IFN- $\gamma$ und Rezidiv.....	76
3.5.	FACS-Daten Vergleich mit Normalbevölkerung .....	77
3.5.1.	Alle HIT: FACS-Daten Vergleich mit Normalbevölkerung.....	77
3.5.2.	Medulloblastompatienten: FACS-Daten Vergleich mit Normalbevölkerung.....	84
3.5.3.	LGG: FACS-Daten Vergleich mit Normalbevölkerung.....	91
4.	Diskussion .....	96
4.1.	TNF- $\alpha$ .....	96
4.2.	Interferon- $\gamma$ .....	99
4.3.	TGF- $\beta$ .....	101
4.4.	IL-10 .....	103
4.5.	IL-6 .....	105
4.6.	IL-4 .....	107
5.	Zusammenfassung .....	109
6.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	111
	Literaturverzeichnis	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

## Abkürzungsverzeichnis

B-ALL	B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CD	Cluster of Differentiation
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFS	Event-free-Survival
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorting
FSC	Forward-Scatter
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HGG	Höhergradige Gliome, High-Grade-Glioma
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
LGG	Niedriggradige Gliome, Low-Grade-Glioma
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NKZ	Natural Killer-Zellen
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNET	Primitive neuroektodermale Tumoren
PRR	Pattern-Recognition-Receptor
SSC	Sideward-Scatter

## Abkürzungsverzeichnis

SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TH	T-Helferzellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1. Einleitung

Die moderne Medizin sieht sich stetig steigenden Herausforderungen gegenübergestellt. Krebs hat sich in Europa, Nordamerika und Australien neben Herz-Kreislaufkrankungen und Demenz als eine der gesellschaftlich bedeutendsten Krankheiten des 21. Jahrhunderts etabliert. EU-weit wurde 2008 bei 2.45 Millionen Menschen die Diagnose Krebs festgestellt. 1.23 Millionen Menschen starben im selben Jahr an malignen Erkrankungen. Die daraus resultierenden Kosten betragen im Jahr 2009 insgesamt 126 Milliarden €, wobei hiervon 40% oder 51 Milliarden € auf die direkte Patientenversorgung entfielen (Luengo-Fernandez et al. 2013). Die im Vergleich mit dem Erwachsenenalter seltener auftretenden Krebserkrankungen im Kindesalter sind ein besonders sensibles und emotionales Thema.

Nach den onkologischen Erkrankungen des leukämischen Formkreises sind intrakranielle Neubildungen mit ca. 20% die zweithäufigste Gruppe maligner Erkrankungen im Kindesalter. Die jährliche Inzidenz beträgt nach Schätzungen zwischen 2-4 Neuerkrankungen / 100 000 (Kleihues et al. 1993, Keene et al. 1999, Mehta et al. 2002).

Im Gegensatz zu neoplastischen Neubildungen des zentralen Nervensystems im Erwachsenenalter, welche am häufigsten Hirnmetastasen anderer extrazerebraler Tumorerkrankungen sind, handelt es sich bei zerebralen Tumoren des Kindesalters um eigenständige Neubildungen (Keene et al. 1999, Mehta et al. 2002).

Die Ursachen für die Entwicklung von Hirntumoren bei Kindern sind nach wie vor nicht ausreichend bekannt. Während externe Faktoren wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielen, werden nach wie vor genetische Komponenten als wichtig anerkannt. Beispielhaft ist das vermehrte Auftreten von niedrig-gradigen Gliomen bei Patienten mit Neurofibromatose 1 zu nennen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Zusammenhang zwischen der immunologischen Situation des Patienten und der Entwicklung von onkologischen Erkrankungen.

## 1. Einleitung

### 1.1.WHO-Klassifikation der Hirntumore

Die Tumoren des zentralen Nervensystems sind eine polymorphe Gruppe, die nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden kann. Diese umfassen unter anderem die Lokalisation, die Histologie und die Dignität des Tumors. Der World Health Organization (WHO)-Klassifikation, die 1973 erstmals entwickelt und letztmalig 2007 in vierter Version aktualisiert wurde, liegt eine WHO-Resolution von 1956 zugrunde. Die damaligen Ziele sind auch bis heute aktuell: Entwicklung einer Klassifizierung und Graduierung von Tumoren, die weltweit einheitlich ist (Louis et al. 2007).

Die erste Version wurde 1979 publiziert und teilte die Tumoren des zentralen Nervensystems vor allem aufgrund ihrer histologischen Eigenschaften ein (Zulch 1980). Die zweite Version erschien 1993 und führte die neuen Erkenntnisse der Immunhistochemie in die Klassifizierung ein (Kleihues et al. 1993). In der dritten Version aus dem Jahr 2000 wurde die Klassifizierung der Tumoren hinsichtlich ihres genetischen Profils erweitert (Kleihues et al. 2000).

Die aktuelle Version der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems wurde 2007 publiziert. Es werden folgende Klassen unterschieden:

- Tumoren des neuroepithelialen Gewebes
- Tumoren der kranialen und paraspinalen Nerven
- Tumoren der Meningen
- Lymphome und hämatologische Neoplasien
- Keimzelltumoren
- Tumoren der Sellaregion
- Metastasen

Ein weiterer Aspekt der WHO-Klassifizierung der Tumoren des Zentralen Nervensystems ist das „WHO-Tumorgrading.“ Ziel ist es möglichst präzise das biologische Verhalten des Tumors zu prognostizieren und daran die bestmögliche Therapie auszuwählen. Verschiedene Tumorentitäten werden

## 1. Einleitung

hierbei unabhängig ihrer histologischen Charakteristika in vier Gruppen eingeteilt (Louis et al. 2007).

WHO I° bezeichnet Tumoren, die eine niedrige Proliferationsrate aufweisen und bei denen die Möglichkeit besteht, mit einer chirurgischen Entfernung eine Heilung zu bewirken. WHO II°-Tumoren sind generell infiltrativ wachsend und neigen zu Rezidiven, wobei sich einige auch zu höhergradigen Tumoren weiterentwickeln können. WHO III°-Tumore sind gekennzeichnet durch typische histologische Malignitätszeichen wie Kernatypien und erhöhte Mitoseraten. WHO IV°-Tumoren erfüllen zytologische Malignitätskriterien, sind mitotisch aktiv und können Nekrosen entwickeln (Louis et al. 2007).

**Tabelle 1:** WHO-Grading der Tumoren des zentralen Nervensystems

WHO-I°	Pilozytisches Astrozytom, Meningeom, Choroid Plexus Papillom, Craniopharyngeom
WHO-II°	Diffuses Astrozytom, Ependymom
WHO-III°	Anaplastisches Astrozytom, Choroid Plexus Carcinom, Anaplastisches Ependymom
WHO-IV°	Medulloblastom, Primitiv Neuroektodermaler Tumor (PNET), Glioblastom

Quelle: (Louis et al. 2007)

### 1.2. Gliome mit niedriger Malignität

30-40% der primären pädiatrischen Hirntumore sind Gliome des WHO-I° und II°, wobei das pilozystische („haarförmige“) Astrozytom I° wiederum allein 20% der pädiatrischen Hirntumore ausmacht (Kühl et al. 2006, Dougherty et al. 2010). In Deutschland werden jährlich ungefähr 170 Neuerkrankungen verzeichnet. Das Verhältnis zwischen Jungen und Mädchen ist 1,1 bis 1,2:1 (Kaatsch et al. 2001). Ihre Ursprungszellen sind Astrozyten und deren Vorläuferzellen, die durch das Markerprotein Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) gekennzeichnet sind (Pietsch et al. 1997). Im Gegensatz zu den diffusen Gliomen wachsen diese Hirntumore meistens umschrieben und langsam. Lokalisiert sind sie vor allem im Kleinhirn oder supratentoriell in der Mittellinie (Kühl et al. 2006).

## 1. Einleitung

Einen Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen und der Prognose der Patienten konnte im Gegensatz zu den Medulloblastomen bisher nicht hergestellt werden (Orr et al. 2002). Allerdings gibt es Erkrankungen wie die Neurofibromatose Typ 1 (NF1), bei der bis zu 20% der Erkrankten ein niedriggradiges Gliom (LGG) im Bereich der Sehbahn oder auch anderen Hirnregionen entwickeln (Listernick et al. 1997). Entscheidend hierbei ist, dass das genetische Produkt des NF1 Genes, Neurofibromin, herunterreguliert wird. Neurofibromin ist entscheidend für die neuronale Differenzierung der Astrozyten, indem es die Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) herabreguliert. Ein Verlust an Neurofibromin führt dementsprechend zu einer erhöhten Astrozytenproliferation. Diese Alteration konnte teilweise auch in sporadischen Astrozytomen beobachtet werden und scheint über die Neurofibromatose Typ 1 hinaus eine Bedeutung in der Genese von niedriggradigen Gliomen zu haben (Dunn et al. 1990, Listernick et al. 2007, Dubuc et al. 2010)

Die Therapie der Wahl niedriggradiger Gliome ist die komplette chirurgische Resektion. Auch Rezidive werden vorrangig operiert. Der Erfolg des Eingriffes, die R<sub>0</sub>-Resektion, ist abhängig von der Lokalisation. Im Bereich der Großhirnhemisphäre liegt die Erfolgsquote bei bis zu 90% und im Kleinhirnbereich bei 66-90%. Bei Tumoren, die in der supratentoriellen Mittellinie liegen, gelingt die R<sub>0</sub>-Resektion allerdings nur selten (Abdollahzadeh et al. 1994, Pollack et al. 1995, Sutton et al. 1995).

Eine Bestrahlung ist insbesondere für Patienten, bei denen eine komplette Resektion des Tumorgewebes nicht möglich war, relevant. Bei den Überlebensraten von Patienten, die direkt nach der Operation bestrahlt wurden gegenüber Patienten, die erst bei Progress des Tumors bestrahlt wurden, konnte keine statistische Differenz festgestellt werden (Fisher et al. 2001). Bei Kindern, die das dritte Lebensjahr noch nicht erreicht haben, wird aufgrund der höheren Nebenwirkungen der Bestrahlung mittels Chemotherapie versucht, die Zeit der Bestrahlung so weit wie möglich hinauszuzögern (Rutkowski et al. 2009).

### **1.3. Gliome mit hoher Malignität und Pongliome**

Pro Jahr werden in Deutschland bei Kindern und Jugendlichen ungefähr 100 diffus intrinsische Pongliome bzw. maligne Gliome diagnostiziert, was einer Häufigkeit von 0,5 bis 1 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern unter 15 Jahren entspricht. Die diffus intrinsischen Pongliome machen hierbei mit ca. 60 % den größeren Anteil aus (Kühl et al. 2006). Diese zeichnen sich durch eine sehr ungünstige Prognose aus.

1989 konnte in einer Beobachtungsstudie von 1977-1983 statistisch nachgewiesen werden, dass Röntgenstrahlen die Wahrscheinlichkeit einen Hirntumor zu entwickeln signifikant erhöhen. Andere exogene Faktoren wie beispielsweise Zigarettenrauch sind hingegen nicht mit einem erhöhten Risiko verbunden (Howe et al. 1989).

Wichtige histomorphologische Charakteristika der malignen Gliome sind zelluläre Anaplasien, mitotische und apoptotische Figuren, hohe Zelldichte, Angiogenese und Nekrosen (Kleihues et al. 2000).

Es wird angenommen, dass sich maligne Gliome in der Regel nicht aus gutartigen Gliomen entwickeln, sondern *de novo* aus anderen astroglialen Ursprungszellen (Kühl et al. 2006). Sie sind gekennzeichnet durch schnelles und infiltrierendes Wachstum. Eine chirurgische Resektion dieser Hirntumore ist kompliziert, da durch die Infiltrationsneigung auch makroskopisch unauffälliges Hirngewebe von Tumorzellen durchsetzt sein kann.

Eine Besonderheit stellen die Pongliome dar. Sie werden nach ihrem radiologischen Erscheinungsbild klassifiziert (Stroink et al. 1986).

Bislang ging man davon aus, dass eine radikale Operation das Überleben der Patienten nicht bedeutsam verlängert. Deswegen wurde bei Gliomen hoher Malignität die Indikation zur chirurgischen Behandlung zurückhaltend gestellt, um zusätzliche neurologische Ausfälle zu vermeiden (Frankel et al. 1958). Neuere Studien hingegen konnten einen Zusammenhang zwischen Radikalität der Tumorentfernung und des Langzeitüberlebens zeigen (Wolff et al. 1996).

#### **1.4. Medulloblastome und primitive neuroektodermale Tumoren**

Primitive neuroektodermale Tumoren (PNET) machen ca. 25% der Hirntumoren bei Kindern aus. Zu etwa 75% sind sie infratentoriell lokalisiert, gehen vom Kleinhirn und dem 4. Ventrikel aus und werden dort als Medulloblastom bezeichnet. Bei supratentorieller Lage ist die Bezeichnung stPNET üblich. stPNETs sind deutlich seltener als Medulloblastome (Kühl et al. 2006).

Die Altershäufung liegt im 5. Lebensjahr mit einer Tendenz 1,5:1 zum männlichen Geschlecht. Bei Diagnosestellung liegen bei einem Drittel der Patienten altersabhängig bereits ZNS-Metastasen vor und bei einem Viertel der Patienten können im Liquor bereits maligne Zellen nachgewiesen werden. Eine Besonderheit des Medulloblastoms ist, dass der Tumor in seltenen Fällen auch systemisch in andere Organsysteme metastasieren kann (Rutkowski 2012).

Das Staging der Tumoren erfolgt anhand der modifizierten Klassifikation von Chang, welche den Tumor auf Grundlage der Größe und des Ausmaßes des Befalls in T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub> einteilt (Harisiadis et al. 1977).

Histologisch wird gemäß den WHO-Leitlinien von 2007 zwischen dem klassischen Medulloblastom einerseits und den davon abzugrenzenden vier Subtypen andererseits unterschieden (Louis et al. 2007). Die Subtypen sind:

- Desmoplastisches/ Noduläres Medulloblastom
- Medulloblastom mit extensiver Nodularität
- Anaplastisches Medulloblastom
- Großzelliges Medulloblastom

Die Heilungsrate liegt bei ungefähr 60%. 10%-15% der Patienten versterben innerhalb von 2 Jahren (Polkinghorn et al. 2007).

Die Therapie besteht aus drei Hauptelementen. Eine neurochirurgische Resektion kann vital indiziert sein, wenn die Patienten aufgrund des Tumors eine kritische Hirndrucksymptomatik entwickeln. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass eine R<sub>0</sub>-Resektion mit einem besseren Überleben assoziiert ist. Resttumore mit

## 1. Einleitung

einem Durchmesser größer als 1,5cm sind mit einem signifikant schlechteren Outcome assoziiert (Zeltzer et al. 1999).

Kinder älter als 4 Jahre werden grundsätzlich mittels Radiotherapie behandelt. Bei Kindern jünger als 3 Jahre führt eine Bestrahlung des sich entwickelnden Gehirns zu starken neurokognitiven Defiziten. Bei dieser Patientengruppe wird deswegen versucht, die Radiotherapie mittels einer intensivierten Chemotherapie hinauszuzögern und somit die Spätschäden für die Patienten so gering wie möglich zu halten (Rutkowski et al. 2009).

Die aktuellen Leitlinien von 2012 empfehlen eine kombinierte Chemotherapie mit Nitrosharnstoffderivaten, Platinderivaten und Vincristin. Zur Hochdosis-Chemotherapie werden neben Carboplatin, Cyclophosphamid und Etoposid auch Busulfan, Melphalan und Thiotepa eingesetzt (Rutkowski 2012).

Ein großes Problem ist die Abschätzung der Prognose der Patienten. Bedeutsam ist hierbei der Nachweis von Tumor-Restgewebe nach der Primäroperation in der früh-postoperativen Magnetresonanztomographie (MRT) oder der Computertomographie (CT).

Bei 20-40 % der Patienten ohne Metastasierung bei Diagnosestellung und ohne nachweisbareres Resttumorgewebe nach der Primäroperation tritt ein Rezidiv auf (Wiegering et al. 2011). Vor allem eine Resistenz gegenüber einer Hochdosis Chemotherapie und der damit verbundenen Persistenz der Minimalen Resterkrankung (MRD) wird hierfür verantwortlich gemacht (Wiegering et al. 2011).

Ein Faktor hierbei ist der Verlust der Caspase 8-Expression. Möglicherweise werden dadurch wichtige apoptotische Signalwege blockiert und tragen zur Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika sowie der Bestrahlung entscheidend bei. Es konnte gezeigt werden, dass Medulloblastomzellen, in denen Interferon- $\gamma$  hochreguliert war, zu einer Expression von Caspase 8 führte und diese Zellen wiederum sensibel gegenüber einer Chemotherapie mit Cisplatin, Doxorubicin und Etoposide sowie einer Bestrahlung waren (Meister et al. 2007).

## 1. Einleitung

Bei einem Anteil an Patienten bleiben durch die Therapie verursachte Langzeitschäden bestehen, vor allem eine Leukenzephalopathie sowie kognitive und endokrinologische Defizite (Rood et al. 2004, Rutkowski et al. 2005).

## 1. Einleitung

### **1.5. Sonstige Hirntumore**

#### **1.5.1. Ependymome**

Ependymome haben einen neuroektodermalen Ursprung. Sie entstehen aus den Ependym-Zellen. Die WHO-Klassifikation von 2007 teilt sie in vier Unterformen ein: Subependymome Ependymome, myxopapilläre Ependymome, Ependymome II und anaplastische Ependymome (Louis et al. 2007). Sie machen 8-10 % aller kindlichen Hirntumore aus, wobei 25-40% der Patienten jünger als 3 Jahre alt sind. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit 50-64% eingeschätzt (Ries et al. 2000).

#### **1.5.2. Craniopharyngeome**

Craniopharyngeome sind gutartige Tumore, die sich vermutlich aus Überresten der Rathke-Tasche und des Ductus craniopharyngealis entwickeln. Sie sind weitaus häufiger bei Kindern als bei Erwachsenen und machen 6-13% der pädiatrischen Hirntumoren aus (Carmel et al. 1982, Bunin et al. 1998). Trotz ihrer benignen Dignität ergeben sich Schwierigkeiten in der Behandlung von Craniopharyngeomen, die sich vor allem aus der Tumorlokalisation ergeben. Craniopharyngeome sind in der Regel in der sellären oder suprasellären Region angesiedelt. Daraus ergibt sich eine räumliche Nähe zur Hypophyse, zum Chiasma opticum und Nervus opticus, dem dritten Ventrikel, den Kernen des Hypothalamus sowie den Gefäßen, die durch diese Region ziehen. Eine komplette Resektion des Tumors ohne schwerwiegende Schäden beim Patienten ist häufig nicht möglich. Es werden regelmäßig Rezidive beobachtet (Ali et al. 2014).

#### **1.5.3. Keimzelltumoren**

Intrazerebrale Keimzelltumore sind eine heterogene Gruppe, die nach der WHO-Klassifikation in folgende vier verschiedene Gruppen unterteilt werden: Germinome, Non-Germinome, Teratome und Mischtumoren (Louis et al. 2007). Bei Kindern machen sie etwa 3,3% aller malignen Hirntumoren bis zum 15. Lebensjahr aus (Schuz et al. 2002). Pro Jahr werden ungefähr 40 Neuerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland beobachtet,

## 1. Einleitung

wobei der Altersgipfel in der Pubertät liegt (Schuz et al. 2001). Die Langzeitprognose unterscheidet sich je nach Subgruppe und liegt zwischen 50-80% (Calaminus 2012).

### **1.5.4. Plexustumoren**

Tumoren des Plexus Choroideus machen ungefähr 0,4-0,6% aller pädiatrischen intrakraniellen Neoplasien aus. Sie entstammen dem Epithelium des Plexus Choroideus und werden in Plexus-Papillome und Plexus-Karzinome unterteilt. 80% aller Plexus Tumoren treten im Kindesalter auf. Der Verteilung ist 5:1 zu Gunsten der Plexus Papillomen (Rickert et al. 2001).

### **1.5.5. Meningeome**

Meningeome machen etwa 0,4-4,1% aller pädiatrischen Tumorerkrankungen aus. In einer Studie von 2005 konnte eine Tendenz aufgezeigt werden, dass sich bei Kindern häufiger atypische und maligne Meningeome manifestieren (Tufan et al. 2005). Nach der WHO-Klassifikation werden Meningeome in unterschiedliche Subtypen eingeteilt, die den WHO-Graden I bis III entsprechen (Louis et al. 2007).

### **1.5.6. Neurocytome**

Neurocytome sind vorwiegend in den lateralen und dritten, seltener auch im vierten Ventrikel lokalisiert (Adesina et al. 2010). Nach der WHO-Klassifikation entsprechen sie einem niedriggradigen Tumor des WHO-Grades II. (Louis et al. 2007). Die optimale Therapie umfasst die komplette Resektion des Tumorgewebes, wobei dies nur in ungefähr 50% aller Fälle möglich ist. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt zurzeit bei 91% (Kim et al. 2015).

## **1.6. Symptome**

Generell werden spezifische von unspezifischen Symptomen unterschieden. Bei den unspezifischen Symptomen handelt es sich vorwiegend um solche, die durch intrakranielle Drucksteigerung verursacht werden. Gründe für die intrakranielle Drucksteigerung sind vor allem die Tumormasse, peritumorale Ödeme und

## 1. Einleitung

Liquorzirkulationsstörungen mit konsekutiver Aufstauung. Spezifische Symptome zeichnen sich hingegen dadurch aus, dass sie Rückschlüsse auf die Lokalisation des Tumors zulassen. Spezifische Symptome werden deswegen auch „Lokalsymptome“ genannt (Keene et al. 1999).

Eine Schwierigkeit in der Diagnostik pädiatrischer Tumoren des zentralen Nervensystems resultiert aus der Tatsache, dass die Präsentation von Symptomen stark abhängig vom Alter des Patienten und der Lokalisation des Tumors ist. In Folge dessen ergeben sich mittlere Latenzzeiten hinsichtlich der Diagnostik von Hirntumoren von 2-2,5 Monaten. Bei malignen Tumoren ist die Diagnoselatenz kürzer (Therasse et al. 2000, Halperin et al. 2001, Dobrovoljac et al. 2002). Eine verlängerte Diagnoselatenz ist hingegen mit niedriggradigen Hirntumoren, Epilepsie, Wachstums- und endokrinologischen Störungen sowie einem Alter bei Diagnosestellung unter 3 Jahren assoziiert (Wilne et al. 2006).

Generell lassen sich bei 88% aller Kinder, die einen Hirntumoren haben und deswegen klinisch vorstellig werden, neurologische Symptome feststellen. Kopfschmerzen sind dabei bei 33-42% der Patienten das häufigste Symptom. Bei Kindern die 3 Jahre alt oder jünger sind beträgt der Anteil der sich mit Kopfschmerzen präsentierenden Patienten nur 12%. Bei Kindern unter 2 Jahren sind Kopfschmerzen nicht zu beobachten. Bei Patienten der Altersgruppe unter 3 Jahren ist auffälliges Verhalten weitaus häufiger zu beobachten (Wilne et al. 2006, Wilne et al. 2007).

**Tabelle 2:** Unspezifische Symptome bei Kindern mit Hirntumoren

<b>Unspezifische Symptome</b>	<b>Häufigkeit</b>
Kopfschmerzen	33-42%
Übelkeit und Erbrechen (insb. morgendliches Nüchternerebrechen)	12-32 %
Wesenveränderungen	10-27 %
Abnorme Zunahme des Kopfumfangs (bei Kinder < 2 Jahren)	32%

Quelle: (Kühl et al. 2006)

1. Einleitung

**Tabelle 3:** Spezifische Symptome bei Kindern mit Hirntumoren in Abhängigkeit von der Lokalisation

<b>Spezifische Symptome</b>	<b>Lokalisation</b>
Ataxie und Nystagmus	Kleinhirn, Hirnstamm und Kleinhirnbindearme, Rückenmark
Krampfanfälle	Kortikaler Sitz des Tumors oder sekundär in Folge Hirndrucksteigerung
Hirnnervenparesen	Lokalisierte Befunde oder Folge der Hirndrucksteigerung
Motorische Paresen	Motorische Kortexareale oder absteigende Bahnen (spastische Hemiparese), Rückenmark, Conus medullaris/Cauda equina
Sehstörungen (unilaterale, bilaterale, homonyme Hemianopsie; Sehnervenatrophie)	Unspezifisch bei länger bestehender Stauungspapille. V.a. bei Tumoren der Sellaregion
Sensorische und spezifische neuropsychologische Defizite (Aphasie, Gedächtnisstörungen)	Kortikal in spezifischen Hirnarealen.
Sensibilitätsstörungen	Thalamustumoren (Halbseitensymptomatik) oder spinale Tumoren (segmentale Symptomatik). Radikuläre Schmerzsyndrome bei spinalen extramedullären Tumoren oder spinaler Metastasierung.
Blasen-/Mastdarmlähmung	spinale Prozesse (primär und metastatisch)
Endokrinologische Ausfälle (v. a. Kleinwuchs, Diabetes insipidus)	Tumoren der Sellaregion, Kraniopharyngeom, Langerhans-Zell-Histiozytose
Diencephales Syndrom, Wesensveränderung, Essstörungen oder zunehmende Adipositas, Schlaf-Wach-Umkehr:	hypothalamische Tumoren

Quelle: (Kühl et al. 2006)

Weitere seltenere Symptome sind Gewichtsverlust, Wachstumsstörungen und Pubertas praecox (Wilne et al. 2007).

## 1. Einleitung

### 1.7. Histiogenese

Die Entstehung von Hirntumoren bei Kindern ist sporadisch. Es konnten keine eindeutigen exogenen Risikofaktoren identifiziert werden. Möglicherweise spielt die virale Genese eine Rolle. So konnte beispielsweise das Polyomavirus JC in Medulloblastomzellen oder SV40-Virusgenomanteile in Ependymomzellen nachgewiesen werden. Zum jetzigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass eine Kette von zufälligen genetischen Mutationsereignissen und die sich daraus ergebende Aktivierung von Protoonkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen häufig zum Entstehen von Hirntumoren führen. Die Relevanz von genetischen Faktoren wird gestützt durch bekannte Genmutationen wie Neurofibromatose Typ 1 (NF-1 Gen), bei denen ein signifikant höheres Vorkommen von pilozystischen Astrozytomen des N. opticus beobachtet wurde oder Familien mit adenomatöser Polyposis coli (APC-Gen), bei denen die Rate von Medulloblastomen deutlich erhöht sind (Kühl et al. 2006).

## 1. Einleitung

### 1.8. Das Immunsystem

#### 1.8.1. Allgemeine Übersicht über das Immunsystem

Das Immunsystem des menschlichen Körpers gliedert sich in zwei Teile auf. Zum einen das entwicklungsgeschichtlich ältere angeborene Immunsystem, welches mittels dendritischer Zellen, Makrophagen und neutrophiler Granulozyten eine schnelle Immunantwort auf eindringende Erreger generiert und über sogenannte Patter-Recognition-Receptor (PRR) arbeitet.

Zum anderen das adaptive Immunsystem, welches durch B- und T-Lymphozyten eine spezifischere Reaktion hervorruft (Iwasaki et al. 2010). Das angeborene und das adaptive Immunsystem sind allerdings nicht als voneinander losgelöst zu betrachten, sondern greifen vielmehr ineinander über. So erfolgt eine Reaktion des adaptiven Immunsystems in der Regel erst, wenn das angeborene Immunsystem aktiviert wurde (Alberts B 2002). Gegenstand dieser Arbeit sind insbesondere die T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems.

#### 1.8.2. Lymphozyten

Im menschlichen Körper gibt es ca.  $2 \times 10^{12}$  Lymphozyten. Lymphozyten werden im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark des erwachsenen Menschen bzw. in der Leber des Fetus gebildet. B-Lymphozyten maturieren auch weiterhin im Knochenmark heran wohingegen T-Lymphozyten im Thymus selektioniert werden. Das adaptive Immunsystem arbeitet mittels Antigen-Rezeptoren, die nicht in den Keimzellen des Organismus codiert sind, sondern *de novo* in jedem Individuum generiert werden (Iwasaki et al. 2010).

### 1.8.3. Das Cluster of Differentiation System

Im Jahr 1975 wurde die Hybridom-Technik von César Milstein und Georges Köhler entwickelt. Dies war der Ausgangspunkt für die Erforschung der monoklonalen Antikörper. Cluster of Differentiation (CD)-Moleküle charakterisieren die Zelloberflächen der verschiedenen Zellen des Körpers. Mit ihnen lassen sich Zellen immunphänotypisch unterscheiden. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit wichtige CD-Moleküle:

**Tabelle 4:** Immunphänotypisierung relevanter Zelltypen

Antigen	Spezifität
CD 3	Reife Thymocyten, periphere T-Lymphozyten
CD 4	T-Helferzellen, einige periphere Monocyten, Makrophagen und Langerhans Zellen
CD 8	Cytotoxische T-Lymphozyten, Natural Killer-Zellen (NKZ)
CD 16/ 56	Natural Killer-Zellen
CD 19	B-Lymphozyten (aber nicht Plasma Zellen)
CD 31	Vaskuläre Endothelzellen, Knochenmarkszellen, Zirkulierende Leukozyten
CD 45	Alle hämatopoetischen Zellen, außer Erythrozyten und Plasma Zellen
CD45RA	Naive T-Lymphozyten
CD45RO	Memory T-Lymphozyten
CD 127	T-Lymphozyten
$\alpha\beta$ TCR	T-Lymphozyten
$\gamma\delta$ TCR	T-Lymphozyten
HLA DR	B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, Langerhans Zellen, aktivierte T-Lymphozyten

Quelle: (Chan et al. 1988, Brooks et al. 1993, Behar et al. 1996, Altin et al. 1997, Holtmeier et al. 2005, Poli et al. 2009, Booth et al. 2010)

### 1.8.4. Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wurde erstmals als Faktor in der Induzierung von Nekrosen in soliden Tumoren erkannt (Carswell et al. 1975). Darüber hinaus beinhaltet seine biologische Kapazität viele verschiedene Prozesse wie die Initialisierung von Apoptose, Proliferation, Zellaktivierung und Inflammatorische Prozessen (Wajant et al. 2003).

## 1. Einleitung

Insbesondere in der T-Zell-Immunität spielt TNF- $\alpha$  eine bedeutende Rolle. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  insbesondere für folgende Prozesse essentiell ist:

Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Trevejo et al. 2001)

- T-Zell Priming (McDevitt et al. 2002)
- T-Zell Proliferation (Boyman et al. 2004)
- T-Zell Rekrutierung (Korner et al. 1997)
- Beseitigung von Pathogenen (Grivennikov et al. 2005)

Welche Funktion TNF- $\alpha$  in der Immunantwort einnimmt, scheint auch von dem jeweiligen sich präsentierenden Pathogen abhängig zu sein. Vor allem in der Antitumorimmunität spielt TNF- $\alpha$  eine bedeutende Rolle (Calzascia et al. 2007).

### **1.8.5. Transforming growth factor- $\beta$**

Der Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) wurde 1981 von Anita B. Roberts und Michael B. Sporn beschrieben (Roberts et al. 1981). Für den menschlichen Körper sind drei Subtypen von TGF- $\beta$  bekannt: TGF- $\beta$  1, 2 und 3 (Oh et al. 2013). TGF- $\beta$  fungiert vor allem über Serin-/ Threoninkinase-Rezeptoren. Wie beispielsweise Bone Morphogenetic Protein (BMP) wird TGF- $\beta$  zu den extrazellulären Wachstumsfaktoren gezählt (Holletz et al. 2006).

Nahezu jede Zelle des menschlichen Organismus produziert TGF- $\beta$  und hat Rezeptoren für das Cytokin. Durch TGF- $\beta$  werden unter anderem Proliferation und Zelldifferenzierung, Wundheilung und Angiogenese reguliert (Blobe et al. 2000).

Für das Immunsystem und insbesondere die T-Lymphozyten spielen vor allem folgende Effekte eine wichtige Rolle (Li et al. 2006):

- Reduzierung der T-Lymphozytenproliferation
- Inhibierung der T-Helferzellen 1 (TH1)- und T-Helferzellen 2 (TH2)-Lymphozytendifferenzierung

## 1. Einleitung

- Inhibierung der Proliferation und Differenzierung von CD8+ cytotoxischen T-Lymphozyten
- Regulierung des T-Lymphozyten Überlebens nach Aktivierung
- Regulierung der Aktivität von B-Lymphozyten
- Inhibierung von NK-Zellen und Regulation der zellulären Homöostase.
- Regulation der Entwicklung von dendritischen Zellen
- Stimulierung von inaktivierten Monozyten
- Inhibierung von aktivierten Makrophagen

TGF- $\beta$  reguliert und kontrolliert autoreaktive T-Lymphozyten (Oh et al. 2013). Durch seine suppressive Wirkung verhindert TGF- $\beta$  insbesondere die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten oder aber auch lymphoproliferative Erkrankungen (Li et al. 2006).

### **1.8.6. Interferon- $\gamma$**

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) wird hauptsächlich in TH1-Lymphozyten gebildet. Zusammen mit Interleukin 2 (IL-2) wirkt Interferon- $\gamma$  gegen primär intrazelluläre Pathogene. Es steigert die immunologische Potenz der Makrophagen, die dadurch in der Lage sind gegen die intrazellulären Viren, Bakterien und Parasiten zu wirken. Gleichzeitig inhibiert IFN- $\gamma$  die Aktivierung von TH2 - Lymphozyten durch IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und die konsekutive Aktivierung von B-Lymphozyten (Holletz et al. 2006).

## 1. Einleitung

### 1.8.7. Interleukine

**Tabelle 5:** Studienrelevante Interleukine und ihre Wirkung

	<b>Wirkung</b>	<b>Bemerkung</b>
Interleukin-2 (IL-2)	Bildung in TH1/ TH0-Lymphozyten Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten Steigerung Immunglobulinsynthese der B-Lymphozyten Aktivierung der NK-Zellen und Makrophagen	
Interleukin-4 (IL-4)	Proliferation und Differenzierung von TH2-Lymphozyten Induzieren Klassenswitch von IgM zu IgG und IgE	Antiinflammatorisch
Interleukin-5 (IL-5)	Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten und Eosinophilen	
Interleukin-10 (IL-10)	Supprimiert Aktivität von Makrophagen und TH1-Lymphozyten	Antiinflammatorisch
Interleukin 17A (IL-17a)	Wirkt proinflammatorisch durch Aktivierung von TH17-Lymphozyten	Proinflammatorisch

(Paul 1991, Choi et al. 1998, Holletz et al. 2006, Liao et al. 2011)

### 1.8.8. Tumormunität

Der menschliche Körper verfügt über verschiedene Abwehrmechanismen um die Entstehung von entarteten Zellen bzw. deren Persistenz und Ausbreitung im Körper zu unterbinden. Die meisten Tumorzellen exprimieren Antigene, die von CD8+ T-Lymphozyten erkannt werden. Um diese natürliche Blockade zu überbrücken geht man von zwei unterschiedlich zellulären Mechanismen aus. Tumoren, die von T-Lymphozyten infiltriert sind, aktivieren immunsuppressive Eigenschaften und unterdrücken somit eine adäquate Immunantwort. Tumoren, die nicht von T-Lymphozyten infiltriert sind, schwächen die Immunantwort durch Immunevasion ab (Gajewski et al. 2013).

2005 konnte von Pages et al. gezeigt werden, dass bei kolorektalen Tumoren die Infiltration von Tumorgewebe durch T-Zellen und konsekutive immunologische Prozesse mit einem verlängerten Überleben und einer verlängerten metastasefreien Zeit assoziiert sind (Pages et al. 2005). Es gibt Hinweise, dass das immunphenotypische Staging eine größere und bessere Aussage über die

## 1. Einleitung

Prognose der einzelnen Patienten erzielen kann als das klassische histopathologische Staging (Galon et al. 2006). Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem für die Entwicklung als auch die Prognose von Tumorerkrankungen generell sind.

### 1.9. Gen-Polymorphismen

#### 1.9.1. Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Die Plasma-Konzentration von TNF- $\alpha$  wird entscheidend vom Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) auf Position -308 beeinflusst. Es wird zwischen dem A-Allel, das mit einer hohen Plasma-Konzentration assoziiert ist, und dem G-Allel, das im Gegensatz dazu mit einer niedrigen Plasma-Konzentration von TNF- $\alpha$  assoziiert wird. Der Genotyp G/G ist dementsprechend mit einer niedrigen, die Genotypen A/G und A/A mit einer hohen TNF- $\alpha$  Produktion assoziiert (Hajeer et al. 2000).

**Tabelle 6:** TNF- $\alpha$  Polymorphismus

<b>Polymorphismus</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Phenotyp</b>
TNF- $\alpha$	G/G	Low
	A/G	High
	A/A	

#### 1.9.2. Interleukin-6

Der IL-6 Genpolymorphismus befindet sich auf Position -174. Es wird hierbei zwischen zwei Allelen unterschieden. Das G-Allel ist mit höheren IL-6-Plasma Levels assoziiert, wohingegen das C-Allel im Vergleich dazu niedrigere Werte aufwies. Der Genotyp C/C ist mit einer niedrigen, die Genotypen C/G und G/G mit einer hohen IL-6 Produktion assoziiert (Fishman et al. 1998).

**Tabelle 7:** IL-6 Polymorphismus

<b>Polymorphismus</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Phenotyp</b>
IL-6	C/C	Low
	C/G	High
	G/G	

## 1. Einleitung

### 1.9.3. Interferon- $\gamma$

Der IFN- $\gamma$  Polymorphismus ist auf Position +874 lokalisiert. Es werden drei sich phänotypisch unterscheidende Genotypen unterschieden. A/A ist mit einer niedrigen IFN- $\gamma$  Produktion, T/A mit einer intermediären und T/T mit einer hohen IFN- $\gamma$  Produktion assoziiert (Pravica et al. 2000).

**Tabelle 8:** IFN- $\gamma$  Polymorphismus

<b>Polymorphismus</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Phenotyp</b>
IFN- $\gamma$	A/A	Low
	T/A	Intermediate
	T/T	High

#### 1.9.4. Transforming Growth Factor- $\beta_1$

Der TGF- $\beta_1$ -Polymorphismus setzt sich aus zwei Genotypen zusammen. An Position +869 in Codon 10 sind zwei Allele auszumachen. Das T-Allel ist mit einer hohen TGF- $\beta$  Plasma-Produktion assoziiert, wohingegen das C-Allel mit dem Gegenteil, nämlich einer niedrigen Plasma-Produktion an TGF- $\beta$  in Verbindung gebracht wird (Peng et al. 2013).

Der zweite Genotyp, der ebenfalls die TGF- $\beta$ Konzentration beeinflusst, befindet sich an Position +915 in Codon 25. Hierbei wird zwischen dem G-Allel, assoziiert mit einer hohen TGF- $\beta$  Plasma-Produktion, und dem C-Allel, dem eine niedrige TGF- $\beta$  Plasma-Produktion zugeschrieben wird, unterschieden (Cambien et al. 1996, Awad et al. 1998).

Diese beiden Genotypen beeinflussen unabhängig voneinander den TGF- $\beta$  Plasma-Spiegel. Demzufolge ist eine maximale TGF- $\beta$  Produktion bei der Kombination T/T in der Position +869 und G/G in der Position +915 zu vermuten. Die übrigen Kombinationen resultieren dementsprechend in intermediären oder niedrigen TGF- $\beta$  Konzentrationen.

**Tabelle 9:** TGF- $\beta_1$ -Polymorphismus

<b>Polymorphismus</b>	<b>Genotyp</b>		<b>Phenotyp</b>
TGF- $\beta_1$ (-10)	C/C		Low
	T/C		Intermediate
	T/T		High
TGF- $\beta_1$ (-25)		C/C	Low
		G/C	Intermediate
		G/G	High
TGF- $\beta$ (gesamt)	C/C	C/C	Low
	C/C	G/C	
	T/C	C/C	
	T/T	C/C	
	C/C	G/G	Intermediate
	T/C	G/C	
	T/T	G/C	
	T/T	G/G	High
	T/C	G/G	

## 1. Einleitung

### 1.9.5. Interleukin-10

Die Plasma-Konzentration von IL-10 wird maßgeblich von drei SNP beeinflusst. Diese befinden sich an den Positionen -592, -819 und -1082.

An Position -592 werden die Allele C und A unterschieden, wobei das C-Allel mit einer hohen und das A-Allel mit einer niedrigen IL-10 Produktion assoziiert ist. An Position -819 können die Allele C und T ausgemacht werden. Das C-Allel ist wiederum mit einer hohen und das T-Allel mit einer niedrigen IL-10 Produktion assoziiert. Perrey et al. konnten 1999 zeigen, dass zwischen diesen beiden SNP eine gekoppelte Vererbung besteht, weswegen die SNP -592 und -819 in vorliegender Studie immer als Kombination dargestellt wurden (Perrey et al. 1999).

An Position -1082 unterscheidet man zwischen den Allelen G und A, wobei das G-Allel mit einer hohen und das A-Allel mit einer niedrigen IL-10 Produktion vergesellschaftet ist (Turner et al. 1997).

Die unterschiedlichen Kombinationen der drei SNP sind mit entsprechend hohen oder niedrigen IL-10 Plasma Konzentrationen assoziiert. Die möglichen Kombinationen sind in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10:** IL-10-Polymorphismus

<b>Polymorphismus</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Phenotyp</b>
IL-10	ACC/ACC	Low
	ACC/ATA	
	ATA/ATA	
	GCC/ACC	Intermediate
	GCC/ATA	
	GCC/GCC	High

### **1.10. Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Immunsystems in Form der T-Lymphozyten und insbesondere der Cytokine IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  auf die Entwicklung und die Prognose bei pädiatrischen Patienten mit Hirntumoren zu untersuchen. Unterschieden wurde hierbei auch zwischen benignen und malignen Entitäten. Die erste Nullhypothese war, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Genotypen und Phänotypen für die Cytokin Gen-Polymorphismus zwischen den einzelnen Studienpopulationen und einer gesunden Normalbevölkerung gibt. Als Alternativhypothese wurde postuliert, dass signifikante Unterschiede in der Verteilung der Genotypen und Phänotypen für die Cytokin Gen-Polymorphismus zwischen den einzelnen Studienpopulationen und einer gesunden Normalbevölkerung bestehen.

Die zweite Nullhypothese war, dass es keinen Unterschied hinsichtlich der in der Durchflusszytometrie gemessenen Ausschüttung von Cytokinen zwischen den Studienpopulationen und einer gesunden Vergleichskohorte gibt. Als Alternativhypothese für die in der Durchflusszytometrie erhobenen Daten wurde formuliert, dass signifikante Unterschiede hinsichtlich der gemessenen Ausschüttung von Cytokinen zwischen den Studienpopulationen und einer gesunden Vergleichskohorte existieren.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patienten**

#### **2.1.1. Einschlusskriterien der Patienten und Ethikvotum**

Eingeschlossen in die Studie wurden Patienten, die einen diagnostisch gesicherten Hirntumor entwickelt und zum Zeitpunkt der Erkrankung das 18. Lebensjahr noch nicht vollendet hatten. Die Patienten wurden sowohl mündlich als auch schriftlich über die Studie aufgeklärt. Diese Zustimmung der Patienten wurde schriftlich festgehalten. Bei Minderjährigkeit der Patienten wurde zusätzlich die Zustimmung der entsprechenden Erziehungsberechtigten eingeholt. Alle Patienten bzw. bei Minderjährigkeit der Probanden die entsprechenden Erziehungsberechtigten stimmten nach Aufklärung über die Studie im Sinne der Helsinki-Deklaration zu. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Würzburg genehmigt. Votum der Ethik-Kommission der Universität Würzburg: 183/12.

#### **2.1.2. Blutentnahme**

Die Blutentnahme zur Materialgewinnung erfolgt im Rahmen der medizinischen Betreuung der Patienten in der onkologischen Tagesklinik (Station „Leuchtturm“), Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg, Josef-Schneider –Str. 2, 97080 Würzburg. Falls die Indikation zur Blutentnahme bei einem Patienten gestellt wurde, entnahm man ein weiteres Heparin-Röhrchen. Die Patienten bzw. bei Minderjährigkeit die entsprechenden Erziehungsberechtigten wurden vollständig über den Zweck der zusätzlichen Blutentnahme aufgeklärt und stimmten dieser mittels Unterschrift auf einem Aufklärungsbogen zu. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle Patienten frei von Infektionen.

#### **2.1.3. Patientenkollektiv**

Insgesamt wurden 175 Patienten rekrutiert, die einen Hirntumor vor dem 18. Lebensjahr entwickelt hatten. Dieses Patientenkollektiv wurde in die Subgruppen „Niedriggradige Gliome“ (low-grade-glioma, LGG), „Medulloblastome“, „Höhergradige Gliome“ (high-grade-glioma, HGG), „Ependymome“ und „Sonstige

## 2. Material und Methoden

Hirntumore“ (Meningeome, Neurozytome, Kraniopharyngeom, Keimzelltumore, Plexuspapillome und Plexuscarzinome) unterteilt.

### **2.1.4. Klinische Daten**

Die klinischen Daten der Patienten wurden aus den letzten aktuellen Arztbriefen der Patienten entnommen. Alle Daten, die bis zum 15.04.2015 verfügbar waren, wurden dabei erfasst. Aufgenommen in die Tabelle wurden das Alter der Patienten, das Geschlecht, der Zeitpunkt der Blutentnahme (in Nachsorge, in Chemotherapie, in Radiatio), die Metastasierung (Ja/Nein), das Datum der Erstdiagnose, das Ende der Ersttherapie, das Ende der endgültigen Therapie, die Lokalisation des Tumors (Kleinhirn, Chiasma, Hypothalamus, Sehbahn, Großhirnhemisphäre, Medulla spinalis), ob eine Operation stattfand und falls ja, welcher Art die Operation war (Biopsie, Teilresektion, komplette Resektion), ob eine Bestrahlung (Ja/Nein) stattfand, ob eine Chemotherapie (Ja/Nein) gegeben wurde, ob ein Rezidiv bzw. ein Progress (Ja/Nein) des Tumors nach Ende der Ersttherapie auftrat und es möglicherweise sogar multiple Rezidive (Ja/Nein) gab, ob der Patient verstorben ist (Ja/Nein) und in welchem Status (complete Response, stable disease oder progressive disease) der Patient sich bei der letzten Vorstellung befand.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Isolierung der Desoxyribonukleinsäure

Die Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgte mit dem „GF-1 Blood DNA Extraction Kit“ (GeneOn). 200µl heparinisiertes Blut wurde mit Buffer „BB-Lösung“ gemixt und danach 20 µl Proteinase K hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe auf 65° erwärmt, um die optimale Arbeitstemperatur der Proteinase K zu erreichen um die DNA aus den Blutzellen zu isolieren. Nach 10 Minuten wurde 70% Ethanol der Probe hinzugefügt, um die Aktivität der Proteinase K zu unterbrechen. Die Probe wurde nun in eine Mini column titriert und für eine Minute bei 5000G zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die so erhaltene Probe mit 500µl „Washbuffer 1“ gemixt. Dieser Schritt wurde zweimal ausgeführt. Nach der 2. Zentrifugierung wurde anstatt der 500 µl „Washbuffer 1“ 500µl „Washbuffer 2“ hinzugefügt und ebenfalls wieder 1 Minute bei 5000G zentrifugiert. Nun wurden wiederum 500µl „Washbuffer 2“ mit der Probe vermengt und anschließenden 3 Minuten lang bei 14000G zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Probe 100µl „Solution buffer“ (Firmenname) hinzugefügt und für 2 Minuten stehen gelassen. Als letzten Schritt wurde nun die im „Solution buffer“ gelöste DNA in ein Eppendorf Röhrchen 1 Minute bei 5000G zentrifugiert. Die DNA wurde bei -20° C gelagert. (Quelle: [http://www.taq-dna.com/dna-aufreinigung-aus-blut\\_502.html](http://www.taq-dna.com/dna-aufreinigung-aus-blut_502.html))

### **2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können gezielt spezifische DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. Voraussetzung hierbei ist, dass die DNA-Sequenzen, die den entsprechenden DNA-Abschnitt einrahmen, bekannt sind. Essentiell hierbei sind sogenannte Primer, die an die jeweiligen DNA-Abschnitte binden und so die Amplifikation initiieren.

Die Menge an amplifizierter DNA wächst mit jedem Cyclus. Ein Cyclus umfasst dabei folgende Schritte:

#### **Denaturierung der DNA:**

Den Primern ist es nicht möglich an doppelsträngige DNA zu binden. Als erster Schritt muss demnach die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgebrochen werden. Dies wird durch ein Erhitzen der DNA auf 95-100°C erreicht.

#### **Primer-Anlagerung (Annealing):**

Die Probe wird schnell auf eine Temperatur von 55-65°C abgekühlt und für 30 Sekunden gehalten. Das schnelle Abkühlen soll die Rückbildung der Doppelhelix-Struktur verhindern. Bei 55-65°C können sich nun die Primer an ihre komplementären Einzelstrang-DNA Sequenz anlagern. Die Auswahl des Primers erfolgt spezifisch für den jeweils zu untersuchenden Genabschnitt.

#### **Primer-Verlängerung (Extension)**

Für die sogenannte Polymerisation ist eine hitzestabile Taq-Polymerase erforderlich. Sie entstammt dem thermophilen Bakterium *Thermophilusaquaticus* und hat ihre optimale Arbeitstemperatur bei 68-72°C. Die Taq-Polymerase setzt am 3'-Ende des Primers an und baut nun komplementär Nukleotide ein.

Nach 30-35 Cyclen ist die DNA-Menge auf  $10^5$  -  $10^{10}$  Kopien des zu amplifizierenden Genabschnittes angestiegen.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.3. Polymorphismen

Nach der DNA-Isolierung wurde eine PCR-Platte mit den entsprechenden Primer hergestellt. Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide, die den Ansatzpunkt für die DNA-Polymerasen markieren und so den Abschnitt der DNA, der vervielfältigt werden soll, bestimmen. Es wurden sequenzspezifische Primer verwendet, die nur an den einen oder anderen SNP binden (SSP-PCR).

**Tabelle 11: PCR Primer**

Gen	Spezifität	Position	Resultat
TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ promoter -308A	1G/3G/5G/7G/9G/11G	A
TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ promoter -308G	1F/3F/5F/7F/9F/11F	G
TGF- $\beta_1$	TGF- $\beta_1$ codon 10T	1E/3E/5E/7E/9E/11E	T
TGF- $\beta_1$	TGF- $\beta_1$ codon 10C	1D/3D/5D/7D/9D/11D	C
TGF- $\beta_1$	TGF- $\beta_1$ codon 25C	1C/3C/5C/7C/9C/11C	C
TGF- $\beta_1$	TGF- $\beta_1$ codon 25G	1B/3B/5B/7B/9B/11B	G
IL-10	IL-10 promoter -1082A, -819T	1A/3A/5A/7A/9A/11A	
IL-10	IL-10 promoter -1082G, -819C	2H/4H/6H/8H/10H/12H	
IL-10	IL-10 promoter -1082A, -819C	2G/4G/6G/8G/10G/12 G	
IL-10	IL-10 promoter -1082T, -819A	2F/4F/6F/8F/10F/12F	
IL-10	IL-10 promoter -1082C, -819C	2E/4E/6E/8E/10E/12E	
IL-6	IL-6 promoter -174C	2D/4D/6D/8D/10D/12D	C
IL-6	IL-6 promoter -174G	2C/4C/6C/8C/10C/12C	G
IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ intron +874T	2b/4B/6B/8B/10B/12B	T
IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ intron +874A	2A/4A/6A/8A/10A/12A	A

In einen Mastermix, der die für die PCR benötigten Nukleotide enthielt, wurde DNA hinzugefügt, dass pro PCR-Plattenfeld 8 $\mu$ l Mastermix, 1  $\mu$ l DNA-Isolat und 1  $\mu$ l Primer vorhanden waren. Bei 15 Feldern waren dies 15  $\mu$ l DNA-Isolat. Pro PCR-Platte wurden jeweils bis zu 6 verschiedene Patienten untersucht. Die PCR-Platte wurde mit einer PCR-Verschlussmatte versiegelt. Im Anschluss erfolgte nun die PCR.

#### 2.2.4. Elektrophorese

Mithilfe der Elektrophorese können die durch die PCR entstandenen Produkte nun auf einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Färbung erfolgt mittels Ethodiumbromid, welches unspezifisch an die DNA bindet und eine Sichtbarmachung der DNA Banden unter UV-Licht ermöglicht.

Protokoll: In eine Gelkammer wurde ein Agarose-Gel aufgetragen, das sich aus folgenden Stoffen zusammensetzte:

## 2. Material und Methoden

- 300 ml TAE - (Tris-Azetat-EDTA Puffer)
- 4,5 g Agarose

Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle für 5 Minuten erhitzt, Ethidiumbromid hinzugefügt und in die Gelkammer gegossen. Nach Abkühlung und Erstarren des Gels wurde die Kämme entfernt, die die einzelnen PCR-Proben mit 2µl Orange DNA LoadingDye gemixt und zentrifugiert und in die entsprechenden Kammern pipettiert. Anschließend wurde das Gel mit den Proben in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer transferiert. Zusätzlich zu den Patientenproben wurde eine 100 Basenpaar DNA-Leiter in eine Kammer gegeben. Mit Hilfe dieser Basenpaar-Leiter konnte die ungefähre Länge der Banden abgelesen werden.

In einer Elektrophorese werden nun die Banden voneinander getrennt. Es werden dabei folgende Parameter verwendet:

- 150 V
- 500 mA
- 100 W
- 60 Minuten

Die durch die Elektrophorese entstandenen Banden auf dem Agarosegel werden mittels Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) eingescannt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA, Version 2.1).

### **2.2.5. Färbung der Oberflächenmarker-FACS-Isolierung der Peripheral Blood Mononuclear Cells**

Von dem in einem Heparinröhrchen abgenommenen Blut des Patienten wurden 2ml in ein 15er Falcon mit 2ml PBS gegeben. Die mit PBS vermischte Probe wurde dann in einem separaten 15er Falcon auf 4ml Falcon geschichtet. In einer Zentrifuge wurde die Probe bei folgenden Parametern zentrifugiert:

- 20 °C
- 3R3 (Beschleunigung und Bremse je 3)
- 1300 RPM

## 2. Material und Methoden

- 20 min

Der entstandene Leukozytenring wurde dem Falcon entnommen und in ein drittes 15er Falcon umpipettiert. Das 3. Falcon wurde mit 10 ml PBS aufgefüllt und für 5 Minuten bei folgenden Parametern gewaschen:

- 20 °C
- 9R9 (Beschleunigung und Bremse je 9)
- 1500RPM
- 5min

Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit 1 ml PBS resuspendiert. 100µl des entstandenen Zellisolats wurden nun in 2 FACS-DIVA –Röhrchen pipettiert und dort mit folgenden Antikörpern vermischt:

**Tabelle 12:** Färbung der Oberflächenmarker

	FITC	PE	PerCP	APC	PE-Cy7	APC-H7	V450	V500
PBMC-Röhrchen 1	CD 31	αβ-TCR	CD 8	γδ-TCR	CD 16/CD 56	CD 4	CD 3	CD 45
PBMC-Röhrchen 2	CD 45 RO	CD 19	CD 8	CD 45 RA	CD 127	HLA DR	CD 3	CD 45

Nach dem Vermengen des Leukozytenisolats mit den Antikörpern wurden die Röhrchen gevortext und dann für 15 Minuten dunkel inkubiert. Anschließend wurden 2 ml PBS in die Röhrchen gegeben und die Probe nochmals für 5 Minuten „gewaschen.“ Der Überstand der Probe wurde verworfen und das Zellkonzentrat, das sich am Boden des Röhrchens gesammelt hatte, konnte nun mittels des FACS-Diva (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.) gemessen werden. Falls nötig, wurde das Zellisolat mit Parafilm abgedeckt und für maximal 24 Stunden bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

### **2.2.6. Anfertigung des Cytokinmediums**

Für die Stimulation der T-Lymphozyten wurde bei Cytokinmedium hergestellt, das aus folgenden Komponenten bestand:

50ml-Kulturmedium entsprachen:

- 1) 43 ml RPMI 1640 mit 2,0g/ l  $\text{NaCO}_3$
- 2) 5 ml Fetal Bovine Serum 10%
- 3) 500  $\mu\text{l}$  Penicillin/ Streptomycin 1%
- 4) 500  $\mu\text{l}$  200 mM L-Glutamin 1%
- 5) 500  $\mu\text{l}$  100 mM Na-Pyruvat 1%
- 6) 500 nicht essentielle Aminosäuren 1%

Das Medium wurde für maximal 3 Monate bei 4° C gelagert und danach verworfen.

### **2.2.7. In vitro-Stimulation T-Lymphozyten**

In einer 24 Well-Platte wurden pro Patient zwei Ansätze angefertigt. Diese bestanden aus 100  $\mu\text{l}$  des Heparinblutes und aus 900  $\mu\text{l}$  des Cytokinmediums. Um die Cytokinproduktion zu induzieren wurden sowohl 1  $\mu\text{l}$  nmol/ ml Ionomycin als auch 1  $\mu\text{l}$  Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in der Konzentration 10ng/ ml hinzugefügt. Um den Golgi- Apparat zu blockieren und damit den Transport der Cytokine aus der Zelle zu unterbinden, wurde dem Ansatz außerdem noch 1  $\mu\text{l}$  Brefeldin in der Konzentration 10 mg/ ml beigemischt.

Die Ansätze wurden 20 bis 26 Stunden bei 37° C inkubiert.

### 2.2.8. Intra-und extrazelluläre Zellfärbung

Die inkubierten Zellen wurden auf- und abpipetiert, resuspendiert und in ein 15er Flacon gefüllt und dieses mit 10 ml PBS aufgefüllt. In einer Zentrifuge wurde nun die Probe „gewaschen“, der Überstand verworfen und das verbleibende Zellkonzentrat mit PBS auf 400 µl aufgefüllt. Diese wurden nun zu jeweils 100 µl gleichmäßig in 4 FACS-Röhrchen verteilt und jedem FACS- Röhrchen bestimmte Antikörper hinzugegeben (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Übersicht über die intrazellulären Färbungen

	FITC	PE	PerCP	APC	PE- Cy7	APC- H7	V450	V500
Zytokine- Röhrchen 1	CD45 RO	/	/	/	/	CD 8	/	/
Zytokine- Röhrchen 2	/	/	CD 8	/	CD 16/ CD 56	CD 45 RO	CD 3	CD 19
Isoprobe CD 3 PerCP	/	/	CD 3	/	/	/	/	/
Isoprobe CD 3 V450	/	/	/	/	/	/	CD 3	/

Im Anschluss wurden die vier FACS-Röhrchen für 15 Minuten lang dunkel inkubiert. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mittels 4% Paraformaldehyd-Lösung (Medium A) und die erneute Inkubation der Proben für exakt 10 Minuten. Den Proben werden pro Röhrchen 2 ml PBs beigemischt und wiederum für 5 Minuten „gewaschen.“

Falls nötig, wurden die Proben an dieser Stelle mit Parafilm abgedeckt und für maximal 24 Stunden bei 4° C gelagert.

Nun erfolgte die intrazelluläre Färbung. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde Saponin (Medium B) verwendet und gleichzeitig den „Zytokin-Röhrchen 1 und 2“ folgenden Antikörper hinzugefügt:

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 14:** Übersicht über die intrazellulären Färbungen nach der Permeabilisierung

	FITC	PE	PerCP	APC	PE-Cy7	APC-H7	V450	V500
Cytokin-Röhrchen 1	/	TGF- $\beta$	/	TNF- $\alpha$	IL-2	/	IL-17a	IFN- $\gamma$
Cytokin-Röhrchen 2	IL-4	IL-5	/	IL-10	/	/	/	/

Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Proben in letztes Mal für 20 Minuten und bei 4° C dunkel inkubiert, anschließend noch einmal mit jeweils 2 ml PBS aufgefüllt, 5 Minuten lang „gewaschen“ und der entstehende Überstand abgekippt.

### 2.2.9. Grundlagen Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine labormedizinische optische Messmethode. Einzelne Fluoreszenz-markierte Zellen werden in einem Fluorescence-activated-cell-sorting (FACS)-Gerät gemessen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen hinsichtlich ihrer Größe, ihrer Granularität und der Struktur ihres Zellkerns unterscheiden. Die Zellen der Messprobe werden beim Durchlaufen der „Flow Zelle“ von einem Laser beleuchtet. Abhängig von der Beschaffenheit der Zellen wird das Licht des Lasers nun gebrochen und von zwei Photodetektoren erkannt.

Der erste Photodetektor, der Forward-Scatter (FSC), misst das Volumen der jeweiligen Zellen. Je größer das Volumen der untersuchten Zelle, desto größer ist der Wert des FSC.

Der zweite Photodetektor, der Sideward-Scatter (SSC), misst die Granularität und die Struktur des Zellkerns der Zelle. Bei vielen Granula und einem unregelmäßigen Zellkern wird durch eine höhere Lichtstreuung ein höherer SSC-Wert gemessen.

Anhand der Scatter-Charakteristika können nun Leukozyten in Lymphozyten, Monocyten und Granulozyten unterschieden werden.

## 2. Material und Methoden

Zusätzlich zu den beiden Photodetektoren, die das Licht des Lasers erkennen, gibt es weitere Photodetektoren, die das emittierte Licht von Fluoreszenz-Farbstoffen detektieren. Fluoreszenz-Farbstoffe haben einen unterschiedlichen Stokes Shift. Dies bedeutet, dass sie das aufgenommene Licht des Lasers bei unterschiedlichen Wellenlängen wieder abgeben und so voneinander unterschieden werden können.

In dieser Studie wurden acht verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet.

**Tabelle 15:** Fluoreszenz-Farbstoffe

	FITC	PE	PerCP	APC	PE-Cy7	APC-H7	V450	V500
Absorptions-maximum	494 nm	496 nm	482 nm	650 nm	496 nm	650 nm	404 nm	415 nm
Emissions-maximum	520 nm	578 nm	678 nm	660 nm	785 nm	785 nm	448 nm	500 nm

Quelle: <https://www.bdbiosciences.com/us/applications/research/multicolor-flow/m/745795/sampled/>

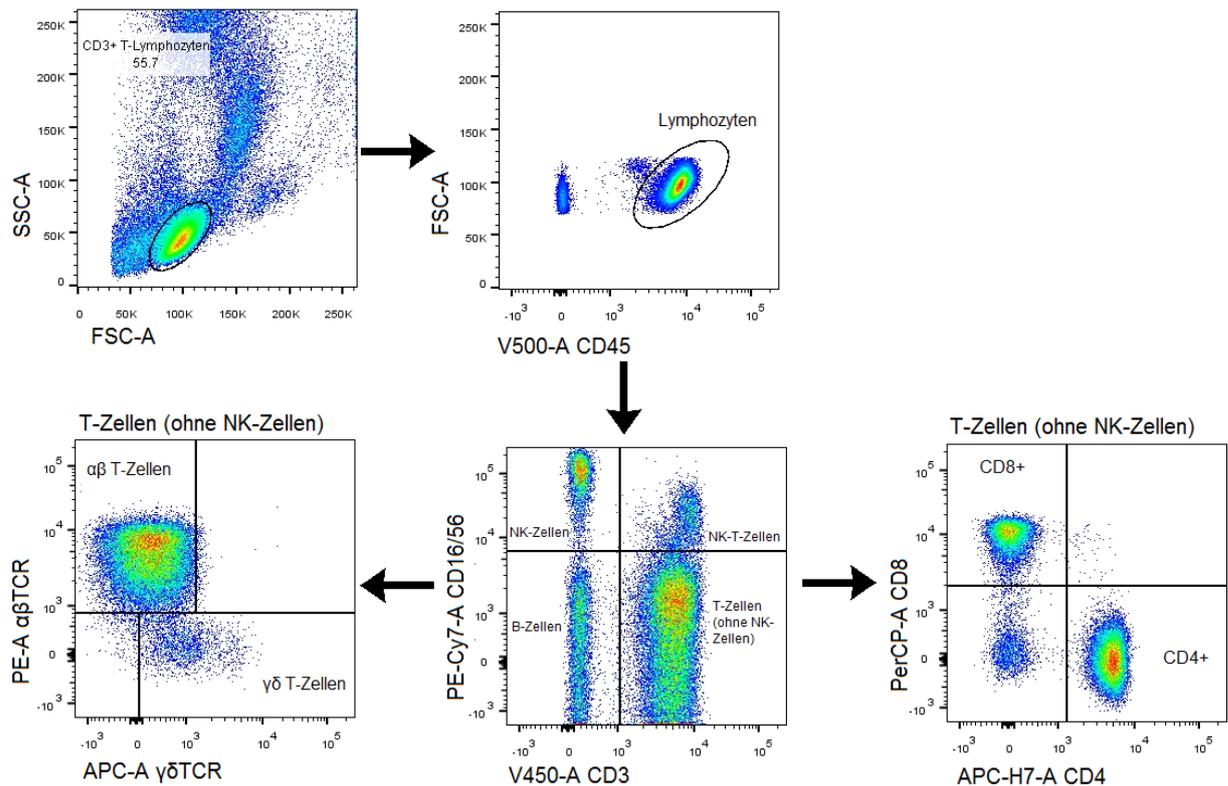
Antikörper, die mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, binden an bestimmte Zellstrukturen. Ein Anti-CD3-Antikörper wird beispielsweise an das CD3-Molekül binden, das bei Lymphozyten vorhanden ist. Falls das CD3-Molekül nicht von der Zelle exprimiert wird, bindet der Antikörper nicht und wird beim nächsten „waschen“ aus der Probe entfernt. So ist es möglich CD3-positive Zellen eindeutig von CD3-negativen Zellen zu unterscheiden. Es werden sowohl die Signalintensität als auch die Zellanzahl gemessen. Das Ergebnis ist ein Histogramm: die y-Achse beschreibt die Anzahl der Ergebnisse, die x-Achse die Fluoreszenzintensität.

Zur Populationsunterteilung gibt es eine weitere Möglichkeit, die erhobenen Daten der FACS-Analyse darzustellen und auszuwerten. Die geschieht mittels Dot-Plots. Hierbei werden zwei Parameter miteinander verglichen. Wichtig ist dabei, dass die verschiedenen Fluoreszenz-Signale gegeneinander auskompensiert werden, da sie sich teilweise in den Bereichen des von ihnen emittierten Lichts überschneiden. So wird beispielsweise ein Teil des PerCP-Signals auch vom APC-Detektor erkannt.

### 2.2.10. Gating

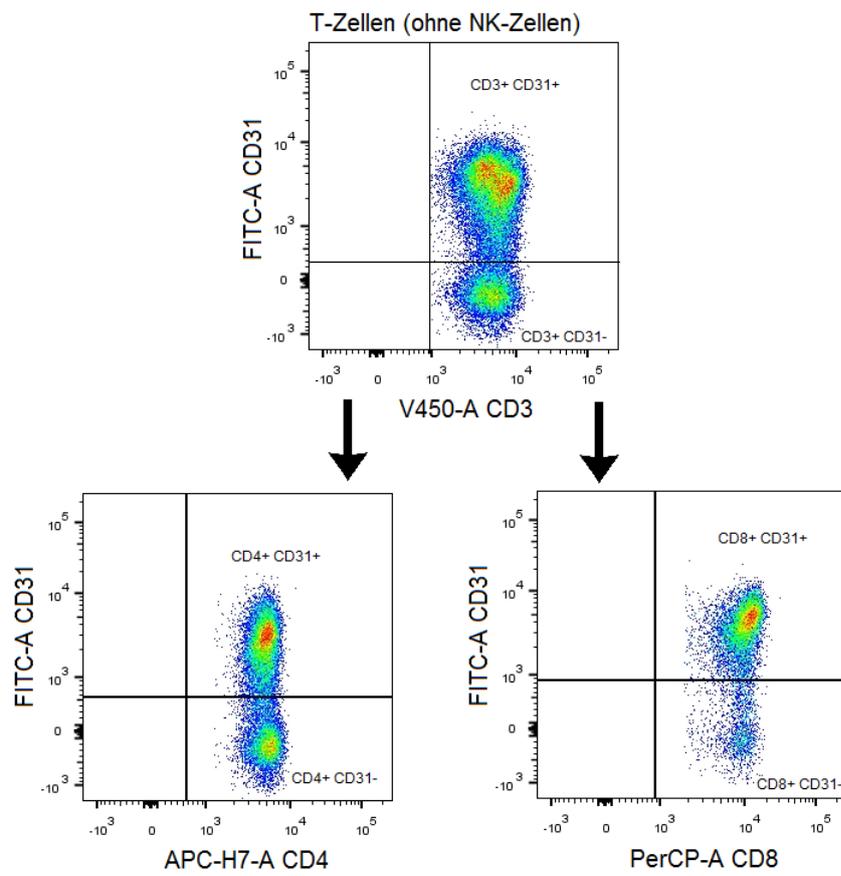
Auf Grundlage der erhobenen Messergebnisse konnten nun Zellpopulationen gezielt untersucht werden. In einem ersten Schritt wurden mittels der FSC und SSC Eigenschaften der Zellen die Lymphozyten-Population ausgewählt. Die CD3+ Lymphozyten wurden in Abhängigkeit der entsprechenden Marker in weitere Subpopulationen eingeteilt. Um bei den Cytokinproben 1 und 2 die Cytokin-Marker-positiven Zellen von den Cytokin-Marker-negativen Zellen zu unterscheiden, wurde in diesen Gruppen zusätzlich jeweils eine nur mittels CD3 angefärbte Vergleichsprobe entnommen. So ließen sich die CD3+ T-Lymphozyten von den CD3+ und zusätzlich Cytokin-positiven T-Lymphozyten unterscheiden.

#### Gating der Peripheral Blood Mononuclear Cells – Probe 1



**Abbildung 1:** Darstellung des Gatings für die Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) - Probe 1

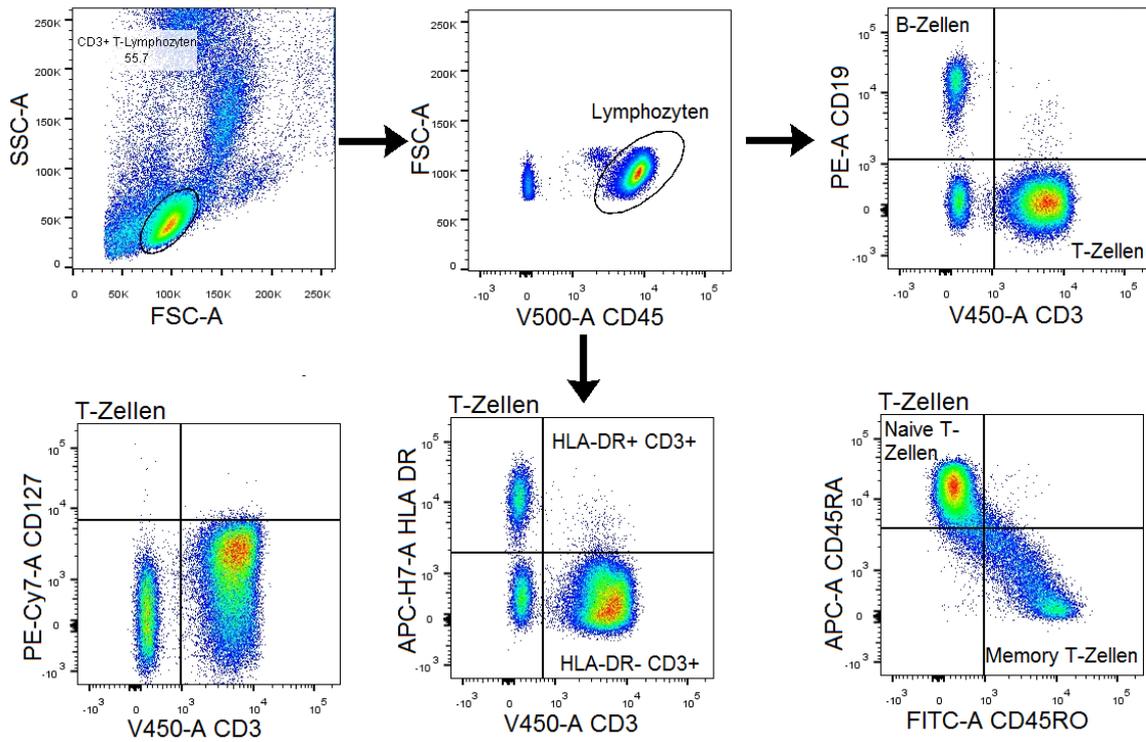
## 2. Material und Methoden



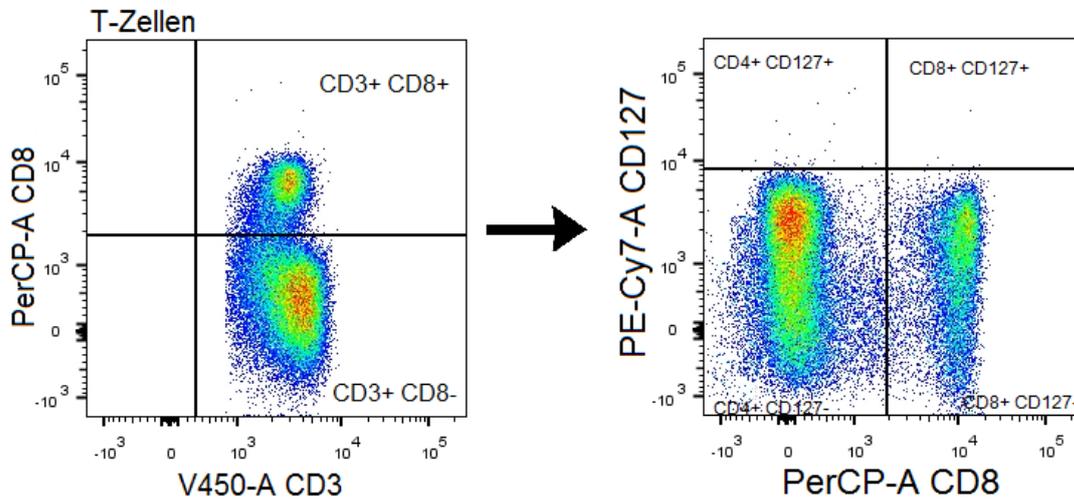
**Abbildung 2:** Darstellung des Gatings für die PBMC - Probe 1

2. Material und Methoden

**Gating der Peripheral Blood Mononuclear Cells – Probe 2**



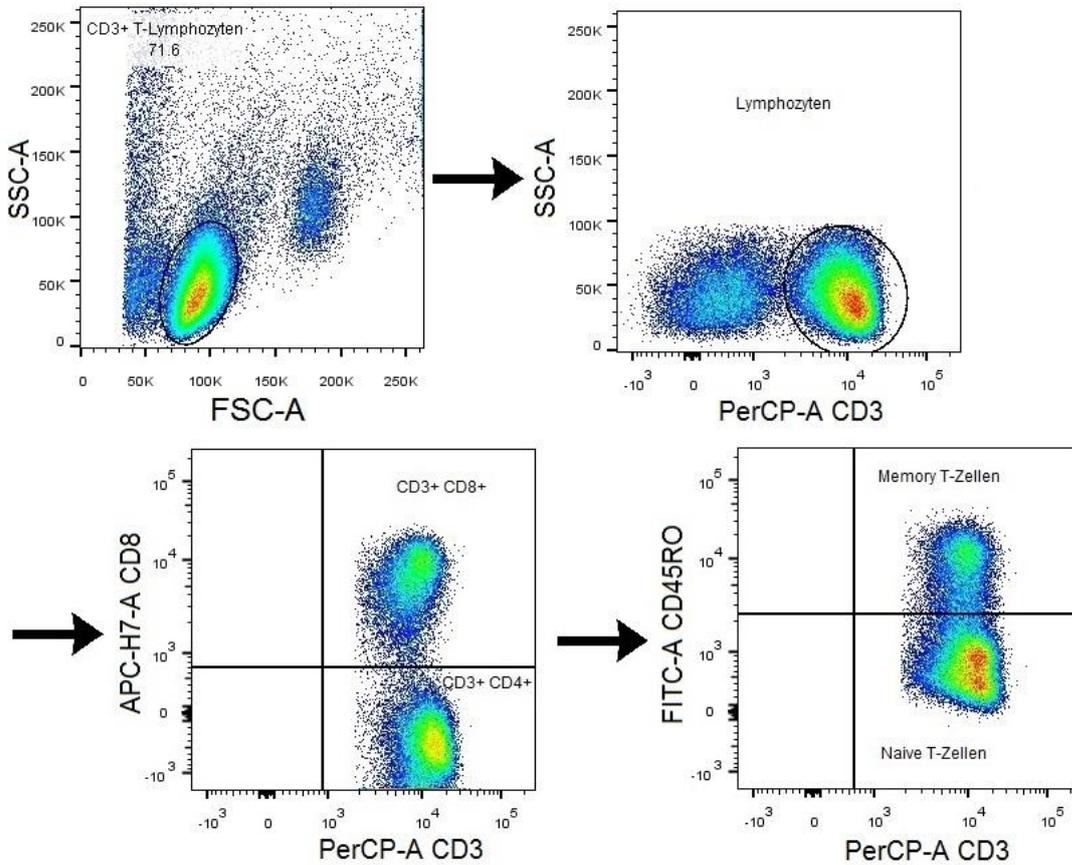
**Abbildung 3:** Darstellung des Gatings für die PBMC - Probe 2



**Abbildung 4:** Darstellung des Gatings für die PBMC - Probe 2

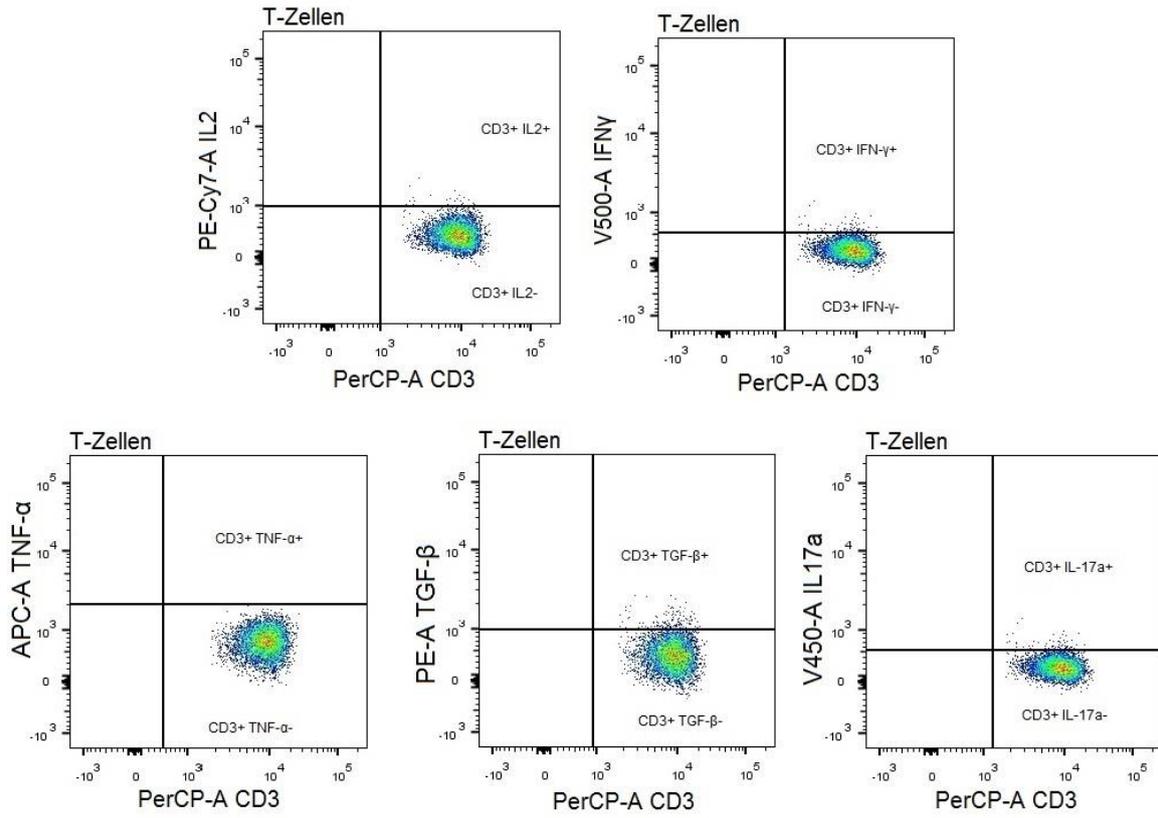
## 2. Material und Methoden

### Gating der Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ und IL-17a



**Abbildung 5:** Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IL-17a

## 2. Material und Methoden



**Abbildung 6:** Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IL-17a - Negativkontrolle

## 2. Material und Methoden

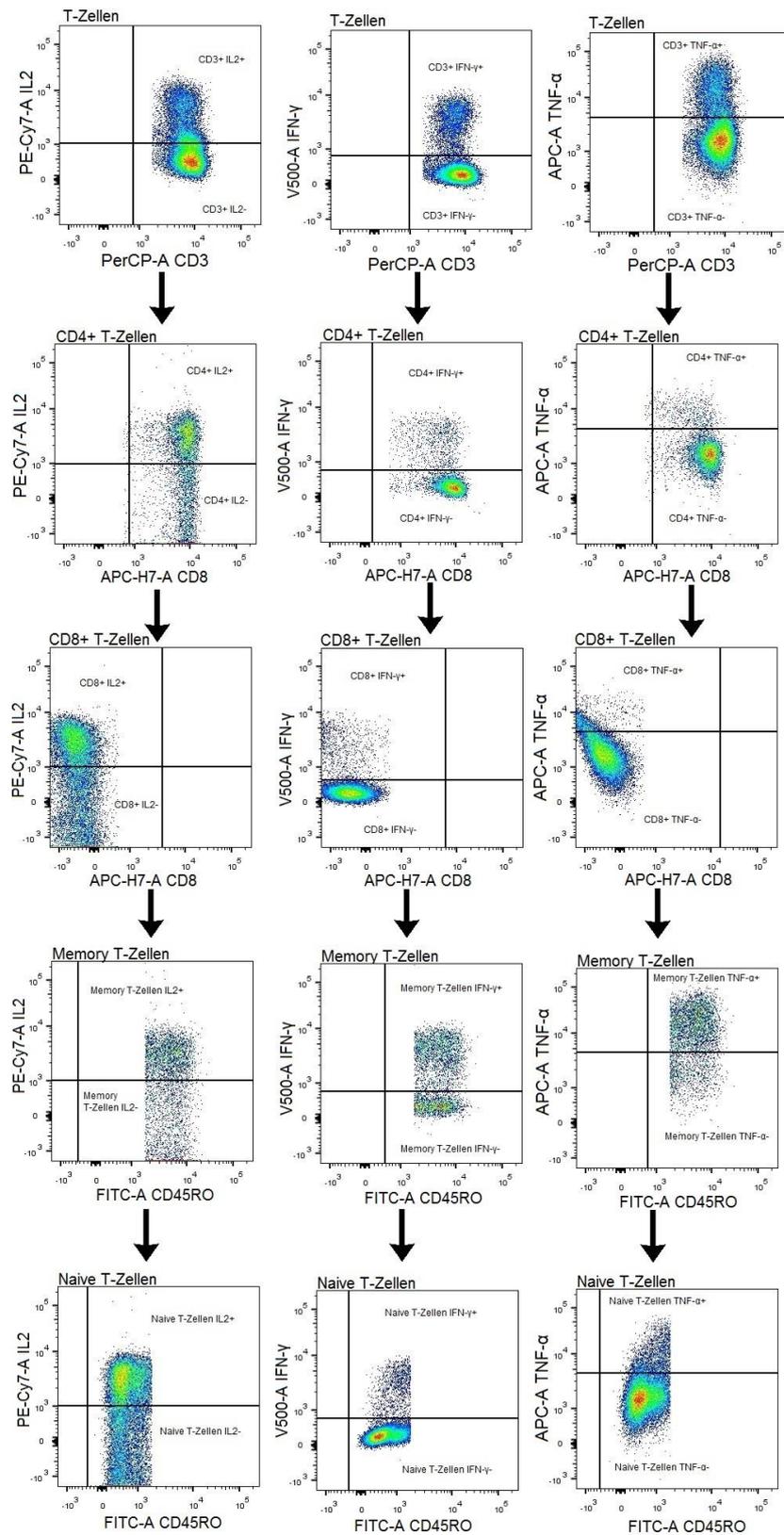
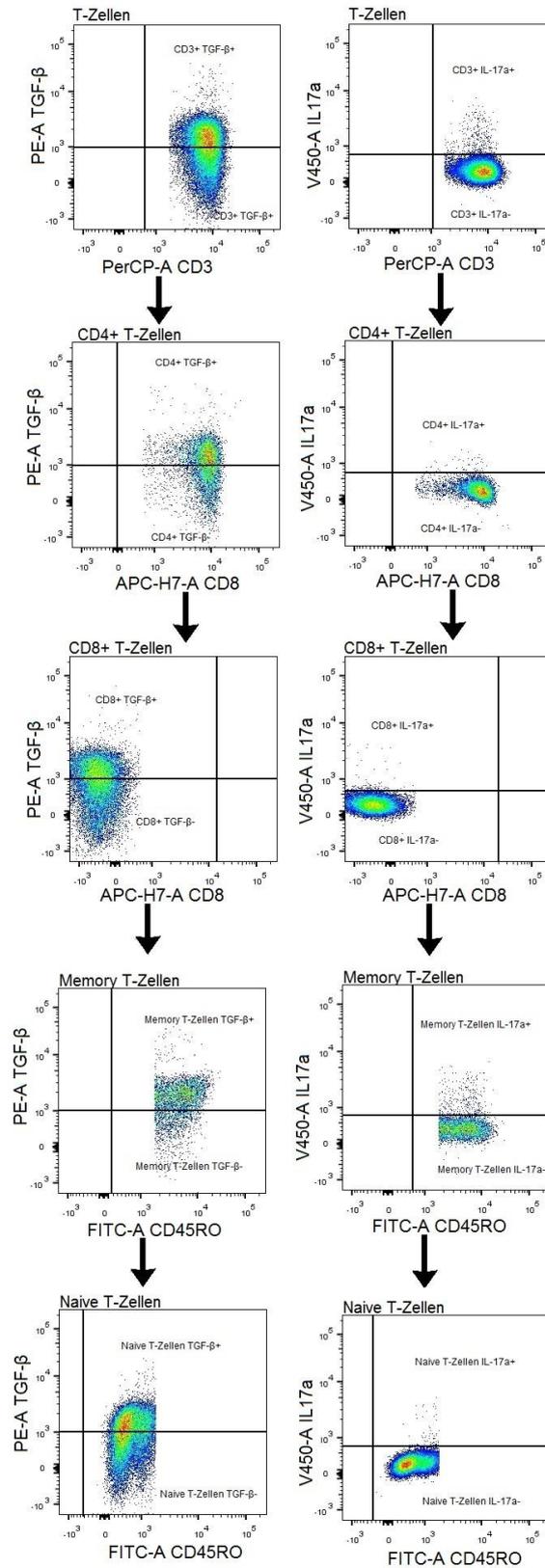


Abbildung 7: Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$

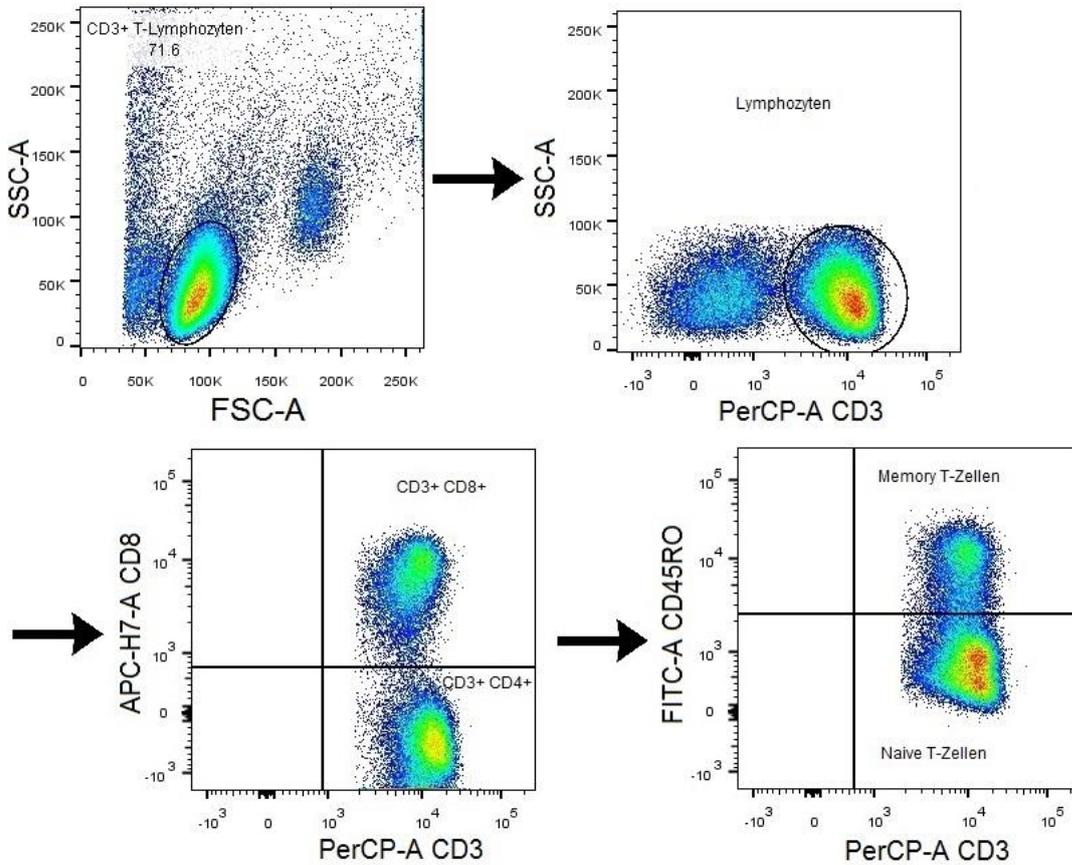
## 2. Material und Methoden



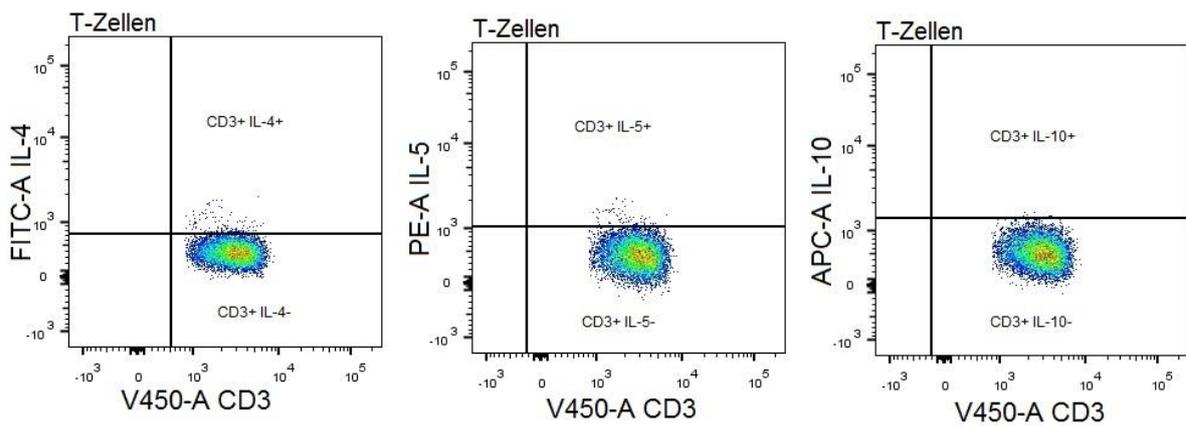
**Abbildung 8:** Darstellung des Gatings für die Cytokine TGF-β und IL-17a

## 2. Material und Methoden

### Gating der Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10



**Abbildung 9:** Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10



**Abbildung 10:** Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10 -  
Negativkontrolle

## 2. Material und Methoden

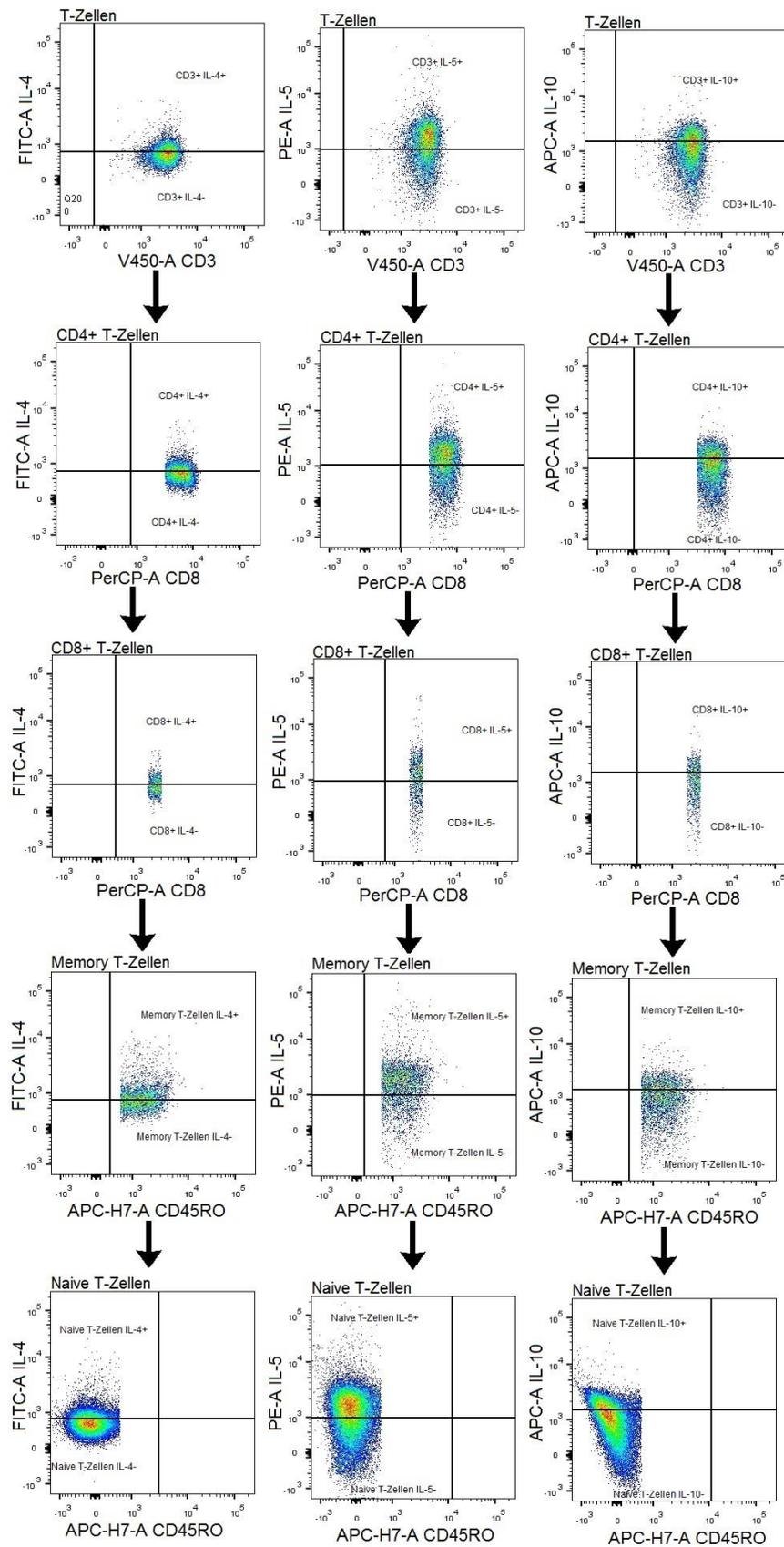


Abbildung 11: Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10

## **Statistik**

Es wurden folgende Tests verwendet:

### **U-Test nach Mann und Whitney**

Mit dem U-Test nach Mann und Whitney wurde ein Messwert zwischen zwei Gruppen verglichen, da keine Gauß'sche Normalverteilung der Messwerte angenommen werden kann. Bei geringen Fallzahlen, unter 20 Patienten, wird anstelle des gewöhnlichen, approximativen U-Tests der exakte U-Test gerechnet. Ergebnisse, die mittels U-Test berechnet wurden, sind als  $p_u$  gekennzeichnet.

### **Überlebensstatistik nach Kaplan und Meier.**

Überlebensstatistik nach Kaplan und Meier wird aus der Beobachtungszeit der überlebenden Patienten und der Überlebenszeit der verstorbenen Patienten, gerechnet ab einem bestimmten definierten Zeitpunkt gerechnet. In dieser Arbeit wurde der Zeitpunkt der Diagnosestellung festgelegt. Für alle Zeitpunkte vom Beginn der Beobachtungszeit bis zum Ausscheiden des letzten Patienten, der wird Anteil derjenigen Patienten geschätzt, die zu diesem Zeitpunkt noch am Leben sind. Diese geschätzte Überlebensrate umfasst auch solche Patienten, die bereits vorher aus anderen Gründen lebend ausgeschieden sind. Dieses Verfahren erlaubt darüber hinaus den Vergleich der Überlebensraten zwischen je zwei Gruppen. Zum Vergleich wird der log-rank Test berechnet. Das gleiche Verfahren wurde für das Ereignis Rezidivfreiheitsrate benutzt.

### **Test nach Tarone**

Für eine Statistik mit mehr als zwei Gruppen, die eine Rang-Reihenfolge aufweisen, wurde zusätzlich zu den paarweisen Berechnungen der Test auf Trend nach Tarone durchgeführt, da hierbei mehr als zwei Kohorten miteinander verglichen werden können. Ergebnisse, die mittels Test nach Tarone berechnet wurden, sind als  $p_t$  gekennzeichnet.

### **Approximationskurve der FACS-Daten**

Der nicht lineare Verlauf der FACS-Daten mit dem Alter der Patienten wurde durch ein Polynom 2. oder 3. Grades approximiert. Durch Subtraktion der Approximationskurve aus einer Kontrollgruppe gesunder Personen von den gemessenen Werten wurden altersunabhängige korrigierte FACS-Daten gewonnen.

In der Graphik stellt jeder Punkt den Wert eines Probanden dar. Als mittlere Linie wird die angepasste Regressionskurve gezeichnet, also die 50%-Perzentile. Sie wird flankiert von der 10%- und der 90%-Perzentile und ganz außen von der 5%- und der 95%-Perzentile.

Die Formel der Approximationskurve dient der Berechnung der mittleren Linie in der Darstellung der Perzentile. Wenn im Befehl für x oder y Transformationen verlangt sind, werden diese im Anschluss an die Formel angegeben. Die Polynom-Formel ist dann anstelle von y und/oder der Umrechnungsformel von z aus x anstelle von x die entsprechende Funktion, z.B.  $\log(x)$ , einzusetzen.

Der Test auf gleichmäßige Streuung prüft eine Voraussetzung für die Berechnung der Perzentil-Linien. Die drei Vergleiche sollten nicht signifikant sein.

### **Konfidenzintervall**

Ein Konfidenzintervall wird berechnet, um die Güte eines Schätzwertes zu beurteilen. Der aus der Stichprobe ermittelte Schätzwert repräsentiert vermutlich nicht den tatsächlichen Wert der Grundgesamtheit, und es ist kaum zu erwarten, dass er damit exakt übereinstimmt. Man darf aber vermuten, dass der wahre Wert in der näheren Umgebung des Schätzwertes liegt. Durch ein Konfidenzintervall wird dieser unscharfe Ausdruck „nähere Umgebung“ präzisiert, da er einen Hinweis auf die Genauigkeit des errechneten Ergebnisses liefert und macht. Ein 95%-Konfidenzintervall gibt den Bereich an, der mit 95% Wahrscheinlichkeit den ermittelten Parameter überdeckt. Zur Überprüfung auf eine Gaußsche Normalverteilung wurde die Probitdarstellung mit den Grenzen nach Lilliefors verwendet.

### **p-Werte**

Um die Testergebnisse quantitativ vergleichen zu können, wurden p-Werte berechnet. Ein p-Wert unter 0,05 wird als signifikant bezeichnet und das Ergebnis wird als wesentlich interpretiert. Die p-Werte werden mit Stern-Symbolen gekennzeichnet:

$p < 0.05$  mit \*,  $p < 0,01$  mit \*\* und  $p < 0,001$  mit \*\*\*

Die p-Werte in deskriptiven Arbeiten stellen keine Irrtumswahrscheinlichkeiten dar, da es sich dann nicht um eine geplante prospektive Studie mit einer zu beweisenden Hypothese handelt, sondern sie dienen zur Beurteilung und zum Vergleich der verschiedenen Testergebnisse. Die Bezeichnung „signifikant“ wird im statistischen Kontext reserviert, um Testergebnisse mit p-Werten unter 0.05 zu beschreiben.

### 2.3. Materialien

#### 2.3.1. Feinchemikalien, Puffer und sonstige Reagenzien und Materialien

**Tabelle 16:** Übersicht über die verwendeten Feinchemikalien, Puffer und sonstige Reagenzien und Materialien

<b>Artikel/ Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)	Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Ionomycin	Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.
DSMO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Brefeldin	Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Fötales Kälberserum (FCS)	BioChrom, Berlin
Paraformaldehyd (Medium A)	Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Saponin (Medium B)	Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Penicillin/ Streptomycin	PAA, Linz, Österreich
NEAA (Non-essential-amino-acids)	PAA, Linz, Österreich
Natriumpyruvat	PAA, Linz, Österreich
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Biocoll	Biochrom, Berlin
Phosphate buffered Saline (PBS)	Biochrom, Berlin
RPMI 1640 Flüssigmedium	Biochrom, Berlin
FACS Röhrchen Canto	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
Glaswaren (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Meßzylinder) Schott Duran®	Schott, Mainz
Pipettenspitzen 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	NUNC, Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen, Sterilfiltertips, gestopft, 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	NUNC, Roskilde, Dänemark
Stangenpipetten 5ml, 10ml, 25ml	NUNC, Roskilde, Dänemark
Reagenzgläser	NUNC, Roskilde, Dänemark
Tubes 1ml	NUNC, Roskilde, Dänemark
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates/ Tubes/ Caps	Applied Biosystems, Lincoln, USA
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Zaventum, Belgien
Thermo-Fast® 96 PCR Plates/ tubes/ caps	peqLab, Erlangen
KIMWIPES® Lite	Kimberly-Clark, Zaventum, Belgien

### 2.3.2. Antikörper

**Tabelle 17:** Übersicht über die verwendeten Antikörper

<b>Spezifität</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Firma</b>
CD 3	UCHT1	V450	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 3	SK7	PerCP	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 4	RPA-T4	APC-H7	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 8	SK1	PerCP	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 31	WM59	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
$\alpha\beta$ TCR	T10B9.1A-31	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
$\gamma\delta$ TCR	B1	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 16	3G8	PE-Cy7	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 56	B159	PE-Cy7	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 45	HI30	V500	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD45RO	UCHL1	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 19	4G7	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD45RA	HI100	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD 127	HIL-7R-M21	PE-Cy7	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
HLA DR	G46-6	APC-H7	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
TGF b	TB21	PE	IQ Products, Groningen, Niederlande
TNF a	6401.1111	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
IL 2	JES6-5H4	PE-Cy7	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
IL17a	N49-653	V450	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
IFN $\gamma$	B27	V500	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
IL4	MP4-25D2	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.

## 2. Material und Methoden

IL5	JES1-39D10	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
IL10	JES3-19F1	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD45RO	UCHL1	APC-H7	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
CD19	HIB19	V500	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.

**2.3.3. Geräte und Materialien**

**Tabelle 18:** Übersicht über die verwendeten Geräte und Materialien

<b>Gerät</b>	<b>Gerätetyp</b>	<b>Hersteller</b>
Durchflusszytometer	FACSCANTO II	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.
ELISA-Gerät	Tecan-Genios (Fluoreszenz Reader)	Tecan, Grödig, Österreich
Gefrierschränke	- -20°C - -80°C Hera freeze	GFL, Burgwedel Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Wärmeplatte	RCT-Basis	IKA-Werke, Staufen
DNA-Analysiergerät	Li-cor 4300 DNA-Analyzer mit Saga Version 3.2 Analysis-Software	LI-COR, Lincoln, USA
Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Photometer	Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterile Werkbank	Laminarflow 2003 Heraeus Hera Safe HSP 18	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Thermocycler	PCR Thermal Cycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Meßküvette	Suprasil® Quarzglas	Hellma®, Müllheim
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf Research/Reference 2,5µl, 10µl, 100µl, 200µl und 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-Jet®	Braun, Melsungen
Vortexgerät	Vortex REAX control	Heidolph, Nürnberg
Waage	BP1200	Sartoris, Göttingen
Zentrifugen	ROTIXA 50 RS ROTANTA 46 RC	Hettich, Tuttlingen
Mini-Zentrifuge	Galaxy Mini Centrifuge	VWR international, Radnor Pennsylvania, USA

## 2. Material und Methoden

### **2.3.4. Software**

FACS DIVA, Version 6.1.3, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.

ODYSSEY 2.1, LI-COR, Lincoln, USA

FlowJo 10.2, FlowJo LLC, Ashland, Oregon, U.S.A.

Microsoft Office 365 – Excel, Redmond, U.S.A.

Medas, Version 2014, C.Grund, Margetshöchheim

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klinische Charakteristika

##### 3.1.1. Studienkohorte

Diese Studie basiert auf den Daten von 175 Patienten im Alter von 4.5 Monaten bis 42 Jahren (vollendete Lebensjahre) in der Nachverfolgung. Das mittlere Alter betrug  $14.7 \pm 6.5$  Jahre, der Altersmedian war 15.2 Jahre mit einem 68%-CI von 8.0 bis 20.0 Jahren. 105 Patienten (60%) waren männlich und 70 (40%) weiblich. Die größte Gruppe macht hierbei die Gruppe der niedriggradigen Gliome (low-grade-glioma, LGG) mit 81 Patienten aus. Die zweitgrößte Gruppe waren die „Medulloblastome“ mit 57 Probanden. 12 Patienten wurde in der Gruppe der HGG aquiriert, 12 Patienten in der Gruppe der Ependymome und 23 Patienten in der Gruppe „Sonstige Hirntumore“.

##### 3.1.2. Rezidiv

Die folgende Tabelle stellt die Anzahl der Rezidive in den verschiedenen Gruppen dar. Bei Patienten mit Resttumor wurde der Progress der Erkrankung als Rezidiv gewertet. Von 175 Patienten erlitten 58 (33%) Patienten ein Rezidiv, (Tabelle 19: Rezidivraten aller Histologien. In der Gruppe der Patienten, welche an einem niedriggradigen Gliomen erkrankt waren (LGG-Patienten), waren bei 22 von insgesamt 81 Patienten (27%) ein Rezidiv bzw. ein Progress festzustellen. 20 der 57 Medulloblastompatienten erlitten ein Rezidiv.

**Tabelle 19:** Rezidivraten aller Histologien

		N	
Alle Hirntumorpatienten	Ja	58	33.14%
	Nein	117	66.86%
LGG	Ja	22	27.16%
	Nein	59	72.84%
Medulloblastome	Ja	20	35.09%
	Nein	37	64.91%
Ependymom	Ja	3	25.00%
	Nein	9	75.00%
HGG	Ja	7	70.00%
	Nein	3	30.00%
Craniopharyngeome	Ja	3	33.33%
	Nein	6	66.66%
Plexuspapillome	Ja	0	0.00%
	Nein	5	100.00%
Keimzelltumor	Ja	1	25.00%

### 3. Ergebnisse

	Nein	3	75.00%
Plexuscarzinome	Ja	0	0.00%
	Nein	2	100.00%
Meningeome	Ja	1	50.00%
	Nein	1	50.00%
Neurocytom	Ja	1	100.00%
	Nein	0	0.00%

#### 3.2. Cytokin Gen-Polymorphismen

Bei 175 Hirntumorpatienten wurden mittels PCR die Genotypen für Polymorphismen in sechs Cytokingenen bestimmt. Als die größten Diagnose-Untergruppen wurden die Medulloblastompatienten (n = 57) und die Patienten mit einem LGG (n = 81) definiert und separat betrachtet. Im Folgenden werden die Gesamtheit aller Hirntumorpatienten, die Medulloblastompatienten sowie die Patienten mit einem niedriggradigen Gliom betrachtet. Die Vergleichsgruppen wurden folgenden Studien entnommen:

- TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ <sub>1</sub> und IL-10: (Nieters et al. 2001)
- IL-6: (Cox et al. 2001)
- IFN- $\gamma$ : (Poli et al. 2002)

Die Häufigkeit der einzelnen Genotypen zwischen den Gruppen wurde mittels  $\chi^2$  Test verglichen. Die Cytokin Gen-Polymorphismen IL-10 (-592) und IL-10 (-819) werden gekoppelt vererbt. Die Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen und der Allelfrequenzen waren in allen Tests kongruent.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.1. Vergleich der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung

In der Tabelle 20 wird in der Spalte „Patienten“ die Verteilung der Polymorphismen der Gruppe „alle HIT“ dargestellt. In der Spalte „Kontrolle“ ist die Distribution der Polymorphismen in der Normalbevölkerung aufgezeigt. Es ergaben signifikante Unterschiede bei dem IL-10 (-1082) und dem IL-6 Polymorphismus. Für die Cytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

**Tabelle 20:** Vergleich aller Hirntumorpatienten mit der Normalbevölkerung

Polymorphismus	Genotyp	Patienten		Kontrollen		P
		n	%	n	%	
TNF- $\alpha$	G/G	100	60.24%	65	61.32%	0.78
	A/G	43	25.90%	24	22.64%	
	A/A	23	13.86%	17	16.04%	
TGF- $\beta_1$ (-10)	C/C	27	15.70%	12	11.21%	0.11
	T/C	95	55.23%	51	47.66%	
	T/T	50	29.07%	44	41.12%	
TGF- $\beta_1$ (-25)	C/C	4	2.34%	1	0.93%	0.081
	C/G	48	28.07%	19	17.76%	
	G/G	119	69.59%	87	81.31%	
TGF- $\beta_1$ (gesamt)	C/C C/C	2	1.18%	1	0.93%	
	C/C G/C	11	6.47%	6	5.61%	
	C/C G/G	13	7.65%	5	4.67%	
	T/C C/C	1	0.59%	0	0.00%	
	T/C G/C	23	13.53%	13	12.15%	
	T/C G/G	70	41.18%	38	35.51%	
	T/T G/C	14	8.24%	0	0.00%	
	T/T G/G	36	21.18%	44	41.12%	
IL-10 (-1082)	A/A	44	26.35%	93	28.18%	0.01
	G/A	91	54.49%	138	41.82%	
	G/G	32	19.16%	99	30.0%	
IL-10 (-819)	C/C	100	59.88%	194	58.79%	0.96
	C/T	54	32.34%	111	33.64%	
	T/T	13	7.78%	25	7.58%	
IL-10 (-592)	C/C	100	59.88%	194	58.79%	0.96
	C/A	54	32.34%	111	33.64%	
	A/A	13	7.78%	25	7.58%	
IL-10 (Gesamt)	ACC/ACC	15	8.98%	27	8.18%	0.04
	ACC/ATA	16	9.58%	41	12.42%	
	ATA/ATA	13	7.78%	25	7.58%	
	GCC/ACC	53	31.74%	68	20.61%	
	GCC/ATA	38	22.75%	70	21.21%	
	GCC/GCC	32	19.16%	99	30.00%	
IL-6	C/C	55	33.74%	16	15.69%	0.0037
	C/G	54	33.13%	40	39.22%	
	G/G	54	33.13%	46	45.10%	
IFN- $\gamma$	A/A	55	32.16%	26	25.49%	0.23
	T/A	74	43.27%	55	53.92%	
	T/T	42	24.56%	21	20.59%	

### 3. Ergebnisse

#### **TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (-10)**

Es zeigt sich, dass tendenziell weniger mit hohen TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-Plasmaspiegeln assoziierte Genotypen in der Studienkohorte vertreten sind (p=0.11).

#### **TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (-25)**

Die dargestellten Unterschiede weisen einen Trend auf, sind mit p=0.081 jedoch statistisch nicht signifikant. Auch hier zeigt sich, dass der mit hohen TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-Plasmaspiegeln assoziierte Genotyp G/G (high) vermehrt zu finden ist.

#### **IL-10 (-1082)**

Hirntumorpatienten zeigten signifikant seltener den IL10 (-1082) G/G Genotyp im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Für diesen Genotyp ist eine hohe Produktion von IL-10 beschrieben.

#### **IL-10 (-592/ -819)**

Hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

#### **IL-10 (Gesamt)**

Betrachtet man alle drei untersuchten IL-10 Genotypen gemeinsam und gruppiert nach der Höhe der Cytokinproduktion, zeigt sich der mit einer hohen IL-10 Produktion vergesellschaftete GCC/GCC Genotyp bei Hirntumorpatienten signifikant seltener als bei Gesunden. Der Genotyp GCC/ACC, assoziiert mit einer intermediären IL-10 Produktion, tritt häufiger auf.

#### **IL-6**

Der zu einer hohen IL-6 Produktion führende Genotyp G/G ist bei Patienten signifikant seltener als bei gesunden Kontrollen (p=0.0037).

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.2. Vergleich der Allelfrequenzen aller Hirntumorpatienten mit der Normalbevölkerung

In der Darstellung der Allelfrequenz für die Gruppe aller Hirntumorpatienten zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p=0.029$  und  $p<0.001$ ) zwischen der Studienkohorte und der Vergleichsgruppe für die Cytokin Gen-Polymorphismen für TGF- $\beta_1$  (-25) und IL-6. Knapp nicht signifikant ( $p=0.053$ ) war der Vergleich für das Cytokin TGF- $\beta_1$  (-10). Für die Cytokine TNF- $\alpha$ , IL-10 und IFN- $\gamma$  ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

**Tabelle 21:** Vergleich Alle Hirntumorpatienten-Allelfrequenzen mit der Normalbevölkerung

Polymorphismus	Allel	Patienten		Kontrollen		P
		n	%	n	%	
TNF- $\alpha$	G	243	73.2%	154	72.6%	0.888
	A	89	26.8%	58	27.4%	
TGF- $\beta_1$ (-10)	T	195	56.7%	139	65.0%	0.053
	C	149	43.3%	75	35.0%	
TGF- $\beta_1$ (-25)	G	286	83.6%	193	90.2%	0.029
	C	56	16.4%	21	9.8%	
IL-10 (-1082)	G	155	46.4%	336	50.9%	0.180
	A	179	53.6%	324	49.1%	
IL-10 (-592/ -819)	C	254	76.0%	509	77.1%	0.143
	T	80	24.0%	151	22.9%	
IL-10 (Gesamt)	GCC	155	46.4%	336	50.9%	0.404
	ACC	99	29.6%	181	27.4%	
	ATT	80	24.0%	143	21.7%	
IL-6	C	164	50.2%	72	35.3%	<0.001
	G	163	49.8%	132	64.7%	
IFN- $\gamma$	T	158	46.2%	158	48.2%	0.609
	A	184	53.8%	170	51.8%	

### 3. Ergebnisse

#### **TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (-10)**

Im Vergleich zur Normalbevölkerung zeigt sich eine tendenziell vermehrte Allelfrequenz des C-Allels, welches mit einer erniedrigten Ausschüttung von TGF- $\beta$ <sub>1</sub> assoziiert ist.

#### **TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (-25)**

Hier ist ein signifikant vermehrtes Auftreten des C-Allels in der Studienkohorte zu beobachten. Das C-Allel ist mit erniedrigten Plasmaspiegeln für TGF- $\beta$ <sub>1</sub> verbunden.

#### **IL-6**

In der Studienkohorte kann ein signifikant vermehrtes Aufkommen des C-Allels verzeichnet werden. Das C-Allel ist mit einer niedrigeren Ausschüttung an IL-6 assoziiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.3. Vergleich der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung

Beim Vergleich zwischen Patienten, die an einem Medulloblastom erkrankt sind und der Normalbevölkerung zeigten sich hinsichtlich der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen signifikante Unterschiede für die Cytokine IL-10 und IL-6. Für die Cytokine TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ <sub>1</sub> und IFN- $\gamma$  ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

**Tabelle 22:** Vergleich der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung

Polymorphismus	Genotyp	Patienten		Kontrollen		P
		n	%	n	%	
TNF $\alpha$	G/G	26	52.00%	65	61.32%	0.44
	A/G	16	32.00%	24	22.64%	
	A/A	8	16.00%	17	16.04%	
TGF $\beta$ <sub>1</sub> (-10)	C/C	8	15.38%	12	11.21%	0.41
	T/C	28	53.85%	51	47.66%	
	T/T	16	30.77%	44	41.12%	
TGF $\beta$ <sub>1</sub> (-25)	C/C	0	0.00%	1	0.93%	
	C/G	21	41.18%	19	17.76%	
	G/G	30	58.82%	87	81.31%	
TGF $\beta$ <sub>1</sub> (gesamt)	C/C C/C	0	0.00%	1	0.93%	
	C/C G/C	5	9.80%	6	5.61%	
	C/C G/G	2	3.92%	5	4.67%	
	T/C C/C	0	0.00%	0	0.00%	
	T/C G/C	17	21.57%	13	12.15%	
	T/C G/G	5	33.33%	38	35.51%	
	T/T G/C	11	9.80%	0	0.00%	
	T/T G/G	51	21.57%	44	41.12%	
IL-10 (-1082)	A/A	9	18.00%	93	28.18%	0.013
	G/A	32	64.00%	138	41.82%	
	G/G	9	18.00%	99	30.0%	
IL-10 (-592/ -819)	C/C	30	60.00%	194	58.79%	0.24
	C/T	19	38.00%	111	33.64%	
	T/T	1	2.00%	25	7.58%	
IL-10	ACC/ACC	4	8.00%	27	8.18%	0.065
	ACC/ATA	4	8.00%	41	12.42%	
	ATA/ATA	1	2.00%	25	7.58%	
	GCC/ACC	17	34.00%	68	20.61%	
	GCC/ATA	15	30.00%	70	21.21%	
	GCC/GCC	9	18.00%	99	30.00%	
IL6	C/C	19	38.78%	16	15.69%	0.0072
	C/G	16	32.65%	40	39.22%	
	G/G	14	28.57%	46	45.10%	
IFN- $\gamma$	A/A	18	34.62%	26	25.49%	0.44
	T/A	23	44.23%	55	53.92%	
	T/T	11	21.15%	21	20.59%	

### 3. Ergebnisse

#### **IL-10 (-1082)**

Die Genotypen G/G (high) und A/A (low) sind weniger stark nachweisbar, wo hingegen der Genotyp G/A (intermediate) mit 64.00% zu 41.82% deutlich stärker in der Studienkohorte vertreten ist. Dieses Ergebnis ist signifikant ( $p=0.013$ ).

#### **IL-10 (592/ -819)**

Hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

#### **IL-10 (Gesamt)**

In der kombinierten Betrachtung der drei Cytokin Gen-Polymorphismen für IL-10 bestätigt sich das im Cytokin Gen Polymorphismus für IL-10 (-1082) dargestellte Bild hinsichtlich der phänotypischen Verteilung. Die Genotypen, assoziiert mit niedrigen IL-10 Plasmaspiegeln, sind geringfügig seltener, ACC/ATA (low) und ATA/ATA (low) Gleichmaßen ist auch der mit hohen IL-10 Plasmaspiegeln in Verbindung gebrachte Genotypen GCC/GCC (high) häufiger in der Normalbevölkerung. Es stellt sich wiederum eine Betonung der heterozygoten Genotypen GCC/ACC (intermediate) und GCC/ATA dar. Die Ergebnisse sind knapp nicht signifikant ( $p=0.065$ ) und als Tendenz zu werten.

#### **IL-6**

Signifikante Unterschiede ( $p=0.0072$ ) wurden beim Cytokin Gen-Polymorphismus für IL-6 festgestellt. Wesentlich stärker in der Studienkohorte ausgeprägt ist der Genotyp C/C, assoziiert mit einer niedrigen IL-6 Produktion. Die mit hohen Plasmaspiegeln assoziierten Genotypen C/G (high) bei und G/G sind seltener als in der Normalbevölkerung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.4. Vergleich Allelfrequenzen der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung

Beim Vergleich der Allelfrequenzen der Studienkohorte mit der Normalbevölkerung zeigten sich für die Cytokin Gen-Polymorphismen TGF- $\beta_1$  (-25) und IL-6 signifikante Unterschiede ( $p=0.003$  und  $p=0.001$ ). Auffällig ist, dass beim Cytokin TNF- $\alpha$  knapp nicht signifikante Unterschiede ( $p=0.076$ ) verzeichnet werden konnten. Bei den Cytokinen IL-10 und IFN- $\gamma$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

**Tabelle 23:** Vergleich Allelfrequenzen der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung

Polymorphismus	Allel	Patienten		Kontrollen		p
		n	%	n	%	
TNF- $\alpha$	G	68	63.0%	154	72.6%	0.076
	A	40	37.0%	58	27.4%	
TGF- $\beta_1$ (-10)	T	60	57.7%	139	65.0%	0.209
	C	44	42.3%	75	35.0%	
TGF- $\beta_1$ (-25)	G	72	77.4%	193	90.2%	0.003
	C	21	22.6%	21	9.8%	
IL-10 (-1082)	G	50	50.0%	336	50.9%	0.865
	A	50	50.0%	324	49.1%	
IL-10 (592/ -819)	C	79	79.0%	509	77.1%	0.676
	T	21	21.0%	151	22.9%	
IL-10 (Gesamt)	GCC	50	50.0%	336	50.9%	0.946
	ACC	29	29.0%	181	27.4%	
	ATT	21	21.0%	143	21.7%	
IL-6	C	54	55.1%	72	35.3%	0.001
	G	44	44.9%	132	64.7%	
IFN- $\gamma$	T	59	56.7%	158	48.2%	0.128
	A	45	43.3%	170	51.8%	

### 3. Ergebnisse

#### **TNF- $\alpha$**

Es zeigt sich eine mit 37.0% zu 27.4% erhöhte Frequenz des A-Allels, welches mit höheren TNF- $\alpha$  Plasmaspiegeln assoziiert ist. Das Ergebnis ist als Tendenz zu werten ( $p=0,076$ ).

#### **TGF- $\beta_1$ (-25)**

Hier ist ein signifikant vermehrtes Auftreten des G-Allels in der Studienkohorte zu beobachten. Das G-Allel ist mit hohen Plasmaspiegeln für TGF- $\beta_1$  verbunden.

#### **IL-6**

Für das Cytokin IL-6 zeigt sich ein signifikant vermehrtes Auftreten des C-Allels in der Studienkohorte ( $p=0.001$ ). Das C-Allel wird mit einer niedrigen IL-6 Plasma-Produktion in Verbindung gebracht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.5. Vergleich der LGG-Patienten mit der Normalbevölkerung

Für die Studienkohorte der Patienten mit einem niedriggradigen Gliom konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Studienkohorte und Normalbevölkerung für die Cytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IFN- $\gamma$  dargestellt werden. Für die Cytokine TGF- $\beta_1$  und IL-10 waren die Ergebnisse knapp nicht signifikant.

**Tabelle 24:** Vergleich der LGG-Patienten mit der Normalbevölkerung

Polymorphismus	Genotyp	Patienten		Kontrollen		p
		n	%	n	%	
TNF- $\alpha$	G/G	50	66.67%	65	61.32%	0.57
	A/G	17	22.67%	24	22.64%	
	A/A	8	10.67%	17	16.04%	
TGF- $\beta_1$ (-10)	C/C	12	15.79%	12	11.21%	0.11
	T/C	44	57.89%	51	47.66%	
	T/T	20	26.32%	44	41.12%	
TGF- $\beta_1$ (-25)	C/C	4	5.19%	1	0.93%	0.09
	C/G	19	24.68%	19	17.76%	
	G/G	54	70.13%	87	81.31%	
TGF- $\beta_1$ (gesamt)	C/C C/C	2	2.63%	1	0.93%	
	C/C G/C	5	6.58%	6	5.61%	
	C/C G/G	5	6.58%	5	4.67%	
	T/C C/C	1	1.32%	0	0.00%	
	T/C G/C	9	11.84%	13	12.15%	
	T/C G/G	34	44.74%	38	35.51%	
	T/T G/C	5	6.58%	0	0.00%	
	T/T G/G	15	19.74%	44	41.12%	
IL-10 (-1082)	A/A	20	27.03%	93	28.18%	0.15
	G/A	39	52.70%	138	41.82%	
	G/G	15	20.27%	99	30.0%	
IL-10 (-819)	C/C	46	62.16%	194	58.79%	0.25
	C/T	19	25.68%	111	33.64%	
	T/T	9	12.16%	25	7.58%	
IL-10 (-592)	C/C	46	62.16%	194	58.79%	0.25
	C/A	19	25.68%	111	33.64%	
	A/A	9	12.16%	25	7.58%	
IL-10	ACC/ACC	5	6.76%	27	8.18%	0.072
	ACC/ATA	6	8.11%	41	12.42%	
	ATA/ATA	9	12.16%	25	7.58%	
	GCC/ACC	26	35.14%	68	20.61%	
	GCC/ATA	13	17.57%	70	21.21%	
	GCC/GCC	15	20.27%	99	30.00%	
IL-6	C/C	18	25.35%	16	15.69%	0.25
	C/G	22	30.99%	40	39.22%	
	G/G	31	43.66%	46	45.10%	
IFN- $\gamma$	A/A	25	32.89%	26	25.49%	0.29
	T/A	32	42.11%	55	53.92%	
	T/T	19	25.00%	21	20.59%	

### 3. Ergebnisse

#### **TGF- $\beta_1$ (-10)**

Tendenziell lässt sich festhalten, dass der mit hohen TGF- $\beta$  Plasmaspiegeln assoziierte Genotyp T/T seltener in der Studienkohorte zu finden ist, als in der Normalbevölkerung ( $p=0,11$ ).

#### **TGF- $\beta_1$ (-25)**

Das mit höheren TGF- $\beta$ -Plasmaspiegeln assoziierte G-Allel ist tendenziell häufiger in der Normalbevölkerung vertreten ( $p=0,09$ ).

#### **IL-10 (Gesamt)**

Der wesentliche Unterschied ist die tendenzielle Betonung des Genotyps GCC/ACC (intermediate). Die übrigen Genotypen zeigen nur geringfügige Abweichungen zwischen Studienkohorte und Normalbevölkerung ( $p=0.072$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.6. Vergleich Allelfrequenzen der LGG-Patienten mit der Normalbevölkerung

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Allelfrequenz für die Gruppe der Patienten mit einem niedriggradigen Gliom konnten signifikante Unterschiede für die Allelfrequenz für TGF- $\beta_1$  dargestellt werden. Für die Cytokine TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 und IFN- $\gamma$  waren die Ergebnisse nicht signifikant.

**Tabelle 25:** Vergleich LGG-Patienten-Allelfrequenzen mit der Normalbevölkerung

Polymorphismus	Allel	Patienten		Kontrollen		p
		n	%	n	%	
TNF- $\alpha$	G	117	78.0%	154	72.6%	0.247
	A	33	22.0%	58	27.4%	
TGF- $\beta_1$ (-10)	T	84	55.3%	139	65.0%	0.061
	C	68	44.7%	75	35.0%	
TGF- $\beta_1$ (-25)	G	127	82.5%	193	90.2%	0.030
	C	27	17.5%	21	9.8%	
IL-10 (-1082)	G	69	53.1%	336	50.9%	0.651
	A	61	46.9%	324	49.1%	
IL-10 (-819)	C	111	75.0%	509	77.1%	0.581
	T	37	25.0%	151	22.9%	
IL-10 (-592)	C	111	75.0%	509	77.1%	0.581
	T	37	25.0%	151	22.9%	
IL-10 (Gesamt)	GCC	69	46.6%	336	50.9%	0.581
	ACC	42	28.4%	181	27.4%	
	ATT	37	25.0%	143	21.7%	
IL-6	C	58	40.8%	72	35.3%	0.294
	G	84	59.2%	132	64.7%	
IFN- $\gamma$	T	70	46.1%	158	48.2%	0.666
	A	82	53.9%	170	51.8%	

#### TGF- $\beta_1$ (-10)

Das mit niedrigeren TGF- $\beta$  Plasmaspiegeln assoziierte C-Allel ist tendenziell häufiger in der Studienkohorte vertreten (p=0.061).

#### TGF- $\beta_1$ (-25)

Das mit höheren TGF- $\beta$ -Plasmaspiegeln assoziierte G-Allel ist signifikant häufiger in der Normalbevölkerung vertreten (p=0.03).

### 3. Ergebnisse

#### 3.3. Einfluss der Polymorphismen auf die Prognose

Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob die Cytokin Gen-Polymorphismen Einfluss auf die Prognose haben. Die Gruppen aller Hirntumorpatienten, Medulloblastompatienten und LGG-Patienten wurden abhängig davon unterteilt, ob ein Rezidiv bzw. ein Progress auftraten oder nicht. Dann verglichen wir, ob es zwischen diesen beiden Gruppen Differenzen hinsichtlich der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen gab.

Für die Cytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 zeigte sich keine Korrelation der Prognose in allen untersuchten Subgruppen. Für TGF- $\beta_1$  konnte ein signifikanter Zusammenhang in der Gruppe der LGG-Patienten gefunden werden. Für IL-10 war es möglich einen Einfluss auf die Prognose in allen untersuchten Patientenkohorten darzustellen. Für IFN- $\gamma$  zeigte sich ein knapp nicht signifikanter Zusammenhang zwischen Cytokin Gen-Polymorphismus und Prognose in der Gruppe der LGG-Patienten.

##### 3.3.1. Alle Hirntumorpatienten: Unterschied in der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen bei Patienten mit und ohne Rezidiv

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnten signifikante Unterschiede für die das Cytokin IL-10 berechnet werden. Für die Cytokine TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6 und IFN- $\gamma$  waren die Ergebnisse nicht signifikant.

**Tabelle 26:** Einfluss der Polymorphismen auf Prognose (Alle HIT)

		Rezidiv				p
		Ja		Nein		
<b>alle HIT</b>		N	%	n	%	
IL-10 (-1082)	A/A	13	22.81%	31	28.18%	0.73
	G/A	32	56.14%	59	53.64%	
	G/G	12	21.05%	20	18.18%	
IL-10 (-592/ -819)	C/C	32	56.14%	68	61.81%	0.020
	C/T	24	42.11%	30	27.27%	
	T/T	1	1.75%	12	10.90%	
IL-10 (gesamt)	ACC/ACC	3	5.26%	12	10.90%	0.061
	ACC/ATA	9	15.79%	7	6.36%	
	ATA/ATA	1	1.75%	12	10.90%	
	GCC/ACC	17	29.82%	36	32.73%	
	GCC/ATA	15	26.32%	23	20.90%	
	GCC/GCC	12	21.05%	20	18.18%	

### 3. Ergebnisse

#### **IL-10 (-1082)**

Es besteht kein signifikanter Unterschied.

#### **IL-10 (-592/ -819)**

Der heterogene Genotyp C/T hat eine Rezidivrate von 44.44%. Für den Genotyp C/C (low) ergibt sich eine Rezidivrate von 32.0%. Der Genotyp T/T weist die niedrigste Rezidivrate auf ( $p=0.02$ ).

#### **IL-10 (gesamt)**

Eine Tendenz lässt sich bei der kombinierten Betrachtung der IL-10 Polymorphismen ausmachen ( $p=0.061$ ). Sowohl die Genotypen ACC/ATA (low), GCC/ACC (intermediate), GCC/ATA (intermediate) und GCC/GCC (high) sind vermehrt bei Pat. Mit Rezidiven aufzufinden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.2. Medulloblastompatienten: Unterschied in der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen bei Patienten mit und ohne Rezidiv

**Tabelle 27:** Einfluss der Polymorphismen auf Prognose bei Medulloblastompatienten

		Rezidiv				p
		Ja		Nein		
Genotypen		N	%	n	%	
IL-10 (-1082)	A/A	4	20.00%	5	16.67%	0.88
	G/A	13	65.00%	19	63.33%	
	G/G	3	15.00%	6	20.00%	
IL-10 (-592/ -819)	C/C	9	45.00%	21	70.00%	0.073
	C/T	11	55.00%	8	26.67%	
	T/T	0	0.00%	1	3.33%	

#### IL-10 (-1082)

Es besteht kein signifikanter Unterschied.

#### IL-10 (-592/ -819)

Der heterogene Genotyp C/T (intermediate) weist die höchste Rezidivrate auf. Ein Drittel der Patienten mit dem Genotyp C/C (low) erlitten ein Rezidiv. Bei n=1 kann über den Genotypen T/T keine Aussage gemacht werden. Die Ergebnisse waren nicht signifikant ( $p=0.073$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.3. LGG-Patienten: Unterschied in der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen bei Patienten mit und ohne Rezidiv

Es zeigten sich signifikante Unterschiede für die das Cytokin TGF- $\beta$ . Für die Cytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  zeigten sich Tendenzen, wohingegen bei TNF- $\alpha$  und IL-6 waren die Ergebnisse nicht signifikant waren.

**Tabelle 28:** Einfluss der Polymorphismen auf Prognose bei LGG-Patienten

LGG		Rezidiv				p
		Ja	Nein	n	%	
TGF- $\beta_1$ (10)	C/C	1	4.67%	11	20.00%	0.0050
	T/C	9	42.86%	35	63.64%	
	T/T	11	52.38%	9	16.36%	
IL-10 (-1082)	A/A	5	22.73%	15	28.85%	0.44
	G/A	14	63.64%	25	48.08%	
	G/G	3	13.64%	12	23.08%	
IL-10 (-592/ -819)	C/C	12	54.55%	34	65.38%	0.096
	C/T	9	40.91%	10	19.23%	
	T/T	1	4.55%	8	15.38%	
IFN- $\gamma$	A/A	11	50.00%	14	25.93%	0.10
	T/A	8	36.36%	24	44.44%	
	T/T	3	13.64%	16	29.63%	

#### TGF- $\beta_1$ (-10)

Während der Genotyp C/C (low) eine geringe Rezidivrate aufweist, entwickeln über die Hälfte der Patienten mit dem Genotyp T/T (high) ein Rezidiv. Die Ergebnisse sind signifikant ( $p=0.005$ ).

#### IL-10 (-592/ -819)

Patienten mit dem heterozygoten Genotyp C/T (intermediate) haben tendenziell mit 47.37% Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv. Der Genotyp T/T (high) weist mit 11% eine geringe Rezidivrate auf. Die Ergebnisse waren knapp nicht signifikant ( $p=0.096$ ).

#### IFN- $\gamma$

Der Genotyp A/A, assoziiert mit einem niedrigen IFN- $\gamma$  Plasmaspiegel, hat die höchste Rezidivrate in dieser Gruppe. Der mit hohen Plasmakonzentrationen assoziierte Genotyp T/T hingegen weist tendenziell die niedrigste Rezidivrate auf ( $p=0.1$ ).

### 3. Ergebnisse

#### **3.4. Einfluss der Polymorphismen auf das Event-Free-Survival – Kaplan-Meier-Analyse**

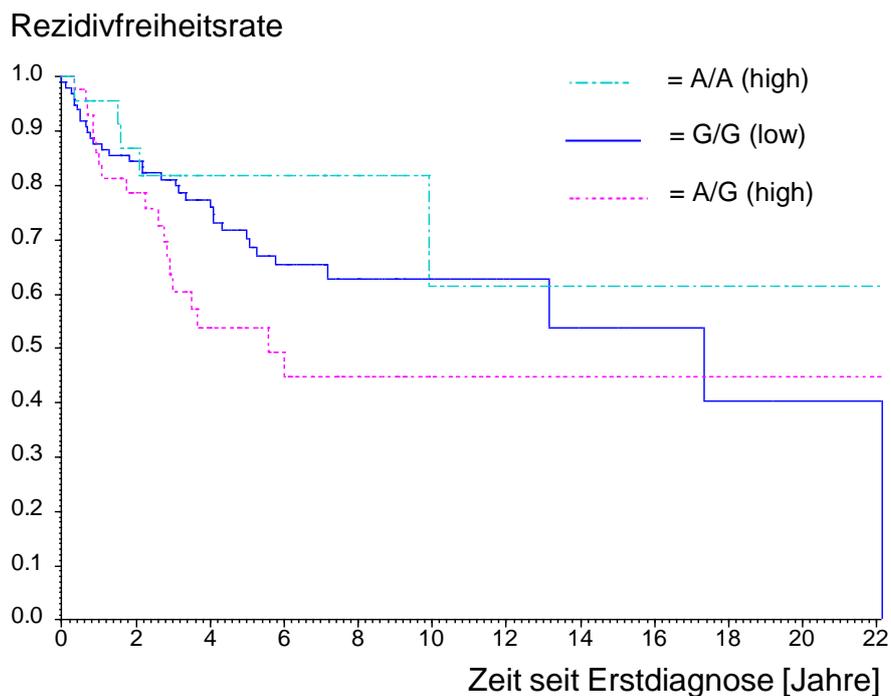
Als nächsten Punkt untersuchten wir, ob das Vorliegen eines bestimmten Polymorphismus sich auf das Event-free-Survival (EFS) auswirkt. Die Gruppen aller Hirntumorpatienten, Medulloblastompatienten und Patienten mit einem niedriggradigen Gliom wurden in die jeweiligen Genotypen der Cytokin Gen Polymorphismen für die Cytokine TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$ , IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$  unterteilt und dann hinsichtlich des EFS betrachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.1. Alle Hirntumorpatienten: TNF- $\alpha$ und Rezidiv

In Abbildung 12 ist die Rezidivfreiheitsrate aller Hirntumorpatienten in Abhängigkeit des TNF- $\alpha$  Polymorphismus zu sehen. Die Ergebnisse waren mit  $p=0.068$  bzw.  $p=0.08$  knapp nicht signifikant. Zu erkennen ist, dass über einen Zeitraum von 5 Jahre der Genotyp A/A (high) eine Tendenz zu einem niedrigeren Auftreten von Rezidiven verzeichnet als die beiden anderen Genotypen. Der Genotyp A/G (high) ist hingegen mit einem deutlich niedrigeren Rezidivfreiheitsrate assoziiert.

Auffällig ist, dass die Rezidivfreiheitsrate des Genotyps G/G (low) mit 70.2% über 5 Jahren tendenziell zwar deutlich höher ist als diejenige des Genotyp A/A (high), allerdings auch deutlich niedriger als diejenige des Genotyps A/G (high).



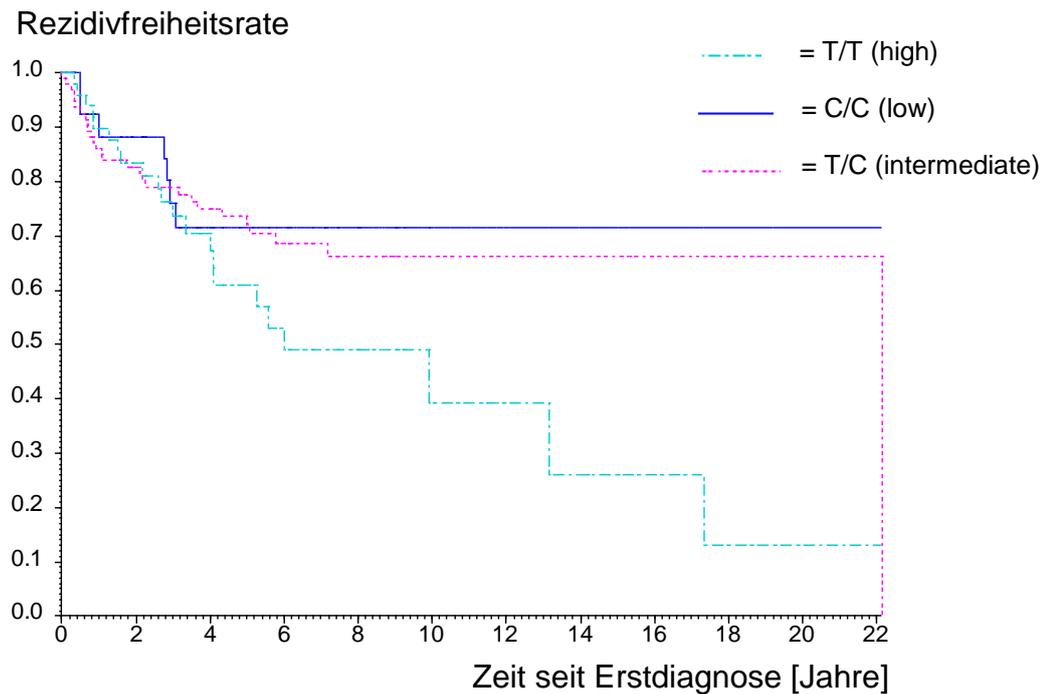
**Abbildung 12:** Rezidiv und TNF- $\alpha$

		1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre		p
1	G/G	87.6	84.5	70.2	1-2	0.080
2	A/G	83.6	78.7	53.8	1-3	$p>0,05$
3	A/A	95.6	87.0	81.8	2-3	0.068

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.2. Alle Hirntumorpatienten: TGF- $\beta_1$ (10) und Rezidiv

In Abbildung 13 ist die Rezidivfreiheitsrate aller Hirntumorpatienten in Abhängigkeit des TGF- $\beta$  (10) Polymorphismus zu sehen. Die Ergebnisse waren knapp nicht signifikant ( $p=0.084$ ). Über 5 Jahre betrachtet zeigt der Genotyp T/T (high) tendenziell eine niedrigere Rezidivfreiheitsrate auf als die Genotypen T/C (intermediate) und C/C (low).



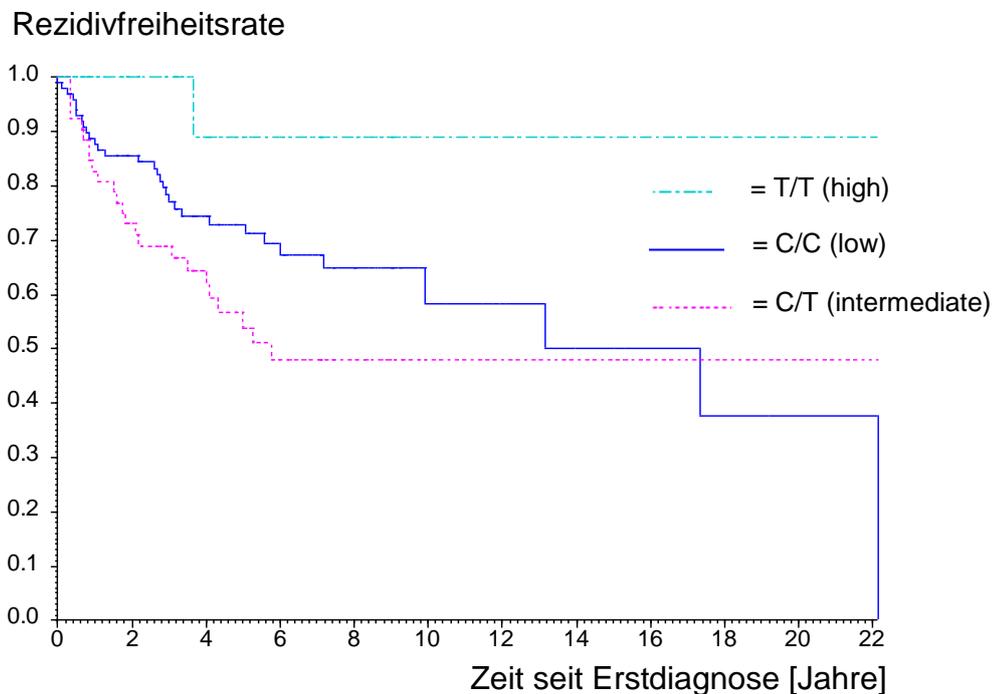
**Abbildung 13:** Rezidiv und TGF- $\beta$  (10)

TGF- $\beta_1$ (10)		1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre		P
1	C/C	88.3	88.3	71.6	1-2	$p>0,05$
2	T/C	86.0	82.7	72.0	1-3	$p>0,05$
3	T/T	89.8	83.4	60.9	2 - 3	0.084

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.3. Alle Hirntumorpatienten: IL-10 (-592/ -819) und Rezidiv

In Abbildung 14 ist der Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus für IL-10 -819 und der Rezidivfreiheitsrate bei allen Hirntumorpatienten dargestellt. Die Ergebnisse waren signifikant ( $p=0.03$ ). Zu erkennen ist, dass der Polymorphismus T/T (high) Rezidivfreiheitsrate von 88.89% über 5 Jahre hat. Der Genotyp T/C (intermediate) hat eine niedrigere Rezidivfreiheitsrate von 53.87%. Der Genotyp C/C (low) hingegen liegt mit einer Rezidivfreiheitsrate von 72.9% über 5 Jahre zwar niedriger als der Genotyp T/T, allerdings höher als der Genotyp T/C.



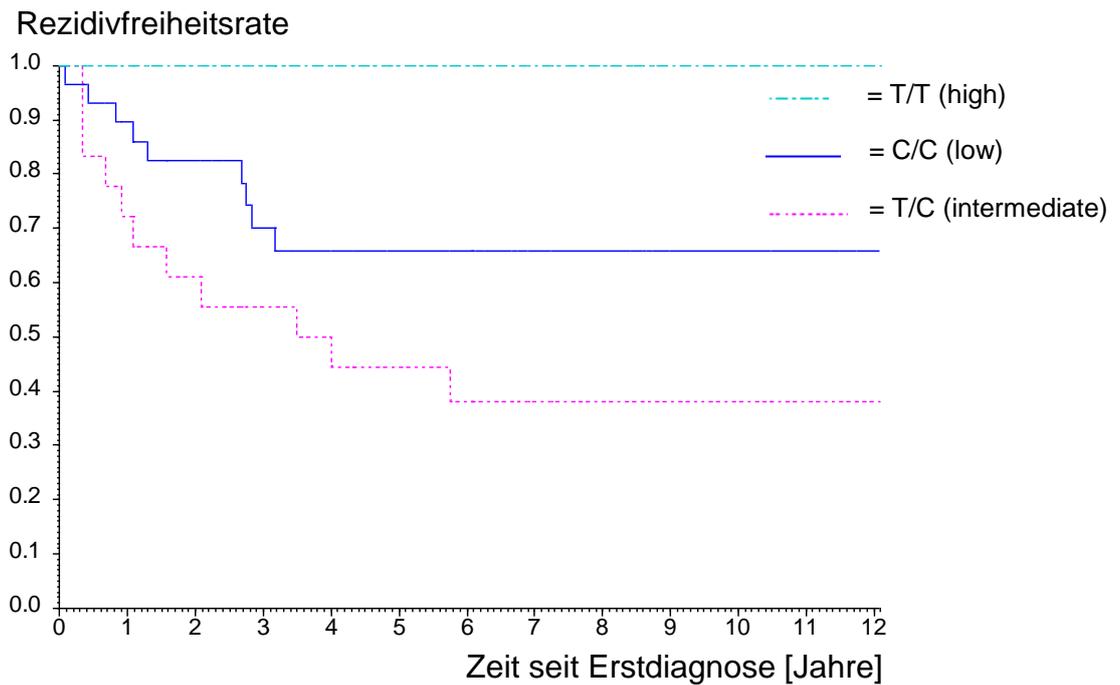
**Abbildung 14:** Rezidiv und IL-10 (-592/ -819)

IL-10 (819)		1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre		P
1	C/C	87.70	85.59	72.90	1-2	$p>0,05$
2	C/T	82.69	73.03	53.87	1-3	$p>0,05$
3	T/T	100.0	100.0	88.89	2-3	0.030

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.4. Medulloblastompatienten: IL-10 (-1082) und Rezidiv

In Abbildung 15 ist die Rezidivfreiheitsrate der Medulloblastompatienten in Abhängigkeit des IL-10 (-1082) Polymorphismus zu sehen. Die Rezidivfreiheitsrate der Genotypen T/T (high) kann aufgrund der Fallzahl n=1 nicht beurteilt werden. Der Genotyp C/C weist mit tendenziell eine höhere Rate an Rezidiven über 5 Jahre auf als der Genotyp T/C (p=0.082).



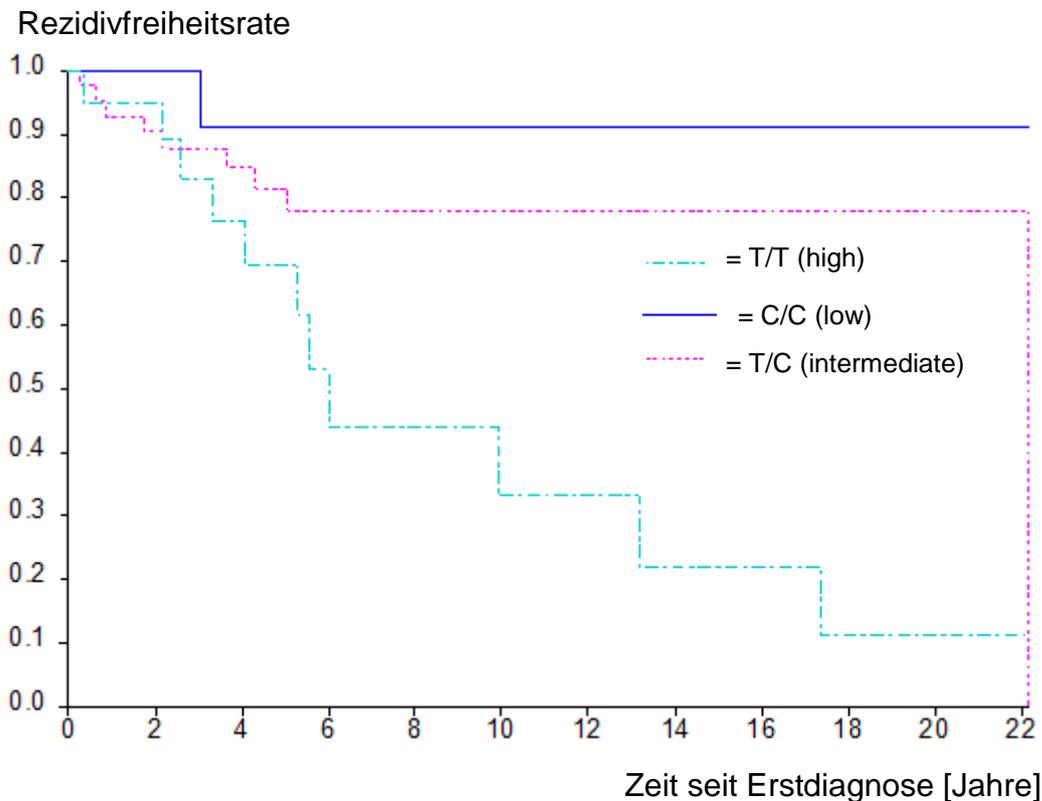
**Abbildung 15:** Rezidiv und IL-10 (-592 /-819) bei Medulloblastom

IL-10(-819)		n	1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre		P
1	C/C	30	89.66	82.48	65.73	1-2	0.082
2	T/C	19	72.22	61.11	44.44	1-3	p>0,05
3	T/T	1	100.00	100.00	100.00	2-3	p>0,05

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.5. LGG-Patienten: TGF- $\beta_1$ (-10) und Rezidiv

In Abbildung 16 ist der Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Rezidivs in der Gruppe der Patienten mit einem niedriggradigen Gliom und dem Polymorphismus für TGF- $\beta_1$  (10) dargestellt. Der Genotyp T/T, der zu einer hohen Cytokinproduktion führt, hat im Vergleich mit den beiden anderen Genotypen über 5 Jahre betrachtet signifikant mehr Rezidive ( $p=0.022$  bzw.  $p=0.019$ ).



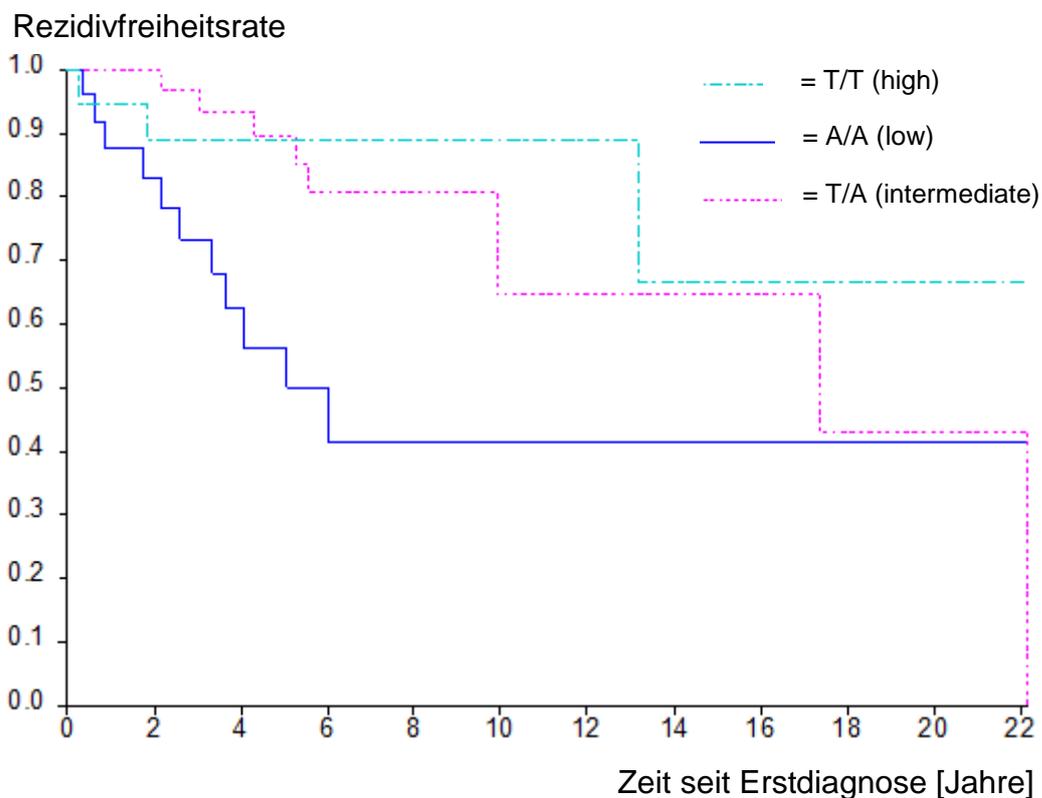
**Abbildung 16:** Patienten mit niedriggradigem Gliom - TGF $\beta$ 10 und Rezidiv

TGF- $\beta_1$ (10)	n	1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre		P
1 C/C	12	100.00	100.00	90.91	1-2	$p>0,05$
2 T/C	44	92.84	90.33	81.49	1-3	0.022
3 T/T	20	95.00	95.00	69.27	2-3	0.019

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.6. LGG-Patienten: IFN- $\gamma$ und Rezidiv

Es wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Rezidivs und dem Polymorphismus für IFN- $\gamma$  in der Gruppe der Patienten mit niedriggradigem Gliom untersucht. Der mit geringer Cytokinausschüttung in Verbindung gebrachte Genotyp A/A weist eine signifikant niedrigere Rezidivfreiheitsrate über 5 Jahre auf als der Genotyp T/A (intermediate) ( $p=0.0052$ ) und einen knapp nicht signifikanten Unterschied zum Genotyp T/T (low) ( $p=0.053$ ).



**Abbildung 17:** LGG-Patienten: IFN- $\gamma$  und Rezidiv

IFN- $\gamma$		n	1 Jahr	2 Jahre	5 Jahre		P
1	A/A	25	87.65	83.04	56.13	1-2	0.0052
2	T/A	32	100.00	100.00	89.54	1-3	0.053
3	T/T	19	94.74	88.82	88.82	2 - 3	$p>0,05$

### **3.5. FACS-Daten Vergleich mit Normalbevölkerung**

In diesem Kapitel wird der Vergleich unseres Patientenkollektivs hinsichtlich der Cytokinausschüttung in der FACS Untersuchung im Vergleich zu einer gesunden Kohorte, die wir in einer vorherigen Studie von Wiegering et al. 2009 ermittelten, dargestellt (Wiegering et al. 2009). Wir stellten dabei die beiden Gruppen altersgematcht im Sinne einer Approximationskurve gegenüber. Um die beiden Gruppen möglichst genau vergleichen zu können, wurden nur Patienten, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme jünger als 18 Jahre waren, eingeschlossen. MW bezeichnet den Mittelwert. ST steht für die Streuung der Ergebnisse.  $p_U$  gibt die Ergebnisse für den U-Test von Mann und Whitney an.  $p_T$  steht für die aus dem Test nach Tarone berechneten Ergebnisse. Unterschiedliche n-Werte in den einzelnen Gruppen ergeben sich daraus, dass nur die auswertbaren Ergebnisse statistisch ausgewertet wurden.

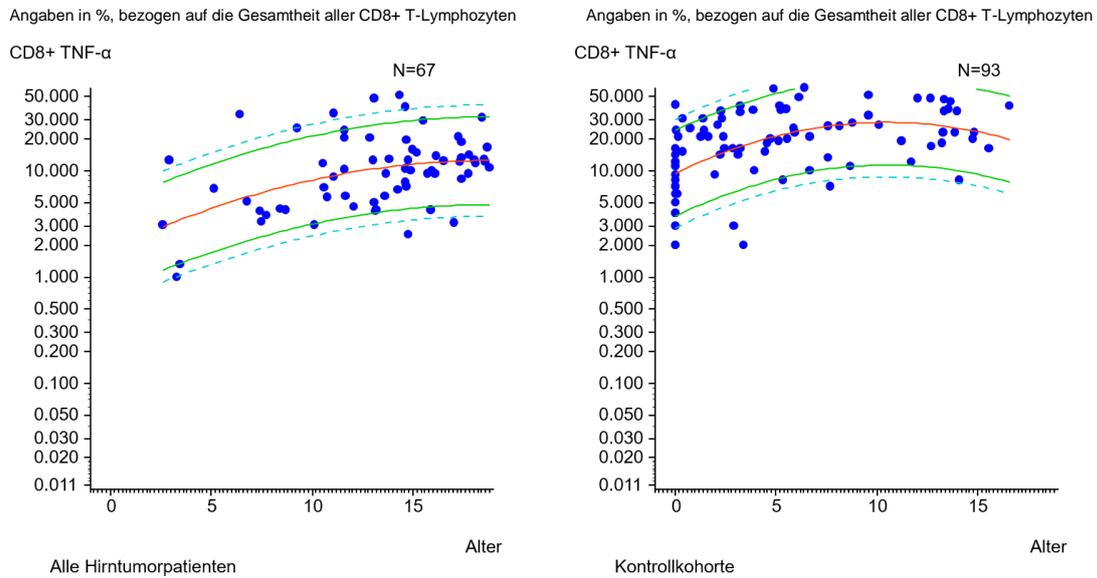
#### **3.5.1. Alle HIT: FACS-Daten Vergleich mit Normalbevölkerung**

In der statistischen Auswertung der Cytokinausschüttung aller Hirntumorpatienten verglichen mit einer Vergleichskohorte aus der Normalbevölkerung zeigten sich signifikante Unterschiede für IL-4 in den CD3+ und CD4+ Zellen, IFN- $\gamma$  in den CD4+ Zellen, TNF- $\alpha$  in den CD8+ Zellen und TGF- $\beta$  in den CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen. Alle weiteren Auswertungen ergaben keine statistischen Unterschiede.

### 3. Ergebnisse

#### TNF- $\alpha$

Es konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  in CD8+ Zellen bei Hirntumorpatienten signifikant niedriger ist als in der Kontrollkohorte.



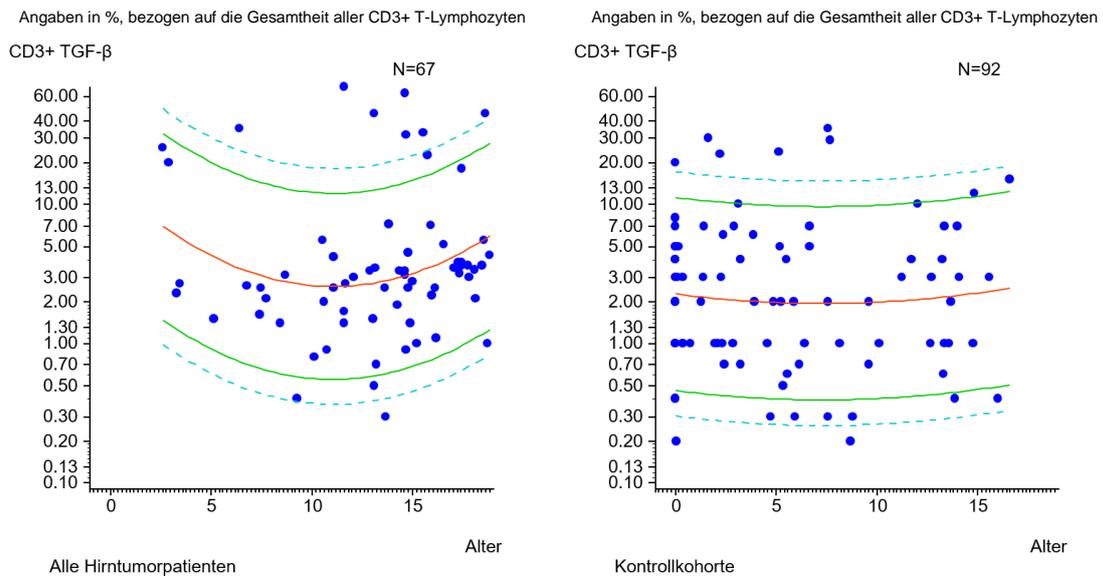
**Abbildung 18:** FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD8+ TNF- $\alpha$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
CD8+ TNF- $\alpha$	Patienten	60	0.520	0.445	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Kontrolle	93	1.219	0.766	***	***

### 3. Ergebnisse

#### TGF- $\beta$

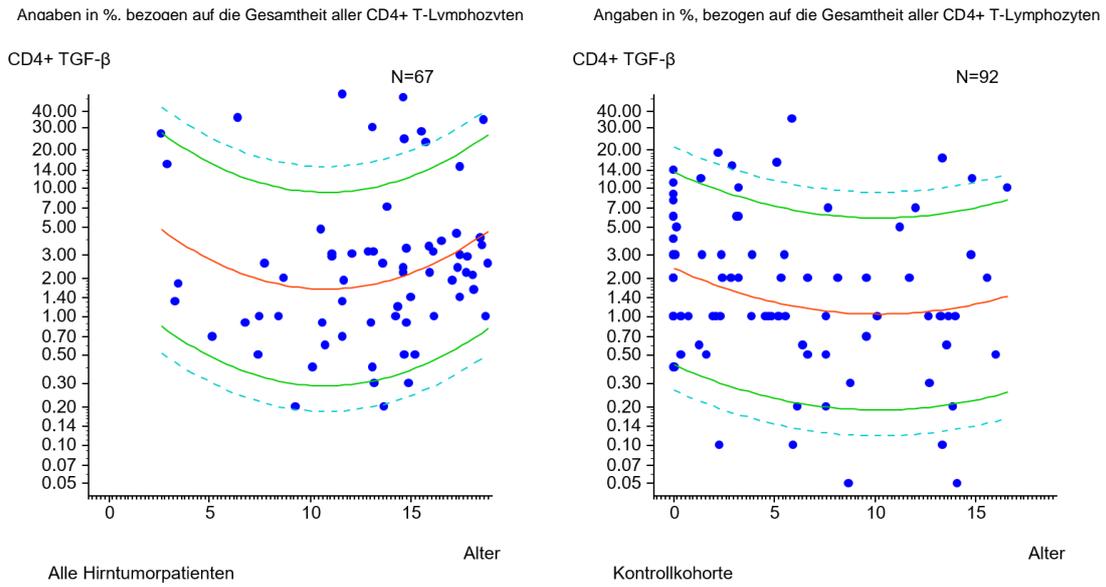
In der statistischen Auswertung zeigte sich, dass TGF- $\beta$  sowohl in CD3+, als auch in CD4+ und CD8+ Zellen signifikant mehr ausgeschüttet wird als in der Vergleichskohorte.



**Abbildung 19:** FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD3+ TGF- $\beta$

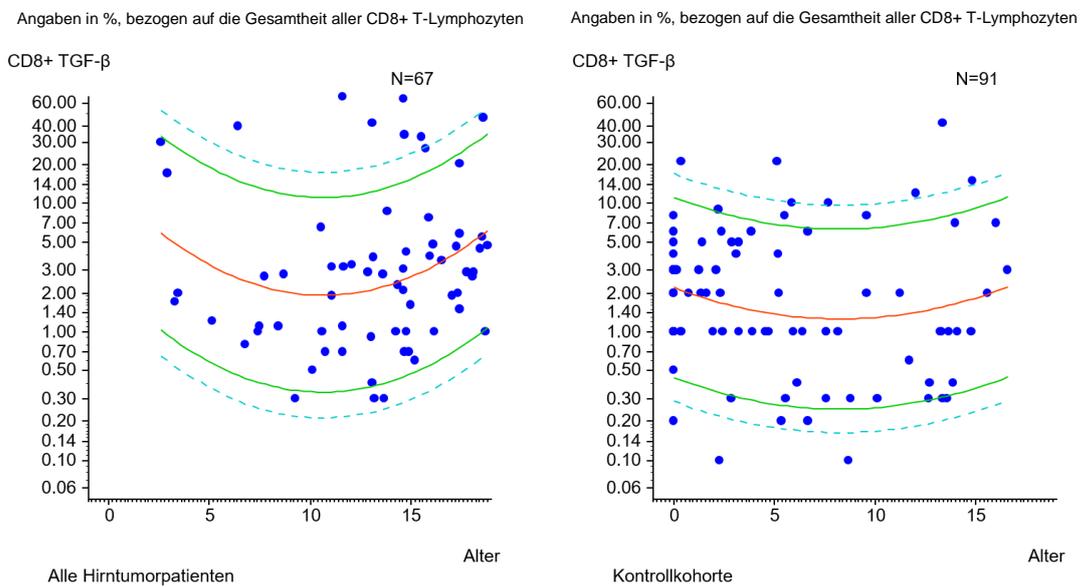
		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
CD3+ TGF- $\beta$	Patienten	60	5.468	9.980	0.0046	0.014
	Kontrolle	91	2.165	3.701	**	*

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 20:** FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD4+ TGF- $\beta$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
CD4+ TGF- $\beta$	Patienten	60	3.936	6.913	0.028	0.043
	Kontrolle	92	2.101	3.117	*	*



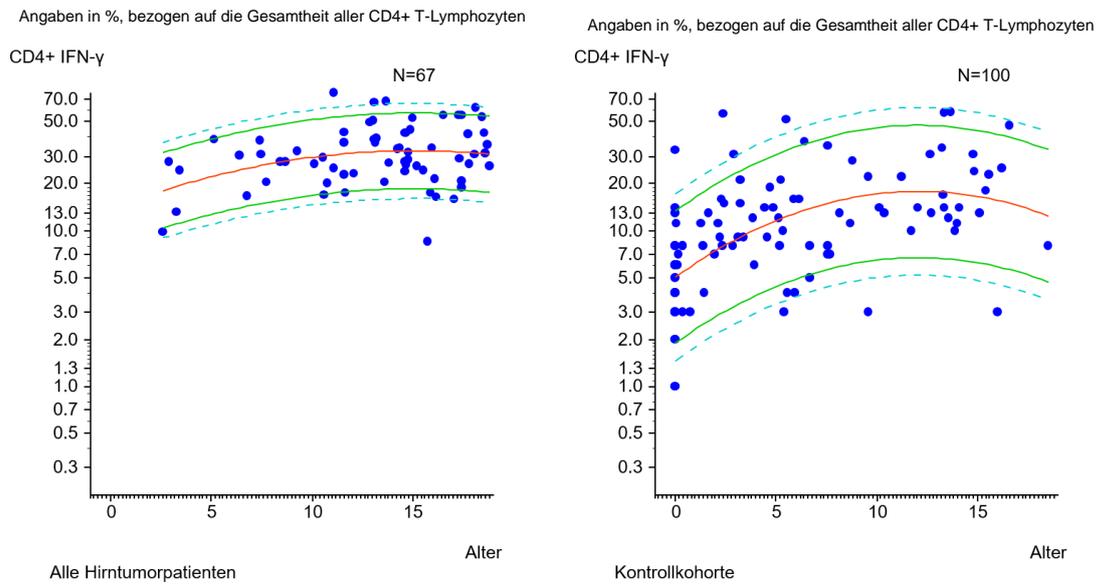
**Abbildung 21:** FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD8+ TGF- $\beta$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
CD8+ TGF- $\beta$	Patienten	60	5.721	10.353	0.0050	0.0045
	Kontrolle	92	2.340	3.865	**	**

### 3. Ergebnisse

#### IFN- $\gamma$

Es ist festzustellen, dass in der Gruppe aller Hirntumorpatienten die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  in CD4+ Zellen signifikant höher ist als in der Vergleichskohorte.



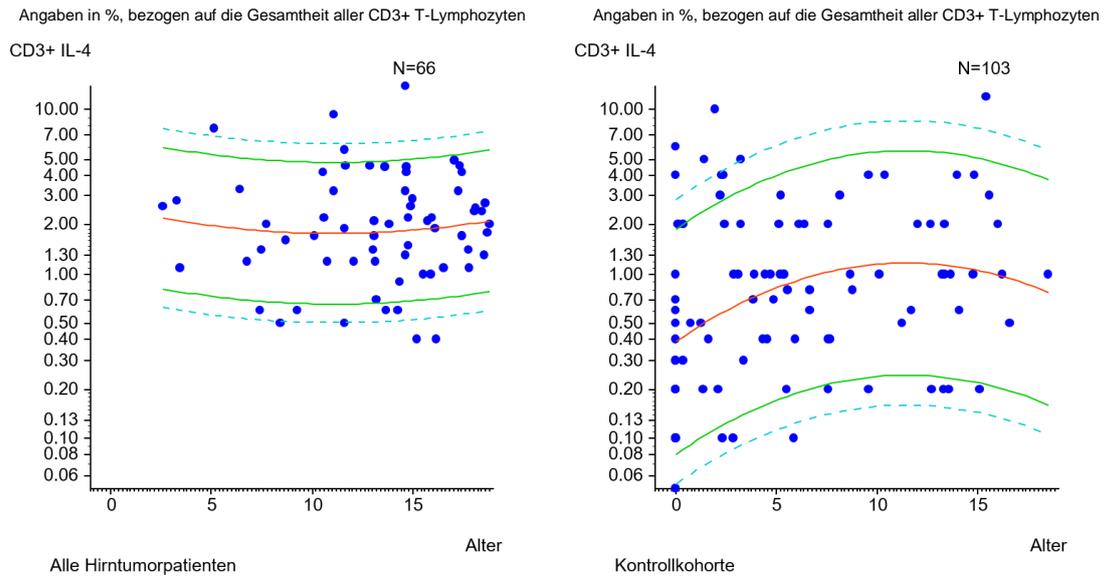
**Abbildung 22:** FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD4+ IFN- $\gamma$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
CD4+ IFN- $\gamma$	Patienten	60	2.054	0.877	0.00002	$p < 0,001$ ***
	Kontrolle	99	1.311	1.131	***	

### 3. Ergebnisse

#### IL-4

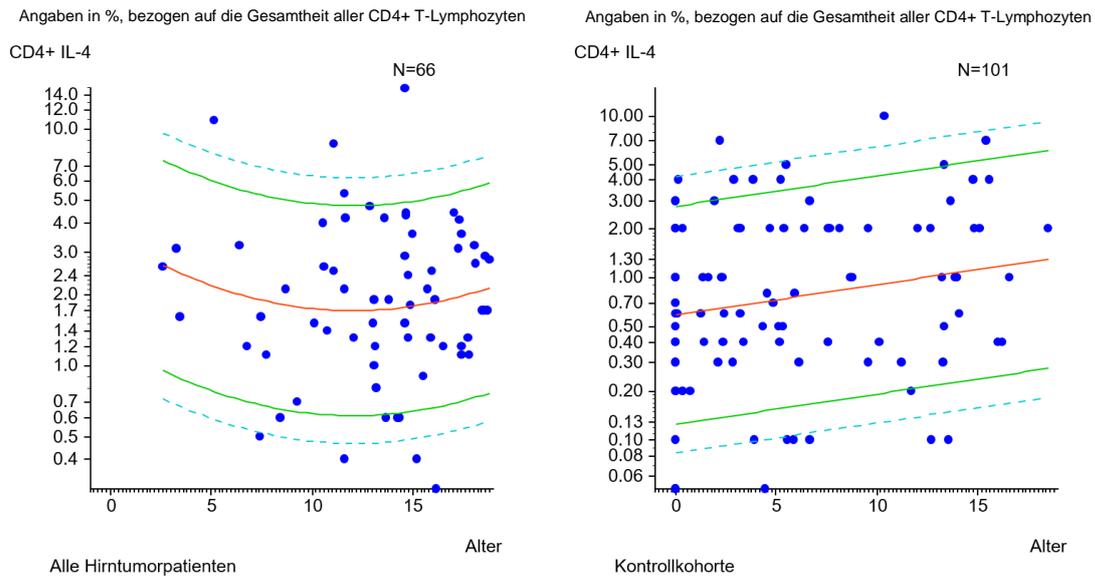
Es ist zu erkennen, dass die Cytokinausschüttung von IL-4 in CD3+ und CD4+ Zellen in der Gruppe aller Hirntumorpatienten signifikant höher ist als in der Vergleichskohorte ( $p=0.00008$ ,  $p=0.0016$ ).



**Abbildung 23:** FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD3+ IL-4

		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
CD3+ IL-4	Patienten	59	2.605	2.363	0.21	0.00008
	Kontrolle	102	2.023	3.107		***

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 24:** FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD4+IL-4

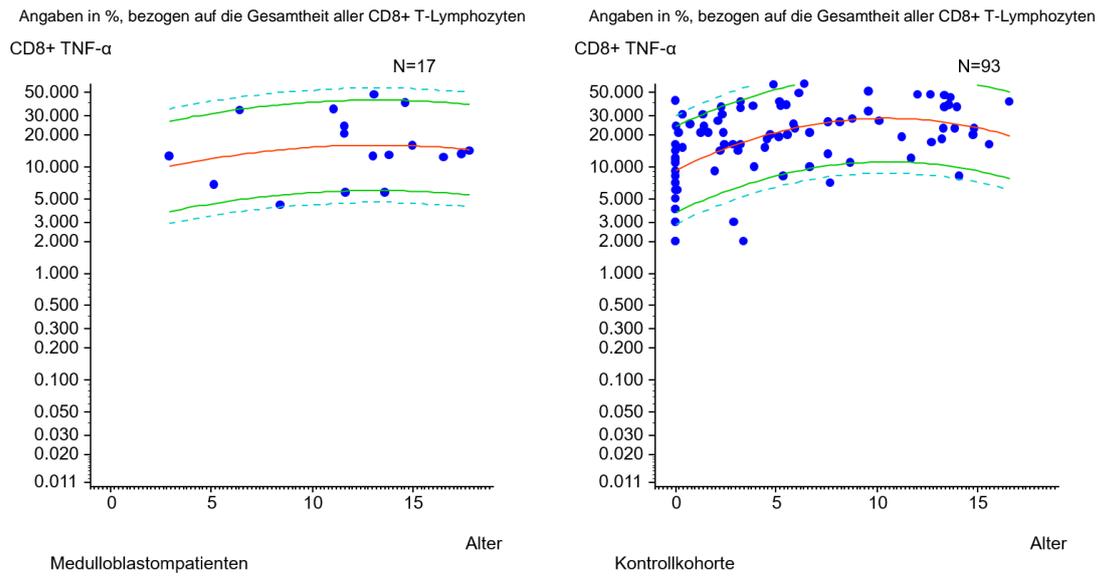
		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
CD4+ IL-4	Patienten	59	2.591	2.668	0.046	0.0016
	Kontrolle	100	1.827	2.070	*	**

### 3. Ergebnisse

#### 3.5.2. Medulloblastompatienten: FACS-Daten Vergleich mit Normalbevölkerung

##### TNF- $\alpha$

Die CD8+ Zellen haben in unserer Patientenkohorte eine signifikant geringere Produktion an TNF- $\alpha$  als die Vergleichskohorte.



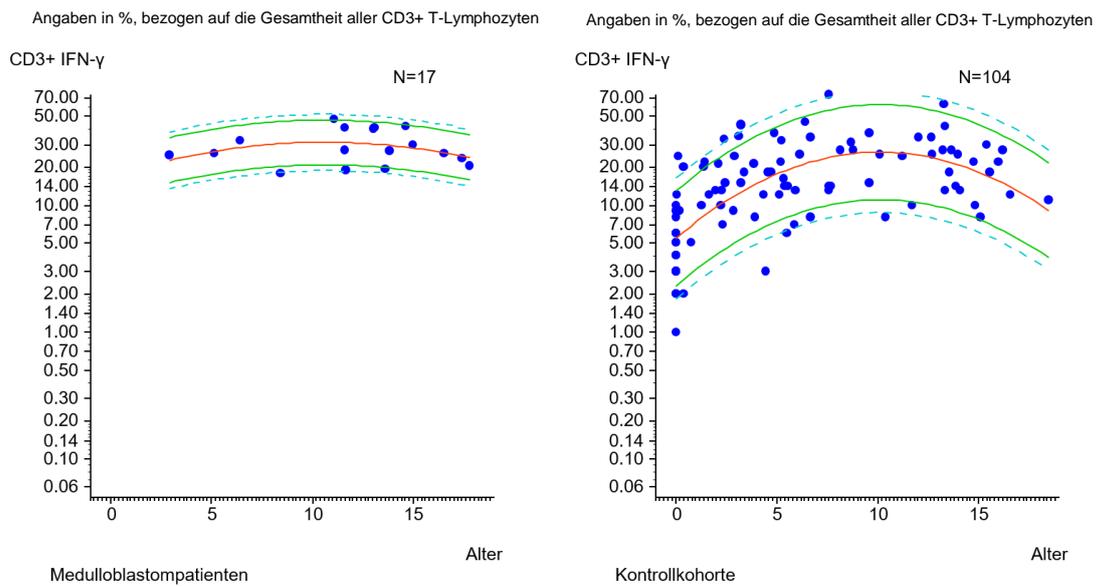
**Abbildung 25:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD8+ TNF- $\alpha$

		n	MW	ST	p <sub>t</sub>	p <sub>U</sub>
CD8+ TNF- $\alpha$	Patienten	17	0.771	0.520	0.022	0.0078
	Kontrollen	93	1.219	0.766	*	**

### 3. Ergebnisse

#### IFN- $\gamma$

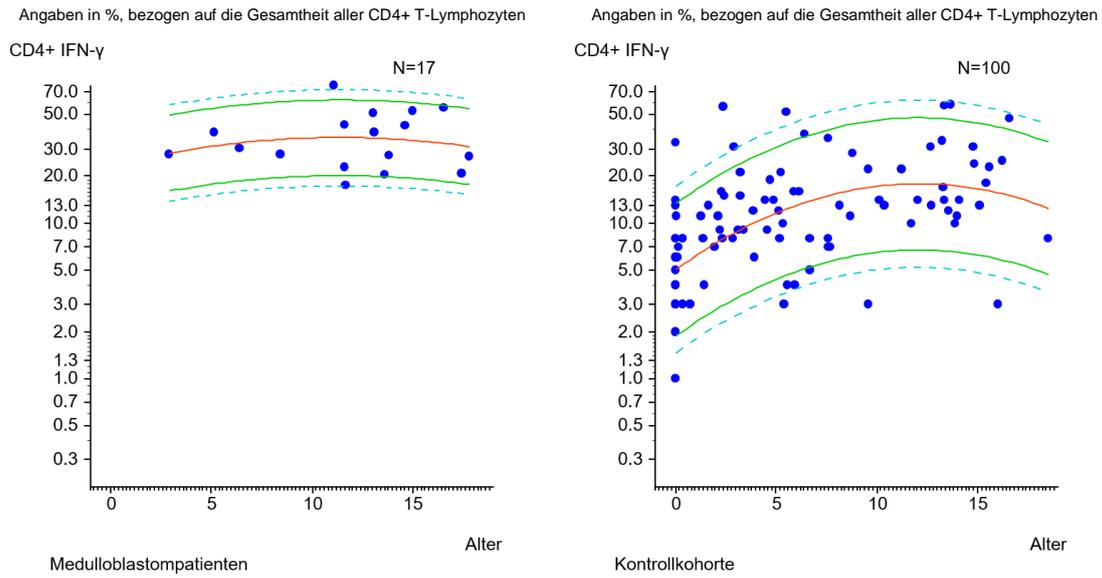
Für CD3+ und CD4+ Zellen konnte bei Medulloblastompatienten eine signifikant höhere Produktion an IFN- $\gamma$  im Vergleich zu Normalbevölkerung gezeigt werden. Bei den Memory-Lymphozyten zeigte sich eine signifikant niedrigere Produktion an IFN- $\gamma$  als in der Vergleichskohorte.



**Abbildung 26:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD3+ IFN- $\gamma$

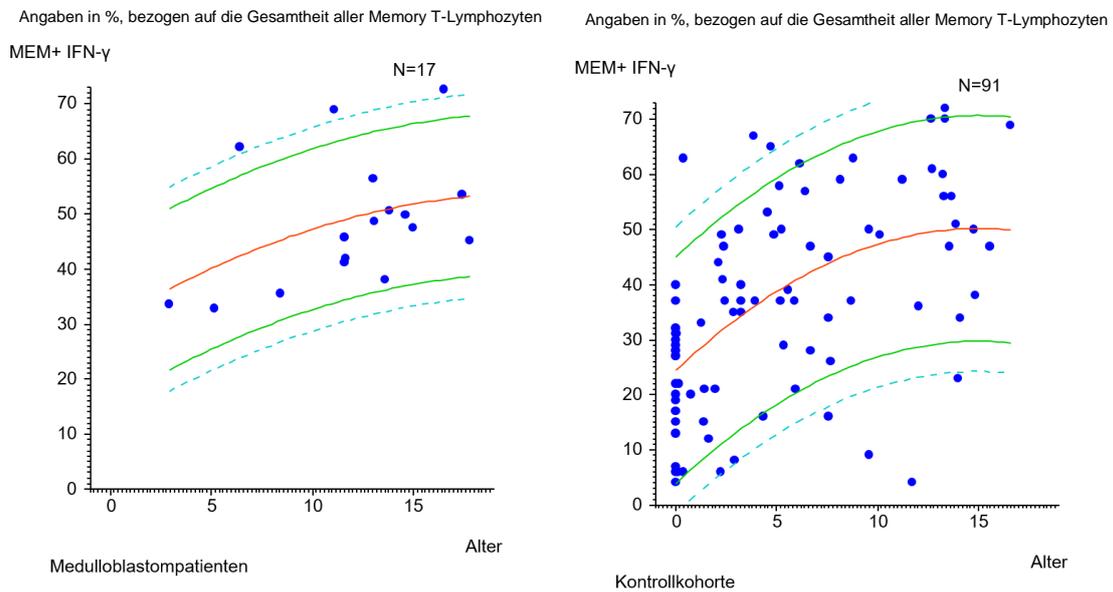
		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
CD3+ IFN- $\gamma$	Patienten	17	1.531	0.436	0.063	0.0056
	Kontrollen	104	1.192	0.723		**

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 27:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD4+ IFN- $\gamma$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
CD4+ IFN- $\gamma$	Patienten	17	2.371	0.982	0.00037	$p < 0,001$
	Kontrollen	100	1.303	1.128	***	***



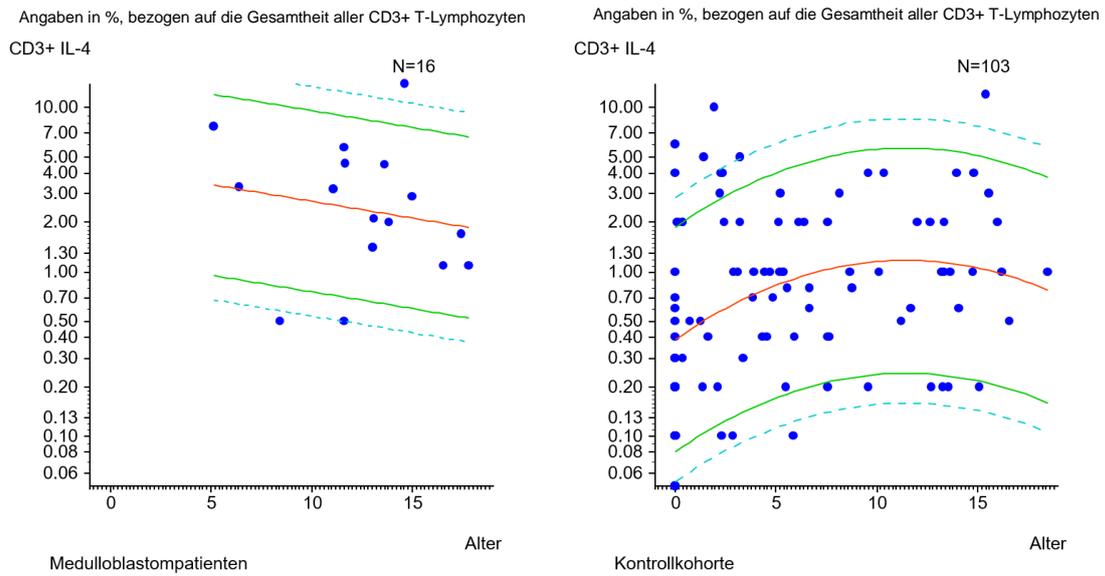
**Abbildung 28:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe MEM+ IFN- $\gamma$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
MEM+ IFN- $\gamma$	Patienten	17	0.880	10.521	0.91	0.0012
	Kontrollen	91	1.000	0.452		**

### 3. Ergebnisse

#### IL-4

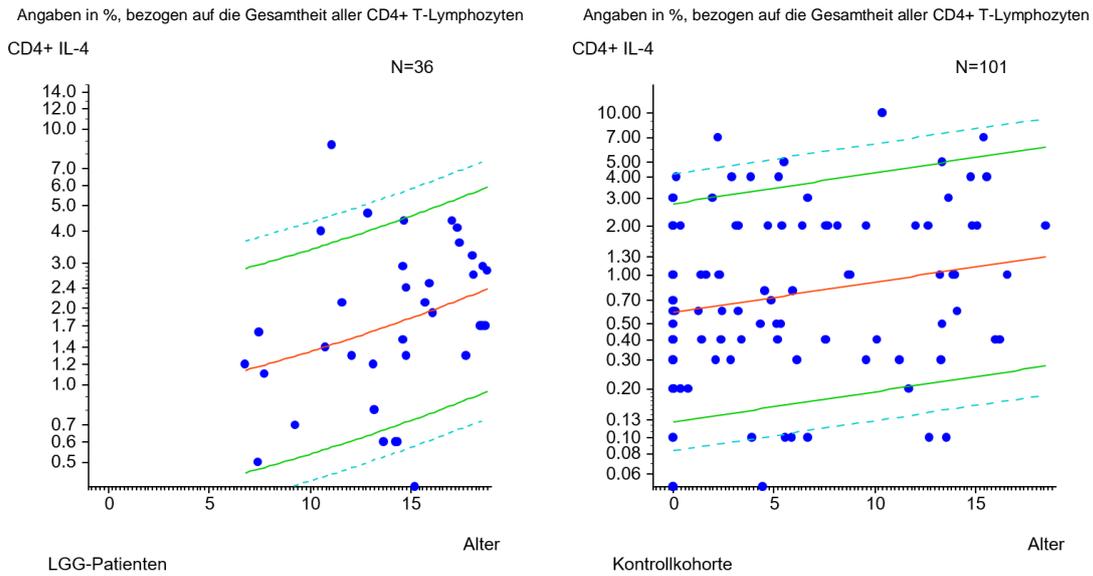
Für IL-4 konnte eine signifikant höhere Ausschüttung bei CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen bei Medulloblastompatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung berechnet werden.



**Abbildung 29:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD3+ IL-4

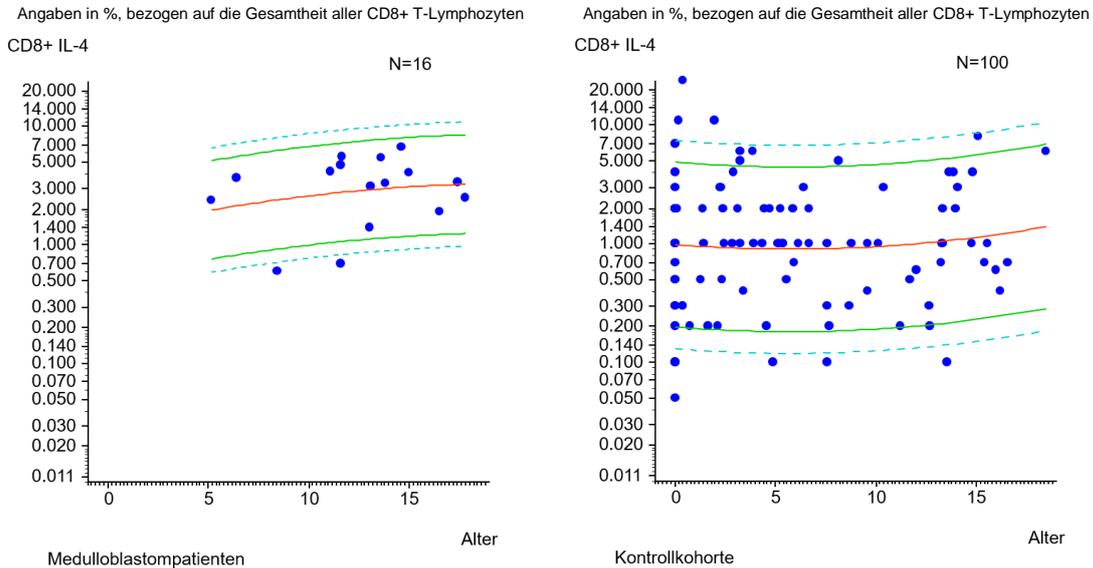
		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
CD3+ IL-4	Patienten	16	3.515	3.458	0.078	0.0018
	Kontrollen	103	2.015	3.093		**

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 30:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD4+ IL-4

		n	MW	ST	p <sub>t</sub>	p <sub>U</sub>
CD4+ IL-4	Patienten	16	3.806	4.226	0.0033	0.0085
	Kontrollen	101	1.826	2.060	**	**



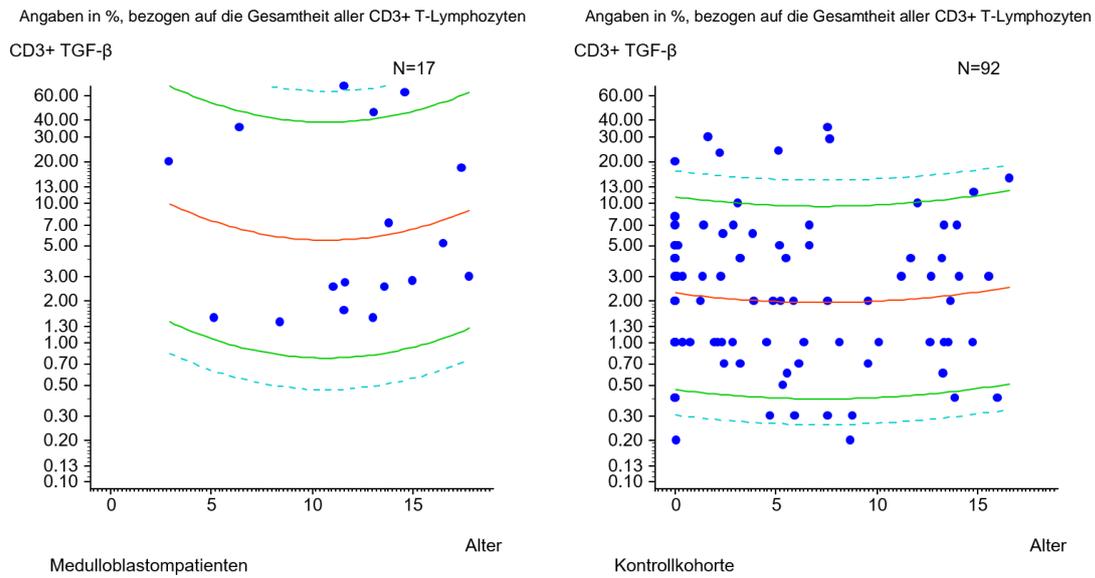
**Abbildung 31:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD8+ IL-4

		n	MW	ST	p <sub>t</sub>	p <sub>U</sub>
CD8+ IL-4	Patienten	16	3.308	1.718	0.13	0.00032
	Kontrollen	100	2.042	3.270		***

### 3. Ergebnisse

#### TGF- $\beta$

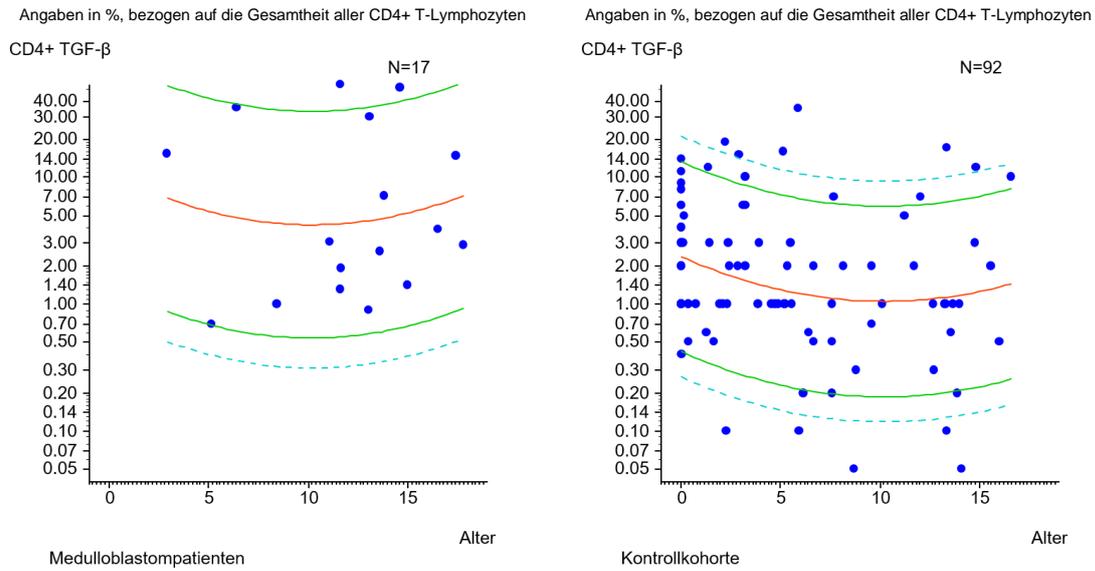
In der statistischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass die CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen der Medulloblastompatienten signifikant mehr TGF- $\beta$  produzieren als in der Vergleichskohorte.



**Abbildung 32:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD3+ TGF- $\beta$

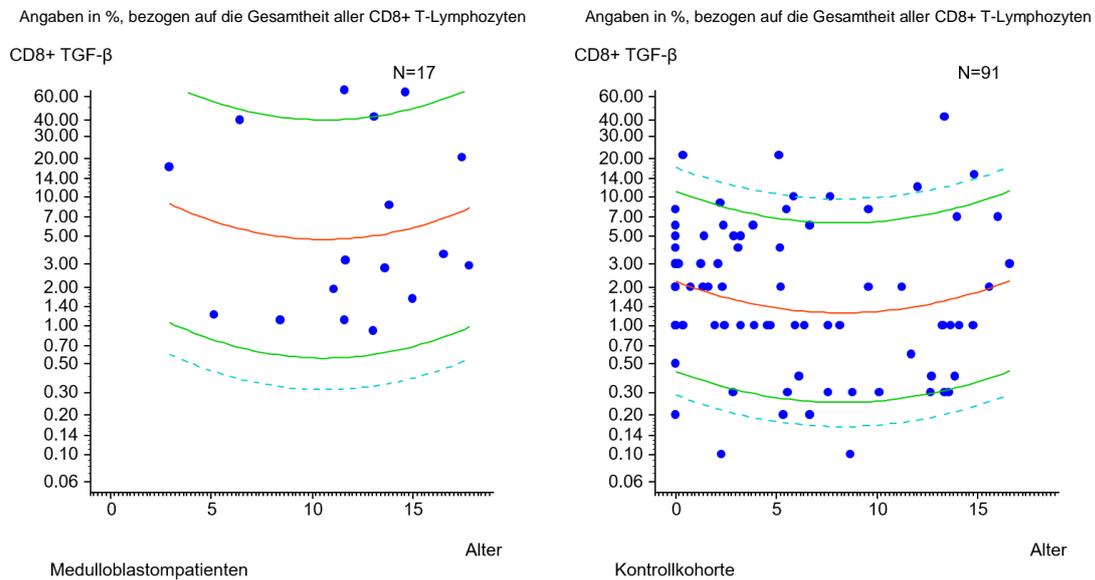
		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
CD3+ TGF- $\beta$	Patienten	17	11.029	15.352	$p < 0,001$	0.00097
	Kontrollen	91	2.165	3.701	***	***

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 33:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD4+ TGF- $\beta$

		n	MW	ST	p <sub>t</sub>	p <sub>U</sub>
CD4+ TGF- $\beta$	Patienten	17	7.915	10.796	0.00003	0.0058
	Kontrollen	92	2.101	3.117	***	**



**Abbildung 34:** FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD8+ TGF- $\beta$

		n	MW	ST	p <sub>t</sub>	p <sub>U</sub>
CD8+ TGF- $\beta$	Patienten	17	11.520	15.784	p < 0,001	0.00027
	Kontrollen	92	2.340	3.865	***	***

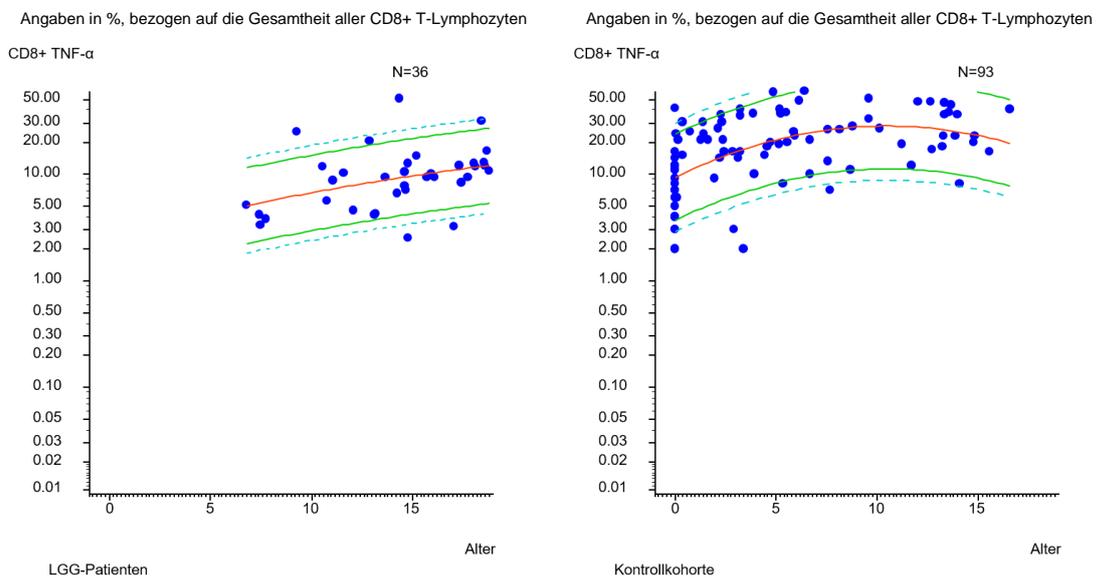
### 3. Ergebnisse

#### 3.5.3. LGG: FACS-Daten Vergleich mit Normalbevölkerung

Es zeigten sich tendenzielle bis signifikante Unterschiede für die Cytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-4. Für TGF- $\beta$  konnten keine Signifikanzen berechnet werden.

#### TNF- $\alpha$

Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von TNF- $\alpha$  in CD8+ Zellen signifikant niedriger war als in der Vergleichskohorte.



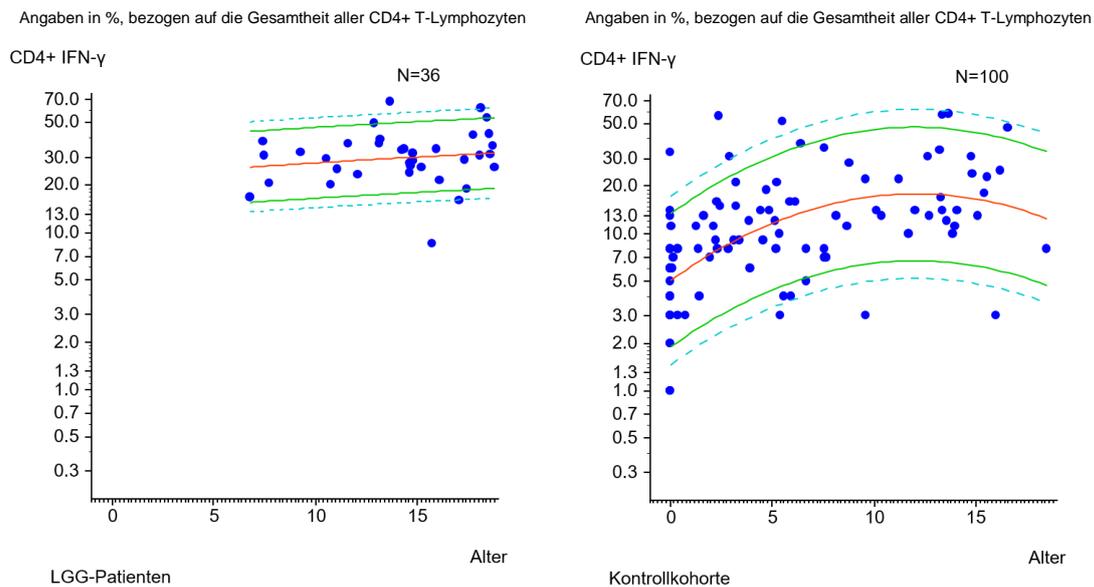
**Abbildung 35:** FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD8+ TNF- $\alpha$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
CD8+ TNF- $\alpha$	Patienten	30	0.409	0.375	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Kontrollen	93	1.219	0.766	***	***

### 3. Ergebnisse

#### IFN- $\gamma$

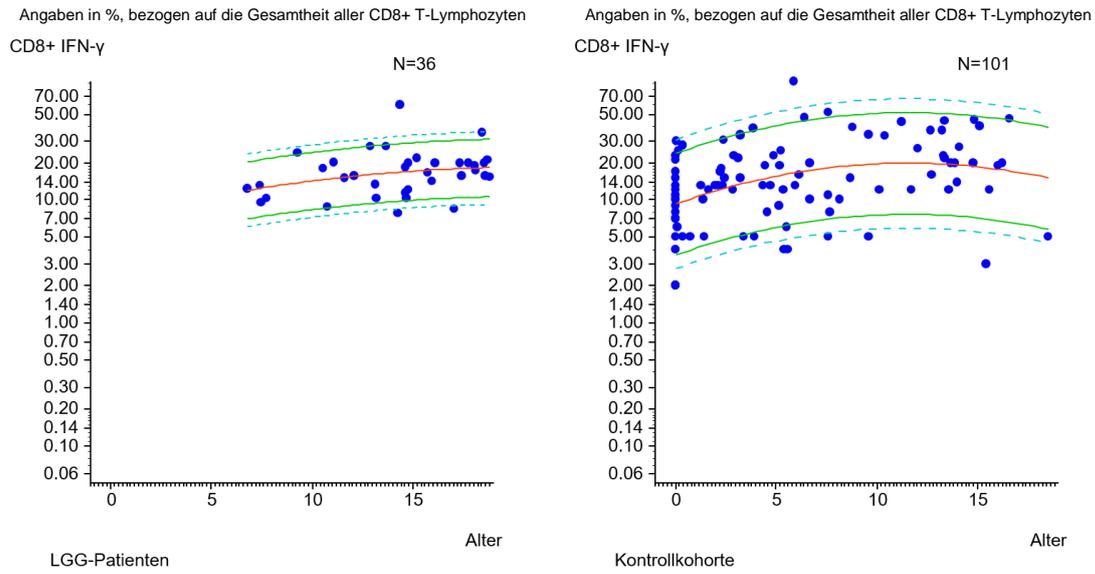
Bei CD4+ war die Ausschüttung an IFN- $\gamma$  in der Studienkohorte signifikant höher als in der Normalbevölkerung. Bei Memory-Lymphozyten war ebenfalls eine erhöhte Produktion an IFN- $\gamma$  in der Studienkohorte zu erkennen ( $p=0.054$ ). Bei CD8+ hingegen war die Produktion an IFN- $\gamma$  tendenziell niedriger als in der Vergleichskohorte ( $p=0.098$ ).



**Abbildung 36:** FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD4+ IFN- $\gamma$

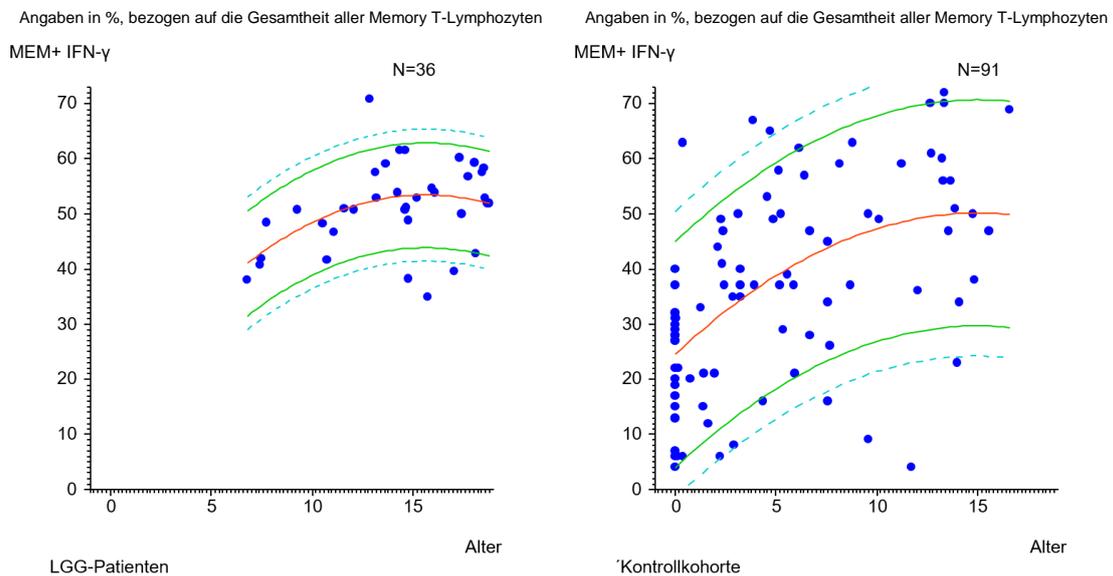
		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
CD4+ IFN- $\gamma$	Patienten	30	1.873	0.686	0.0098	$p < 0,001$
	Kontrollen	100	1.303	1.128	**	***

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 37:** FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD8+ IFN- $\gamma$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
CD8+ IFN- $\gamma$	Patienten	30	0.918	0.513	0.040	0.054
	Kontrollen	101	1.269	0.882	*	



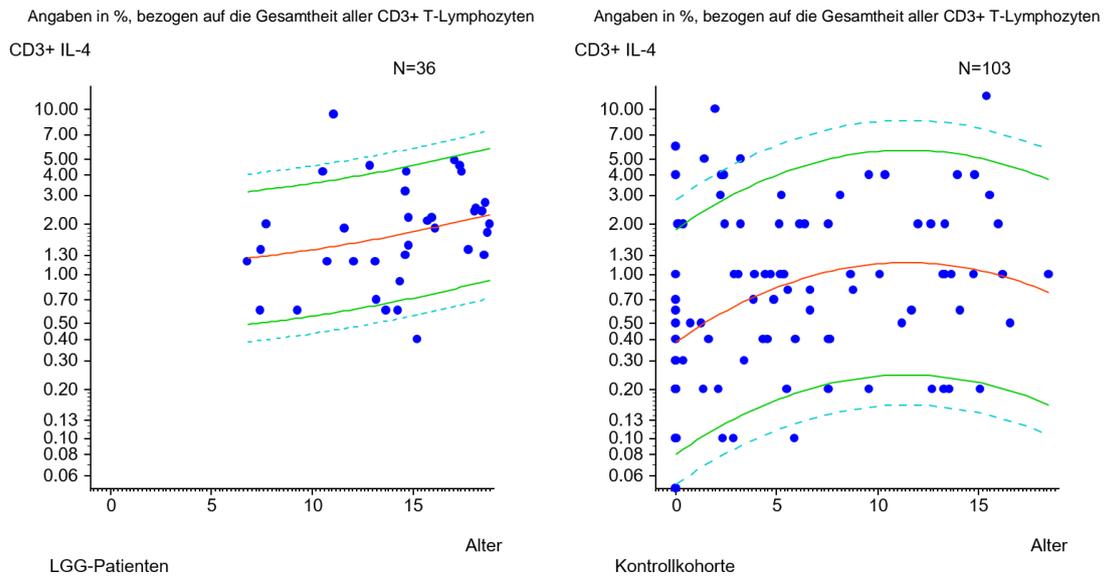
**Abbildung 38:** FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe MEM+ IFN- $\gamma$

		n	MW	ST	$p_t$	$p_u$
MEM+ IFN- $\gamma$	Patienten	30	2.159	8.279	0.18	0.098
	Kontrollen	91	1.000	0.452		

### 3. Ergebnisse

#### IL-4

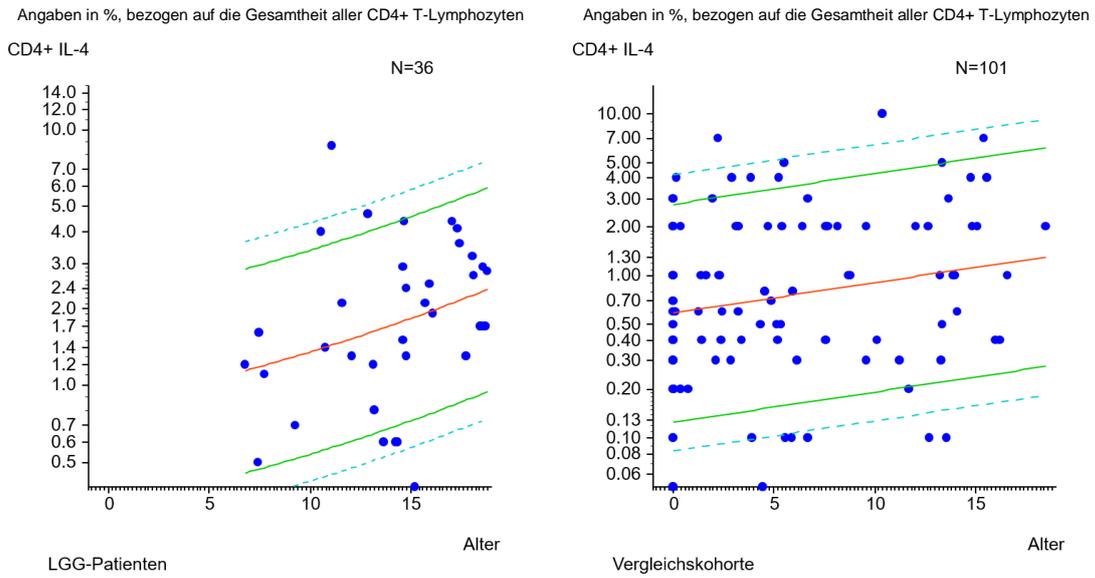
Für die Produktion von IL-4 in CD3+ und CD4+ Zellen konnte statistisch beobachtet werden, dass in der Gruppe der LGG-Patienten die Produktion an IL-4 signifikant niedriger ist als in der Vergleichskohorte.



**Abbildung 39:** FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD3+ IL-4

		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
CD3+ IL-4	Patienten	30	2.305	1.936	0.63	0.0091
	Kontrollen	103	2.015	3.093		**

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 40:** FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD4+ IL-4

		n	MW	ST	$p_t$	$p_U$
CD4+ IL-4	Patienten	30	2.159	1.780	0.43	0.035
	Kontrollen	101	1.826	2.060		*

## 4. Diskussion

In der körpereigenen zellulären Abwehr von Pathogenen spielen Cytokine als lösliche Mediatoren durch ihre Induktion, aber auch Beendigung der Immunantwort eine zentrale Rolle. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) einen Einfluss auf die Höhe der Produktion der unterschiedlichen Cytokine und deren Effekt auf das Immunsystem haben (Wilson et al. 1992, Nieters et al. 2001). Es ist zahlreiche klinische Studien belegt, dass die Immunität des Patienten einen Einfluss auf die Prognose einer malignen Erkrankung hat (Ioachim 1990, Mueller et al. 1995, Swann et al. 2007, Corthay 2014).

Ziel dieser Studie war daher, die Wirkung von unterschiedlichen Cytokin Gen-Polymorphismen auf die Entstehung und Prognose von Hirntumoren bei Kindern zu untersuchen, und mit Hilfe der Durchflusszytometrie eventuelle Unterschiede zwischen einer gesunden Patientenkohorte und der Studienpopulation darzulegen. Als Subpopulationen wurden besonders an niedriggradigen Gliomen und Medulloblastom erkrankte pädiatrische Patienten betrachtet.

### 4.1. TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  wird allgemein als proinflammatorisches Cytokin verstanden, welches zeitlich früh in der immunologischen Antwort auf eine Infektion von Monozyten und T-Zellen ausgeschüttet wird. Der SNP an der Promotor Position -308 wurde ursprünglich von Wilson et al. beschrieben und hat nachweislich einen Einfluss auf die Produktion von TNF- $\alpha$  (Wilson et al. 1992). Es können das häufigere G-Allel, welches mit niedrigeren Plasmakonzentrationen an TNF- $\alpha$  in Verbindung gebracht wird, und das seltenere A-Allel, assoziiert mit einer im Vergleich sechs bis siebenmal höheren Produktion an TNF- $\alpha$ , unterschieden werden.

Das wesentliche Resultat vorliegender Studie ist die signifikant niedrigere Ausschüttung von TNF- $\alpha$  in CD8+ Lymphozyten bezogen auf die Vergleichskohorte. Dies trifft sowohl auf benigne als auch maligne Hirntumore zu. TNF- $\alpha$  ist entscheidend für die durch CD8+ Lymphozyten vermittelte Cytolyse. (Ratner et al. 1993). Für verschiedene Tumorentitäten konnte gezeigt

#### 4. Diskussion

werden, dass insbesondere CD8+ Lymphozyten ein entscheidender prognostischer Marker sein können und wesentlich das Mikromilieu des Tumors bestimmen (Hadrup et al. 2013). Die Produktion an TNF- $\alpha$  scheint deshalb ein entscheidender Einflussfaktor bei pädiatrischen Hirntumorerkrankungen zu sein.

In einem weiteren Schritt wurden die Genotypen der in den einzelnen Studiengruppen untersucht. Die Verteilung der Genotypen A/A (high), A/G (high) und G/G (low) ergab keinen Unterschied zwischen der Studienkohorte und der Normalbevölkerung. Einzig hinsichtlich des Einflusses auf die Prognose aller Hirntumorentitäten zeigte sich ein knapp nicht signifikanter Unterschied des Genotyps für TNF- $\alpha$  -308. Der mit einer hohen Ausschüttung an TNF- $\alpha$  assoziierte Genotyp A/A zeigte ein niedrigeres Auftreten an Rezidiven als die beiden Genotypen A/G (high) und G/G (low).

Lauten et al., die in Zusammenhang mit pädiatrischen ALL Erkrankungen den Einfluss des TNF- $\alpha$  Cytokin Gen-Polymorphismus untersuchten, konnten ebenfalls keinen prognosebestimmenden Unterschied finden. Dem widersprechen die Ergebnisse von Seidemann et al., die bei pädiatrischen Non-Hodgkin-Lymphom Patienten für den TNF- $\alpha$  Cytokin Gen Polymorphismus Genotyp A/A (high) ein schlechteres Outcome nachwiesen (Lauten et al. 2002, Seidemann et al. 2005).

Die Eigenschaft, die TNF- $\alpha$  durch die Literatur zugeschrieben werden (vergl. Kap. 1.8.4.), lassen vermuten, dass mit einer höheren Produktion an TNF- $\alpha$  und eine dadurch bedingt stärkere Aktivierung des Immunsystems eine bessere Prognose in onkologischen Erkrankungen vergesellschaftet sein könnte.

Eine Gegenhypothese ist, dass die durch TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose im Tumorgewebe durch die Ausschaltung von Caspase-8 herunter reguliert ist (Jiang et al. 2008, Hacker et al. 2009). Dieser Standpunkt, dass der TNF- $\alpha$  Polymorphismus sehr wohl einen Einfluss auf die Prognose bestimmter Erkrankungen hat, wird durch Studien bestätigt, die sich mit dem Einfluss des TNF- $\alpha$  Polymorphismus auf die Prognose von Krankheiten beschäftigt hatten, bei denen der Status des Immunsystems eine entscheidende Rolle spielt. So konnte

#### 4. Diskussion

nachgewiesen werden, dass das TNF A-Allel bei Nieren- und Lebertransplantationspatienten mit einem erhöhten Risiko einer Abstoßungsreaktion einhergeht. Bei Zustand nach Knochenmarktransplantation zeigte das Vorhandensein des A-Allels ein erhöhtes Risiko für eine schwere Form der Graft-versus-Host Disease (GvHD) (Sankaran et al. 1999, Bathgate et al. 2000, Takahashi et al. 2000).

Die Bedeutung des TNF- $\alpha$  liegt in der Initiation, Verstärkung oder Prolongierung einer inflammatorischen Reaktion. TNF- $\alpha$  ist deswegen auch in der Auto-Immunität und Allo-Immunität von zentraler Bedeutung. So konnte beispielsweise die Wirksamkeit der TNF- $\alpha$ -Blocker in der Behandlung von M. Crohn nachgewiesen werden (Targan et al. 1997). Auch in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis sind TNF- $\alpha$ -Blocker wirkungsvoll (Seymour et al. 2001).

Bei Karzinomerkrankungen konnte gezeigt werden, dass höhere TNF- $\alpha$  Plasmakonzentrationen in unterschiedlichen fortgeschrittenen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom, Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom, dem Asbest-assoziiertem Lungenkarzinom und Prostatakarzinom vorzufinden waren (Partanen et al. 1995, Leek et al. 1998, Karayiannakis et al. 2001, Yoshida et al. 2002, Pfitzenmaier et al. 2003).

Eine Studie von Winkler und Wiegering et al. konnte zeigen, dass bei an einem Medulloblastom erkrankten Kindern, die nach dem German-Austrian-Swiss HIT-2000-Protokoll und autologer Stammzelltransplantation behandelt wurden, das Outcome bei höheren Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in den T-Zellen signifikant besser war (Wiegering et al. 2011).

Die Ergebnisse der FACS-Analysen in vorliegender Studie bestätigen mit einer niedrigeren Ausschüttung von TNF- $\alpha$  in CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nun diese Hypothese. Die Produktion von TNF- $\alpha$  ist ein wichtiger Bestandteil einer erfolgreichen T-Zell vermittelten Immunität gegenüber Tumorgewebe und signifikant in pädiatrischen Patienten mit Hirntumorerkrankung alteriert.

## 4.2. Interferon- $\gamma$

IFN- $\gamma$  wird, ebenso wie TNF- $\alpha$ , als proinflammatorisches Cytokin verstanden. Es wird vor allem von T-Zellen und NK-Zellen produziert und findet seine Bedeutung in der antiviralen Abwehr, Immunüberwachung, der Inhibierung von zellulärer Proliferation und der Tumorsuppression (Bach et al. 1997, Boehm et al. 1997, Ikeda et al. 2002). IFN- $\gamma$  besitzt eine besondere Bedeutung in der Behandlung von Medulloblastompatienten. Es wurde gezeigt, dass bei bestimmten Medulloblastom-Zelllinien das Versagen der TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induzieren Apoptose mit einem Verlust von Caspase-8 einhergeht, welche wichtig für die Initiierung der Apoptose ist (Zuzak et al. 2002). IFN- $\gamma$  reinduziert die Expression von Caspase-8, woraus eine erhöhte Effektivität der Radio- und Chemotherapie resultiert (Fulda et al. 2006, Meister et al. 2007).

Im Vergleich mit der Normalbevölkerung zeigte sich in den untersuchten Studienkohorten kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Distribution des Cytokin Gen-Polymorphismus für IFN- $\gamma$ . Auch bei der Allel-Frequenz konnten keine Abweichungen ausgemacht werden. Diese Ergebnisse unterstützen nicht die Resultate anderer Studien, nach denen der Genotyp A/A (low) vermehrt bei Patienten mit Cervixkarzinomen und pädiatrischen hoch-Risiko precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) zu finden ist (Cloppenborg et al. 2005, Gangwar et al. 2009).

Betrachten man den Einfluss des Cytokin Gen-Polymorphismus für IFN- $\gamma$  auf die Prognose, so lässt sich in der Subgruppe der an einem niedriggradigen Gliom erkrankten Patienten eine interessante Beobachtung machen. Das EFS des mit einer niedrigen Plasmakonzentration von IFN- $\gamma$  assoziierten Genotyps A/A (low) ist über 5 und 10 Jahre signifikant niedriger verglichen mit den Genotypen T/A und T/T.

Beim Vergleich des EFS für die Genotypen des Cytokin Gen-Polymorphismus für IFN- $\gamma$  zeigte sich für die Gruppe LGG-Patienten ein signifikanter Unterschied. Während der Genotyp T/T (high) ein EFS von 88.82% über 10 Jahre präsentierte, waren es beim Genotyp T/A (intermediate) 64.47% und beim Genotyp A/A (low)

#### 4. Diskussion

41.58%. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine erhöhte in den Zellen assoziierte Produktion von IFN- $\gamma$  möglicherweise mit einem verbesserten Outcome der Patienten verbunden ist.

Diese Beobachtung unterstreicht die schon für TNF- $\alpha$  postulierte Hypothese, dass Cytokin Gen-Polymorphismen, die mit einer niedrigeren Plasmakonzentration an IFN- $\gamma$  assoziiert sind und deswegen mutmaßlich zu einer geringeren TH1-Antitumor-Immunantwort führen auch mit einer schlechteren Prognose bzgl. des EFS vergesellschaftet sind.

Liu et al. untersuchten den Einfluss von Cytokin Gen Polymorphismen bei Patienten mit einem malignen Melanom im Stadium 4. Hierbei zeigte sich, dass der Genotyp T/T (high) mit einer schlechteren Prognose und einem schlechteren Ansprechen auf die Chemotherapie einherging (Liu et al. 2005).

In vorliegender Untersuchung der Cytokinausschüttung in der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass IFN- $\gamma$  in CD4+ signifikant mehr produziert wird als in der Normalbevölkerung. Patienten, die an einem Hirntumor erkrankten, weisen eine erhöhte Produktion an IFN- $\gamma$  auf.

Dieses Resultat steht im Widerspruch zu einer protektiven Rolle von IFN- $\gamma$ . Allerdings war die Rolle von IFN- $\gamma$  schon bei Entdeckung der antitumoralen und antiviralen Eigenschaften widersprüchlich. So konnten Taniguchi et al. schon 1987 zeigen, dass nach Injektion von IFN- $\gamma$  exponierten B16 Melanom-Zellen zwar das Wachstum der Zellen in-vitro reduziert werden konnte, bei Impfung von C57BL Mäusen jedoch die Rate an Lungenmetastasen stark anstieg.

Eine mögliche Erklärung ist, dass IFN- $\gamma$  Zellen nach Immunreaktionen von Schäden bei Gewebe-Remodeling und Reparaturprozessen zu schützen vermag. IFN- $\gamma$  könnte das Überleben von Zellen verbessern, die onkogene Mutationen entwickelt haben. Dies würde zur Hypothese von Mellor und Munn passen, wonach eine lokalisierte Inflammation zu einem immunsuppressiven und tumortolerierenden Mikromilieu führt (Mellor et al. 2008).

#### 4. Diskussion

Die Rolle von IFN- $\gamma$  ist demnach sehr vielseitig. So wurde gezeigt, dass IFN- $\gamma$  im sich entwickelnden Gehirn von Mäusen pränatale Medulloblastome induzieren kann. Dem gegenüber steht die spätere Rolle von IFN- $\gamma$  als wichtiger Mediator in der immunologischen Tumorkontrolle (Lin et al. 2004).

In der Gruppe der Medulloblastompatienten zeigte sich in vorliegender Studie jedoch, dass bei Memory T-Lymphozyten die Ausschüttung an IFN- $\gamma$  wiederum signifikant geringer war als in der Vergleichskohorte. Memory T-Zellen sind eine wichtige Schnittstelle bei der Generierung einer adäquaten Tumormunität, besonders hinsichtlich der Tumorstimmung. Es zeigte sich, dass eine einfache Vakzination häufig korruptierte Memory T-Zellen amplifizierte und aus diesem Grund keine adäquate Immunität entwickeln konnte (Ratner et al. 1993). Dieser Prozess scheint auch bei pädiatrischen Medulloblastompatienten eine wichtige Rolle zu spielen.

Winkler und Wiegering et al. zeigten, dass eine hohe Expression von IFN- $\gamma$  in T-Zellen, vor allem in T-Memory-Zellen und Cytotoxischen T-Zellen, die Prognose von an einem Medulloblastom erkrankten Patienten entscheidend verbesserte (Wiegering et al. 2011).

#### **4.3. TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  ist ein allgemein als regulatorisch wirkend angesehenes Cytokin. TGF- $\beta$  hat viele verschiedene Eigenschaften (vergl. Kap. 1.8.5.). Entscheidend für die antitumorale Immunantwort ist, dass TGF- $\beta$  die angeborene und die erworbene Immunität abschwächen kann. Dabei reguliert und blockiert TGF- $\beta$  die Differenzierung von naiven T-Zellen in CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen und CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-Zellen (Swain et al. 1991, Gorelik et al. 2000, Gorelik et al. 2000, Laouar et al. 2005). TGF- $\beta$  fördert die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen. Diese wiederum produzieren TGF- $\beta$ , das TH-1 Zellen inhibiert (Chen et al. 2003).

Bei der Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen zeigt sich für TGF- $\beta_1$  (-10), für TGF- $\beta_1$  (-25) und für die kombinierte Betrachtung der beiden Cytokin Gen-Polymorphismen, dass in den Studienkohorten tendenziell die heterozygoten

#### 4. Diskussion

Genotypen öfter vertreten sind, als die mit hohen TGF- $\beta$ -Plasmaspiegeln assoziierten homozygoten Genotypen.

Bei der Allelfrequenz zeigte sich in der Studienkohorte für TGF- $\beta_1$  (-10) und für TGF- $\beta_1$  (-25) ein teils signifikant häufigeres Vorkommen des C-Allels, welches mit einer niedrigeren Ausschüttung von TGF- $\beta$  in Verbindung gebracht wird.

Im weiteren Vorgehen wurden die Patienten betrachtet, bei denen ein Rezidiv bzw. ein Progress auftrat und die Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen in den beiden Gruppen analysiert. In der Gruppe der LGG-Patienten war für den Cytokin Gen-Polymorphismus TGF- $\beta_1$  (-10) bei den Patienten, bei denen ein Rezidiv auftrat, signifikant häufiger der Genotyp T/T (high) zu finden und bei den Patienten, die kein Rezidiv erlitten, der Genotyp C/C (low) signifikant öfter vorliegend.

Dieses Ergebnis wurde gestützt durch Analyse des EFS der einzelnen Genotypen von TGF- $\beta_1$  (-10) für die Gruppe aller Hirntumorpatienten. Der mit erhöhten TGF- $\beta$  Plasmakonzentrationen assoziierte Genotyp T/T war in der Gruppe aller Hirntumorpatienten und bei den LGG-Patienten signifikant häufiger zu finden.

In der Durchflusszytologie zeigte sich im Vergleich zur Kontrollkohorte, dass sowohl in der Gruppe aller Hirntumorpatienten, als auch bei Medulloblastompatienten die CD3+, CD4+ und CD8+ Lymphozyten eine erhöhte Ausschüttung an TGF- $\beta$  aufweisen.

Ein Resultat dieser Studie ist also, dass es bei Kindern, die einen Hirntumor entwickelt haben, im Vergleich zur Normalbevölkerung es eine starke Disposition zur vermehrten Ausschüttung von TGF- $\beta$  gibt. Die Rolle von TGF- $\beta$  in der Tumormunität ist zweigeteilt. So konnten Biswas et al. 2004 im Mausmodell feststellen, dass die Deaktivierung des TGF- $\beta_2$ -Rezeptors zu einer erhöhten Rate und stärkerem Progress des Colonkarzinoms führte (Biswas et al. 2004).

Ebenso konnten Siegel et al. schon 2003 zeigen, eine Kompromittierung des TGF- $\beta$  Signalweges zur einem früheren Auftreten von Mammatumoren

#### 4. Diskussion

verbunden war (Siegel et al. 2003). TGF- $\beta$  scheint also insbesondere in der frühen Tumorgenese durch Aufrechterhaltung der Cytostase und Induzierung von Apoptose eine Tumorentwicklung zu verhindern.

Obwohl TGF- $\beta$  also eindeutig tumorsuppressive Eigenschaften hat, spielt es für Tumorzellen auch in der Proliferation, der Invasion und der Immunevasion eine Rolle (Massague 2008). In der TGF- $\beta$  induzierten Immunsuppression scheinen insbesondere CD8+ T-Zellen eine entscheidende Stellung inne zu haben, indem die Produktion von cytolytischen Faktoren supprimiert wird (Thomas et al. 2005). Diesen Einfluss hat TGF- $\beta$  auch bei Tumoren und Karzinomen des zentralen Nervensystems, was wir durch vorliegende Ergebnisse gezeigt werden konnte. So produzieren die CD8+ T-Lymphozyten der Medulloblastompatienten signifikant mehr TGF- $\beta$  als Kinder der Vergleichskohorte. Möglicherweise gibt es hierbei jedoch auch Unterschiede, wenn man die Dignität des Tumorgewebes betrachtet. So konnten für die Patienten mit einem niedriggradigen Gliom keine signifikant erhöht Ausschüttung von TGF- $\beta$  in der Durchflusszytometrie gefunden werden.

Die weitere Untersuchung des TGF- $\beta$  Signalweges und die Entwicklung von diesem Signalweg modulierenden Pharmaka ist potenziell auch für die Therapie von pädiatrischen Hirntumoren ein neuer vielversprechender therapeutischer Ansatz. Limitierende Faktoren sind hierbei sicherlich, dass durch eine Supprimierung von TGF- $\beta$  die Inzidenz von Autoimmunerkrankungen, sowie das Auftreten und die mögliche Progression von prämaligen Herden möglicherweise erhöht werden.

#### **4.4.IL-10**

IL-10 wird im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  als immunsuppressives bzw. regulatorisches Cytokin verstanden. IL-10 besitzt insbesondere die Eigenschaft die adaptive Immunität zu inhibieren, ermöglicht Tumorzellen, die Immunreaktion des Organismus zu unterdrücken und der Immunüberwachung zu enttrinnen (Marincola et al. 2000, Mapara et al. 2004, Yang et al. 2004). Bezogen auf Tumorzellen hat IL-10 die Eigenschaften, in vitro die Zellproliferation zu

#### 4. Diskussion

stimulieren und die Zellapoptose zu inhibieren (Alas et al. 2001, Sredni et al. 2004).

Hohe Plasmakonzentrationen an IL-10 gehen mit einem schlechteren Outcome einher für Patienten mit Hodgkin-Lymphomen, diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen, malignen Melanomen und hepatozellulären Karzinomen (Bohlen et al. 2000, Chau et al. 2000, Nemunaitis et al. 2001, Lech-Maranda et al. 2004).

Die Ergebnisse vorliegender Studie unterstützen jedoch nicht die Annahme, dass IL-10 eine rein negative Auswirkung auf die Tumormunität hat, sondern belegen im Gegenteil eine sehr komplexe und unterschiedliche Wirkweise dieses Cytokins.

Was die Cytokin Gen-Polymorphismus Frequenz im Vergleich zur Normalbevölkerung angeht, so zeigte sich in der Gruppe aller Hirntumorpatienten ein signifikanter Unterschied. Es fiel auf, dass es in der Studienkohorte weniger GCC/GCC (high) Patienten gab. Ein gleiches Ergebnis konnte hinsichtlich pädiatrischer ALL Patienten von Winkler et. al. gezeigt werden (Winkler et al. 2015).

Die gleichen Unterschiede konnten auch bei der Betrachtung der Subgruppen der Medulloblastompatienten und LGG-Patienten beobachtet werden, obwohl hier allerdings die Ergebnisse aufgrund der nicht signifikanten p-Werte nur als Tendenz zu verstehen sind ( $p=0.061$ ,  $p=0.065$ ). Eine größere Studienkohorte könnte hier zu repräsentativere Ergebnissen gelangen. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass es eine Assoziation zwischen Genotypen mit niedrigerer IL-10 Produktion und einer erhöhten Tumorzinzidenz gibt.

Aus den Ergebnissen wird außerdem ersichtlich, dass die drei Cytokin Gen Polymorphismen IL-10 -592 (C/A), IL-10 -819 (C/T) und IL-10 -1082 (C/T) Einfluss auf die Prognose haben.

Für den Cytokin Gen Polymorphismus IL-10 (C/T) -819 konnte gezeigt werden, dass in der Gruppe „Alle Hirntumorpatienten“ der Genotyp T/T (low) mit einem signifikant besseren EFS mit 88.89% über 5 Jahre assoziiert ist.

#### 4. Diskussion

Wenn man das reine Auftreten von Rezidiven in den einzelnen Gruppen, sortiert nach Genotypen, betrachtet, lässt sich feststellen, dass sowohl der Cytokin Gen Polymorphismus IL-10 (-592) C/T, als auch der Cytokin Gen Polymorphismus IL-10 (-819) C/A jeweils der Genotyp C/T (intermediate) und C/A (intermediate) signifikant häufiger mit Rezidiven assoziiert sind als die jeweiligen homozygoten Genotypen. Auffallend ist, dass die jeweils mit hohen Cytokin Plasmakonzentrationen assoziierten Genotypen T/T und A/A sehr selten vorkommen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei erhöhter IL-10 Ausschüttung auch ein erhöhtes Auftreten an Rezidiven zu beobachten ist.

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass der IL-10 (-1082) A/A Genotyp, der eine niedrige Plasmakonzentration von IL-10 zur Folge hat, mit einem besseren EFS assoziiert ist (Liu et al. 2005). Bei pädiatrischen Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) wiederum zeigte sich, dass der IL-10 (-1082) G/G (high) Genotyp bei Patienten mit einer precursor B-ALL und schlechtem Ansprechen auf Prednison seltener zu finden war (Lauten et al. 2002). Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass der IL-10 (-1082) G/G Genotyp zur einer höheren Abstoßungsrate nach Nierentransplantationen führte (Sankaran et al. 1999).

#### **4.5. IL-6**

Die Rolle von IL-6 in der Tumormunität ist sehr komplex. In der Krebsforschung konnte gezeigt werden, dass hohe Serumkonzentrationen von IL-6 ein prognostisch ungünstiger Faktor bei unterschiedlichen Krebserkrankungen wie Magen- und Pankreaskrebs, Brustkrebs, malignen Melanomen, colorektalen Karzinomen, beim multiplen Myelom und Lungenkrebs sind (Heikkila et al. 2008, Lippitz 2013). Darüber hinaus gibt es Studien, die suggerieren, dass IL-6 auch in der Progression von Neoplasien eine entscheidende Funktion erfüllt (Grivennikov et al. 2009, Fisher et al. 2011).

Weitere Eigenschaften von IL-6 sind die Unterstützung des Tumorzellüberlebens, Deaktivierung des Tumor Suppressor Gen p53, Induktion von Faktoren, die wieder die Tumor Evasiveness, die Metastasierung und die Angiogenese

#### 4. Diskussion

begünstigen (Hirano et al. 2000, Coussens et al. 2002, Hodge et al. 2005, Gritsko et al. 2006, Naugler et al. 2008).

Ein anderer Aspekt ist, dass sich IL-6 auf die Entwicklung von Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, auswirkt, welche wichtig für die Funktion von cytotoxischen T-Zellen sind. Ebenso ist es möglich, dass durch das IL-6 Signal die myeloiden Vorläuferzellen nicht zur DC-Zelllinie, sondern zu Monozyten bzw. Makrophagen differenziert werden, die ihrerseits die Aktivierung des Immunsystems abschwächen. Eine Folge dessen ist auch, dass durch eine fehlende Differenzierung der DC-Zelllinie die T-Zellaktivierung abgeschwächt wird (Chomarat et al. 2000, Park et al. 2004, Mantovani et al. 2009).

Diese Eigenschaften von IL-6 lassen den Schluss zu, dass IL-6 eine die Tumormunität abschwächende und somit negative Rolle für die Prognose der Patienten darstellen könnte.

Die Ergebnisse vorliegender Studie stehen nicht im Einklang mit diesen Erkenntnissen. Betrachtet man die Verteilung der Cytokin Gen-Polymorphismen, so fällt auf, dass die Genotypen C/C (low), signifikant häufiger in unserer Studienkohorte zu finden ist als in der Vergleichsgruppe. Folglich ist also die Inzidenz von Hirntumoren erhöht bei IL-6 Genotypen, die mit einer niedrigen IL-6 Plasmakonzentration assoziiert sind. Darüber hinaus stellte sich bei der Untersuchung der Allelfrequenzen ein signifikanter Unterschied zwischen der Vergleichsgruppe und den Gruppen aller Hirntumorpatienten und Medulloblastompatienten heraus. Das C-Allel, assoziiert mit niedrigeren IL-6 Plasmaspiegeln, ist signifikant häufiger in den Studienkohorten anzufinden. Es ist also anzunehmen, dass, ausgehend vom Genotyp sich in den untersuchten Studienkohorten eine Prädisposition zu niedrigeren IL-6 Plasmaspiegeln als im Vergleich zur Normalbevölkerung finden lässt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Erkenntnisse hinsichtlich IL-6 der jüngeren Forschung auf dem Feld der Tumormunität.

IL-6 hat einen direkten Einfluss auf die Funktionalität der in der Tumormunität elementar wichtigen T-Zellen. Das IL-6 Signal wird für das Priming der T - Zellen,

#### 4. Diskussion

die Induktion einer IFN- $\gamma$  vermittelten Immunantwort und den Schutz von T-Zellen gegenüber Treg-vermittelter Immunsuppression benötigt (Leal et al. 2001, Pasare et al. 2003). Außerdem gibt es Studien, die eine die T-Zell-Proliferation fördernde und die T-Zell-Apoptose verhindernde Wirkung des IL-6 Signalweges beschreiben (Naugler et al. 2008, Dejean et al. 2009, Rose-John 2012).

Des Weiteren wirkt sich IL-6 auch auf die Zirkulation und Migration der T-Zellen in den Lymphknoten aus, was ein wesentlicher Bestandteil in der Schaffung einer effektiven Abwehr gegenüber Pathogenen ist (Fisher et al. 2011, Girard et al. 2012).

In vorliegender Studie wurde auch der Einfluss von IL-6 auf die Prognose der Patienten in den drei betrachteten Studienkohorten untersucht. Hier ließen sich, im Gegensatz zur Distribution der Cytokin Gen-Polymorphismen, keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Normalbevölkerung erkennen.

Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass ein Genotyp, der mit hohen IL-6 Plasmaspiegeln assoziiert ist, generell eine protektive Rolle bei einer Hirntumorerkrankung spielt. Dieser protektive Effekt scheint jedoch unwirksam zu werden, falls der Patient oder die Patientin trotzdem an einer Neoplasie erkrankt. IL-6 hat also, je nach Ort der Funktionsausübung, unterschiedliche Wirkungen. Für Tumorzellen ist die kontinuierliche Produktion an IL-6 wichtig, da die Zellen durch die IL-6 Signalwege kritische Checkpoints der Zellzyklusregulation und eine konsekutive Apoptose umgangen werden können (Hodge et al. 2005). Eine hohe Produktion an IL-6 ist also in diesem Moment negativ für den Organismus und unterminiert die positiven Effekte, die IL-6 auf die T-Zellen Immunität ausübt.

#### **4.6. IL-4**

Nach der Entdeckung von IL-4 ging man ursprünglich von einer starken antitumoralen Funktionalität dieses Cytokins aus. So entwickelten Mäuse, denen IL-4 sekretierende Tumorzellen geimpft wurden, eine wirksame Tumormunität und konnten weitere Injektionen von Tumorzellen effektiv bekämpfen (Golubek et al. 1991). Was im Mausmodell ein vielversprechender therapeutischer Ansatz

#### 4. Diskussion

war, wurde in klinischen Studien nicht bestätigt. Im Gegenteil: Es konnte gezeigt werden, dass IL-4 in vielen Karzinomerkrankungen hochreguliert und vermehrt ausgeschüttet wurde (Shurin et al. 1999). Dieses Erkenntnis wurde in vorliegenden Untersuchungen bestätigt. Auch bei Karzinomen und benignen Tumorerkrankungen des zentralen Nervensystems ist IL-4 in T-Lymphozyten hochreguliert und wird vermehrt ausgeschüttet. Es konnte gezeigt werden, dass die Hochregulierung von IL-4 insbesondere die CD8+ cytotoxische Immunität durch eine Induzierung einer CD8+ T-Zell-Differenzierung in non-cytolytische CD4-/CD8- T-Zellen beeinflusst (Erard et al. 1993). Darüber hinaus inhibiert die Aktivierung von TH2-Zellen die Aktivierung von TH1-Zellen, welche unter anderem wichtig für die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen IFN- $\gamma$  und IL-2 sind und wiederum TH2-Zellen inhibieren (Mosmann et al. 1989, Abbas et al. 1996). In vorliegender Studie konnte gezeigt werden, dass in der Studienkohorte die Ausschüttung von IL-4 sowohl in CD4+ als auch in CD8+ T-Lymphozyten signifikant höher war als in der Kontrollkohorte. Eine mögliche Schlussfolgerung ist demzufolge, dass die Immunsuppression, welche eine Tumorgenese und einen Tumorprogress ermöglicht, durch eine zu hohe IL-4 Produktion aus den T-Lymphozyten der Patienten resultiert.

## 5. Zusammenfassung

In Deutschland treten bei Kindern ca. 400 Neuerkrankungen an Hirntumoren pro Jahr auf. Den größten Anteil an dieser sehr heterogenen Krankheitsgruppe haben benigne niedriggradige Gliome und maligne Medulloblastome. Der Rolle des Immunsystems bei Krebserkrankungen ist schon seit über 100 Jahren Thema der Forschung. Im Zentrum dieser Studie stand der Einfluss des Immunsystems und insbesondere der Cytokine IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  auf die Entwicklung und Prognose bei Kindern mit Hirntumoren. Dabei wurden die jeweiligen Cytokin Gen-Polymorphismen bei 175 Hirntumorpatienten mittels PCR bestimmt. Diese Daten wurden mit den klinischen Parametern der Patienten korreliert und so der Einfluss der jeweiligen Genotypen und Phänotypen auf die Prognose der Erkrankungen untersucht. In einem weiteren Schritt erfolgte eine Analyse der direkten Ausschüttung von Cytokinen durch T-Lymphozyten nach In-vitro Stimulation der Zellen. Die T-Lymphozyten wurden aus dem extrahierten Blut der Studienteilnehmer isoliert und nach einem festen Schema stimuliert. In der Durchflusszytologie wurde dann die Menge an Cytokin-positiven T-Lymphozyten für die entsprechenden Cytokine gemessen und mit einer altersangepassten gesunden Vergleichspopulation verglichen. Als Nullhypothesen wurde definiert, dass in der Studienpopulation die Genotypen und die Phänotypen bei den Cytokin Gen-Polymorphismen und die Menge an Cytokin-positiven T-Lymphozyten durch Stimulation sich nicht signifikant von den entsprechenden Vergleichskohorten unterscheiden. Beide Nullhypothesen können abgelehnt werden. Es gibt, insbesondere bei der direkten In-vitro Stimulation, teils hochsignifikante Unterschiede. Das adaptierte Immunsystem nimmt also auch bei pädiatrischen Tumorerkrankungen des zentralen Nervensystems eine wichtige Funktion ein. Cytokine spielen hierbei durchaus vielfältige und mitunter sogar entgegengesetzte Rollen, wie durch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnten. So hat eine verstärkte Ausschüttung von TGF- $\beta$  einen protektiven Effekt. Im späteren Verlauf wird durch die immunsuppressive Wirkung des TGF- $\beta$  wiederum eine adäquate antitumorale Immunreaktion verhindert und so ein Progress der jeweiligen Tumorentitäten begünstigt. Dies kann auch erklären, weswegen eine einfache Hemmung der

## 5. Zusammenfassung

Cytokine bisher nicht die gewünschten therapeutischen Resultate erbrachte. Aufgrund ihrer enormen Bedeutung für die Generierung einer Immunantwort sind Cytokine eine wichtige Stellschraube in onkologischen Erkrankungen und deren Verlauf. Eine weitere differenzierende Untersuchung der einzelnen Cytokine, aber auch die funktionierende Gesamtheit der Cytokine und des Immunsystems, ist wichtig für die Entwicklung hochwertiger und effektiver immunologischer Therapieansätze.

## 6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> WHO-Grading der Tumoren des zentralen Nervensystems .....	3
<b>Tabelle 2:</b> Unspezifische Symptome bei Kindern mit Hirntumoren.....	11
<b>Tabelle 3:</b> Spezifische Symptome bei Kindern mit Hirntumoren in Abhängigkeit von der Lokalisation.....	12
<b>Tabelle 4:</b> Immunphänotypisierung relevanter Zelltypen.....	15
<b>Tabelle 5:</b> Studienrelevante Interleukine und ihre Wirkung .....	18
<b>Tabelle 6:</b> TNF- $\alpha$ Polymorphismus .....	19
<b>Tabelle 7:</b> IL-6 Polymorphismus.....	19
<b>Tabelle 8:</b> IFN- $\gamma$ Polymorphismus.....	20
<b>Tabelle 9:</b> TGF- $\beta_1$ -Polymorphismus .....	21
<b>Tabelle 10:</b> IL-10-Polymorphismus .....	22
<b>Tabelle 11:</b> PCR Primer.....	29
<b>Tabelle 12:</b> Färbung der Oberflächenmarker .....	31
<b>Tabelle 13:</b> Übersicht über die intrazellulären Färbungen .....	33
<b>Tabelle 14:</b> Übersicht über die intrazellulären Färbungen nach der Permeabilisierung.....	34
<b>Tabelle 15:</b> Fluoreszenz-Farbstoffe .....	35
<b>Tabelle 16:</b> Übersicht über die verwendeten Feinchemikalien, Puffer und sonstige Reagenzien und Materialien .....	48
<b>Tabelle 17:</b> Übersicht über die verwendeten Antikörper .....	49
<b>Tabelle 18:</b> Übersicht über die verwendeten Geräte und Materialien .....	51
<b>Tabelle 19:</b> Rezidivraten aller Histologien .....	53
<b>Tabelle 20:</b> Vergleich aller Hirntumorpatienten mit der Normalbevölkerung.....	55
<b>Tabelle 21:</b> Vergleich Alle Hirntumorpatienten-Allelfrequenzen mit der Normalbevölkerung .....	57
<b>Tabelle 22:</b> Vergleich der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung .....	59
<b>Tabelle 23:</b> Vergleich Allelfrequenzen der Medulloblastompatienten mit der Normalbevölkerung .....	61
<b>Tabelle 24:</b> Vergleich der LGG-Patienten mit der Normalbevölkerung.....	63
<b>Tabelle 25:</b> Vergleich LGG-Patienten-Allelfrequenzen mit der Normalbevölkerung.....	65
<b>Tabelle 26:</b> Einfluss der Polymorphismen auf Prognose (Alle HIT).....	66
<b>Tabelle 27:</b> Einfluss der Polymorphismen auf Prognose bei Medulloblastompatienten.....	68
<b>Tabelle 28:</b> Einfluss der Polymorphismen auf Prognose bei LGG-Patienten .....	69

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Darstellung des Gatings für die Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) - Probe 1 .....	36
<b>Abbildung 2:</b> Darstellung des Gatings für die PBMC - Probe 1 .....	37
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung des Gatings für die PBMC - Probe 2 .....	38
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung des Gatings für die PBMC - Probe 2 .....	38

<b>Abbildung 5:</b> Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ und IL-17a .....	39
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ und IL-17a - Negativkontrolle .....	40
<b>Abbildung 7:</b> Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ .....	41
<b>Abbildung 8:</b> Darstellung des Gatings für die Cytokine TGF- $\beta$ und IL-17a.....	42
<b>Abbildung 9:</b> Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10.....	43
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10 - Negativkontrolle .....	43
<b>Abbildung 11:</b> Darstellung des Gatings für die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10.....	44
<b>Abbildung 12:</b> Rezidiv und TNF- $\alpha$ .....	71
<b>Abbildung 13:</b> Rezidiv und TGF- $\beta$ (10) .....	72
<b>Abbildung 14:</b> Rezidiv und IL-10 (-592/ -819) .....	73
<b>Abbildung 15:</b> Rezidiv und IL-10 (-592 /-819) bei Medulloblastom.....	74
<b>Abbildung 16:</b> Patienten mit niedriggradigem Gliom - TGF $\beta$ 10 und Rezidiv .....	75
<b>Abbildung 17:</b> LGG-Patienten: IFN- $\gamma$ und Rezidiv.....	76
<b>Abbildung 18:</b> FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD8+ TNF- $\alpha$ .....	78
<b>Abbildung 19:</b> FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD3+ TGF- $\beta$ .....	79
<b>Abbildung 20:</b> FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD4+ TGF- $\beta$ .....	80
<b>Abbildung 21:</b> FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD8+ TGF- $\beta$ .....	80
<b>Abbildung 22:</b> FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD4+ IFN- $\gamma$ .....	81
<b>Abbildung 23:</b> FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD3+ IL-4 .....	82
<b>Abbildung 24:</b> FACS: Alle Hirntumorpatienten und Kontrollkohorte CD4+IL-4.....	83
<b>Abbildung 25:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD8+ TNF- $\alpha$ .....	84
<b>Abbildung 26:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD3+ IFN- $\gamma$ .....	85
<b>Abbildung 27:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD4+ IFN- $\gamma$ .....	86
<b>Abbildung 28:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe MEM+ IFN- $\gamma$ .....	86
<b>Abbildung 29:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD3+ IL-4.....	87
<b>Abbildung 30:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD4+ IL-4.....	88
<b>Abbildung 31:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD8+ IL-4.....	88
<b>Abbildung 32:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD3+ TGF- $\beta$ .....	89
<b>Abbildung 33:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD4+ TGF- $\beta$ .....	90
<b>Abbildung 34:</b> FACS: Medulloblastompatienten und Kontrollgruppe CD8+ TGF- $\beta$ .....	90
<b>Abbildung 35:</b> FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD8+ TNF- $\alpha$ .....	91
<b>Abbildung 36:</b> FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD4+ IFN- $\gamma$ .....	92
<b>Abbildung 37:</b> FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD8+ IFN- $\gamma$ .....	93
<b>Abbildung 38:</b> FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe MEM+ IFN- $\gamma$ .....	93
<b>Abbildung 39:</b> FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD3+ IL-4 .....	94
<b>Abbildung 40:</b> FACS: LGG-Patienten und Kontrollgruppe CD4+ IL-4 .....	95

## Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-793.
- Abdollahzadeh, M., et al. (1994). "Benign cerebellar astrocytoma in childhood: experience at the Hospital for Sick Children 1980-1992." Childs Nerv Syst **10**(6): 380-383.
- Adesina, A. and R. Rauch (2010). Central Neurocytoma and Extraventricular Neurocytoma. Atlas of Pediatric Brain Tumors. A. M. Adesina, T. Tihan, C. E. Fuller and T. Y. Poussaint, Springer New York: 193-197.
- Alas, S., et al. (2001). "Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis." Clin Cancer Res **7**(3): 709-723.
- Alberts B, J. A., Lewis J, et al. (2002). "Molecular Biology of the Cell. 4th edition."
- Ali, Z. S., et al. (2014). "Comparative effectiveness of treatment options for pediatric craniopharyngiomas." J Neurosurg Pediatr **13**(2): 178-188.
- Altin, J. G. and E. K. Sloan (1997). "The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation." Immunol Cell Biol **75**(5): 430-445.
- Awad, M. R., et al. (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): 1014-1020.
- Bach, E. A., et al. (1997). "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." Annu Rev Immunol **15**: 563-591.
- Bathgate, A. J., et al. (2000). "The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection." Transplantation **69**(7): 1514-1517.
- Behar, E., et al. (1996). "Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease." N Engl J Med **334**(5): 286-291.
- Biswas, S., et al. (2004). "Transforming growth factor beta receptor type II inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer." Cancer Res **64**(14): 4687-4692.
- Blobe, G. C., et al. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." N Engl J Med **342**(18): 1350-1358.
- Boehm, U., et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-795.
- Bohlen, H., et al. (2000). "Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for Hodgkin's disease." Ann Hematol **79**(3): 110-113.
- Booth, N. J., et al. (2010). "Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO." J Immunol **184**(8): 4317-4326.
- Boyman, O., et al. (2004). "Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha." J Exp Med **199**(5): 731-736.
- Brooks, E. G., et al. (1993). "Human T-cell receptor (TCR) alpha/beta + CD4-CD8- T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V beta-gene families, and phenotypically resemble memory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11787-11791.
- Bunin, G. R., et al. (1998). "The descriptive epidemiology of craniopharyngioma." J Neurosurg **89**(4): 547-551.
- Calaminus, K. (2012). "Intrakranielle Keimzelltumore."
- Calzascia, T., et al. (2007). "TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice." J Clin Invest **117**(12): 3833-3845.

## Literaturverzeichnis

- Cambien, F., et al. (1996). "Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study." Hypertension **28**(5): 881-887.
- Carmel, P. W., et al. (1982). "Craniopharyngiomas in children." Neurosurgery **11**(3): 382-389.
- Carswell, E. A., et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Chan, J. K., et al. (1988). "A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies." Histopathology **12**(5): 461-480.
- Chau, G. Y., et al. (2000). "Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma." Ann Surg **231**(4): 552-558.
- Chen, W., et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.
- Choi, P. and H. Reiser (1998). "IL-4: role in disease and regulation of production." Clin Exp Immunol **113**(3): 317-319.
- Chomarat, P., et al. (2000). "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages." Nat Immunol **1**(6): 510-514.
- Cloppenborg, T., et al. (2005). "Immunosurveillance of childhood ALL: polymorphic interferon-gamma alleles are associated with age at diagnosis and clinical risk groups." Leukemia **19**(1): 44-48.
- Corthay, A. (2014). "Does the immune system naturally protect against cancer?" Front Immunol **5**: 197.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Cox, E. D., et al. (2001). "Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6." Transplantation **72**(4): 720-726.
- Dejean, A. S., et al. (2009). "Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells." Nat Immunol **10**(5): 504-513.
- Dobrovoljac, M., et al. (2002). "Delay in the diagnosis of paediatric brain tumours." Eur J Pediatr **161**(12): 663-667.
- Dougherty, M. J., et al. (2010). "Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas." Neuro Oncol **12**(7): 621-630.
- Dubuc, A. M., et al. (2010). "The genetics of pediatric brain tumors." Curr Neurol Neurosci Rep **10**(3): 215-223.
- Dunn, D. W. and V. Purvin (1990). "Optic pathway gliomas in neurofibromatosis." Dev Med Child Neurol **32**(9): 820-824.
- Erard, F., et al. (1993). "Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells." Science **260**(5115): 1802-1805.
- Fisher, B. J., et al. (2001). "Results of a policy of surveillance alone after surgical management of pediatric low grade gliomas." Int J Radiat Oncol Biol Phys **51**(3): 704-710.
- Fisher, D. T., et al. (2011). "IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells." J Clin Invest **121**(10): 3846-3859.
- Fishman, D., et al. (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): 1369-1376.
- Frankel, S. A. and W. J. German (1958). "Glioblastoma multiforme; review of 219 cases with regard to natural history, pathology, diagnostic methods, and treatment." J Neurosurg **15**(5): 489-503.

## Literaturverzeichnis

- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8." Oncogene **25**(37): 5125-5133.
- Gajewski, T. F., et al. (2013). "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment." Nat Immunol **14**(10): 1014-1022.
- Galon, J., et al. (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." Science **313**(5795): 1960-1964.
- Gangwar, R., et al. (2009). "Association of interferon-gamma +874A polymorphism with the risk of developing cervical cancer in north-Indian population." BJOG **116**(12): 1671-1677.
- Girard, J. P., et al. (2012). "HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes." Nat Rev Immunol **12**(11): 762-773.
- Golumbek, P. T., et al. (1991). "Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4." Science **254**(5032): 713-716.
- Gorelik, L., et al. (2000). "Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression." J Immunol **165**(9): 4773-4777.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2000). "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease." Immunity **12**(2): 171-181.
- Gritsko, T., et al. (2006). "Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells." Clin Cancer Res **12**(1): 11-19.
- Grivennikov, S., et al. (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." Cancer Cell **15**(2): 103-113.
- Grivennikov, S. I., et al. (2005). "Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects." Immunity **22**(1): 93-104.
- Hacker, S., et al. (2009). "Histone deacetylase inhibitors cooperate with IFN-gamma to restore caspase-8 expression and overcome TRAIL resistance in cancers with silencing of caspase-8." Oncogene **28**(35): 3097-3110.
- Hadrup, S., et al. (2013). "Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment." Cancer Microenviron **6**(2): 123-133.
- Hajeer, A. H. and I. V. Hutchinson (2000). "TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications." Microsc Res Tech **50**(3): 216-228.
- Halperin, E. C., et al. (2001). "Duration of symptoms prior to diagnosis is related inversely to presenting disease stage in children with medulloblastoma." Cancer **91**(8): 1444-1450.
- Harisiadis, L. and C. H. Chang (1977). "Medulloblastoma in children: a correlation between staging and results of treatment." Int J Radiat Oncol Biol Phys **2**(9-10): 833-841.
- Heikkila, K., et al. (2008). "Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer." Eur J Cancer **44**(7): 937-945.
- Hirano, T., et al. (2000). "Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors." Oncogene **19**(21): 2548-2556.
- Hodge, D. R., et al. (2005). "Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation." Cancer Res **65**(11): 4673-4682.
- Holletz, T., et al. (2006). Biochemie für Mediziner: Ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug, Springer Berlin Heidelberg.
- Holtmeier, W. and D. Kabelitz (2005). "gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses." Chem Immunol Allergy **86**: 151-183.
- Howe, G. R., et al. (1989). "An exploratory case-control study of brain tumors in children." Cancer Res **49**(15): 4349-4352.

## Literaturverzeichnis

- Ikedo, H., et al. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 95-109.
- Ioachim, H. L. (1990). "The opportunistic tumors of immune deficiency." Adv Cancer Res **54**: 301-317.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." Science **327**(5963): 291-295.
- Jiang, M., et al. (2008). "Retinoic acid induces caspase-8 transcription via phospho-CREB and increases apoptotic responses to death stimuli in neuroblastoma cells." Biochim Biophys Acta **1783**(6): 1055-1067.
- Kaatsch, P., et al. (2001). "Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children." Cancer **92**(12): 3155-3164.
- Karayiannakis, A. J., et al. (2001). "Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients." Anticancer Res **21**(2B): 1355-1358.
- Keene, D. L., et al. (1999). "Brain tumors in childhood and adolescence." Pediatr Neurol **20**(3): 198-203.
- Kim, C. Y., et al. (2015). "Clinical outcome and quality of life after treatment of patients with central neurocytoma." Neurosurg Clin N Am **26**(1): 83-90.
- Kleihues, P., et al. (1993). "The new WHO classification of brain tumours." Brain Pathol **3**(3): 255-268.
- Kleihues, P. and L. H. Sobin (2000). "World Health Organization classification of tumors." Cancer **88**(12): 2887.
- Korner, H., et al. (1997). "Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting." J Exp Med **186**(9): 1585-1590.
- Kühl, J. and R. Korinthenberg (2006). ZNS-Tumoren. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. H. Gadner, G. Gaedicke, C. Niemeyer and J. Ritter, Springer Berlin Heidelberg: 777-822.
- Laouar, Y., et al. (2005). "Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma." Nat Immunol **6**(6): 600-607.
- Lauten, M., et al. (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): 1437-1442.
- Leal, I. S., et al. (2001). "Interleukin-6 regulates the phenotype of the immune response to a tuberculosis subunit vaccine." Immunology **103**(3): 375-381.
- Lech-Maranda, E., et al. (2004). "Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma." Blood **103**(9): 3529-3534.
- Leek, R. D., et al. (1998). "Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma." Br J Cancer **77**(12): 2246-2251.
- Li, M. O., et al. (2006). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." Annu Rev Immunol **24**: 99-146.
- Liao, W., et al. (2011). "IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation." Curr Opin Immunol **23**(5): 598-604.
- Lin, W., et al. (2004). "Interferon-gamma induced medulloblastoma in the developing cerebellum." J Neurosci **24**(45): 10074-10083.
- Lippitz, B. E. (2013). "Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review." Lancet Oncol **14**(6): e218-228.
- Listernick, R., et al. (2007). "Optic pathway gliomas in neurofibromatosis-1: controversies and recommendations." Ann Neurol **61**(3): 189-198.

## Literaturverzeichnis

- Listernick, R., et al. (1997). "Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force." Ann Neurol **41**(2): 143-149.
- Liu, D., et al. (2005). "Impact of gene polymorphisms on clinical outcome for stage IV melanoma patients treated with biochemotherapy: an exploratory study." Clin Cancer Res **11**(3): 1237-1246.
- Louis, D. N., et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Luengo-Fernandez, R., et al. (2013). "Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis." Lancet Oncol **14**(12): 1165-1174.
- Mantovani, A., et al. (2009). "Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation." Hum Immunol **70**(5): 325-330.
- Mapara, M. Y. and M. Sykes (2004). "Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance." J Clin Oncol **22**(6): 1136-1151.
- Marincola, F. M., et al. (2000). "Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance." Adv Immunol **74**: 181-273.
- Massague, J. (2008). "TGFbeta in Cancer." Cell **134**(2): 215-230.
- McDevitt, H., et al. (2002). "Multiple roles for tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha/beta in immunity and autoimmunity." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S141-152.
- Mehta, V., et al. (2002). "Latency between symptom onset and diagnosis of pediatric brain tumors: an Eastern Canadian geographic study." Neurosurgery **51**(2): 365-372; discussion 372-363.
- Meister, N., et al. (2007). "Interferon-gamma mediated up-regulation of caspase-8 sensitizes medulloblastoma cells to radio- and chemotherapy." Eur J Cancer **43**(12): 1833-1841.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2008). "Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes." Nat Rev Immunol **8**(1): 74-80.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-173.
- Mueller, B. U. and P. A. Pizzo (1995). "Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies." J Pediatr **126**(1): 1-10.
- Naugler, W. E. and M. Karin (2008). "The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer." Trends Mol Med **14**(3): 109-119.
- Nemunaitis, J., et al. (2001). "Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma." Cancer Invest **19**(3): 239-247.
- Nieters, A., et al. (2001). "Cross-sectional study on cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of a German population." Hum Genet **108**(3): 241-248.
- Oh, S. A. and M. O. Li (2013). "TGF-beta: guardian of T cell function." J Immunol **191**(8): 3973-3979.
- Orr, L. C., et al. (2002). "Cytogenetics in pediatric low-grade astrocytomas." Med Pediatr Oncol **38**(3): 173-177.
- Pages, F., et al. (2005). "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer." N Engl J Med **353**(25): 2654-2666.
- Park, S. J., et al. (2004). "IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation." J Immunol **173**(6): 3844-3854.
- Partanen, R., et al. (1995). "Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients who have asbestosis and develop cancer." Occup Environ Med **52**(5): 316-319.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." Science **299**(5609): 1033-1036.

- Paul, W. E. (1991). "Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine." Blood **77**(9): 1859-1870.
- Peng, L., et al. (2013). "Association between transforming growth factor-beta 1 T869C polymorphism and ischemic stroke: a meta-analysis." PLoS One **8**(7): e67738.
- Perrey, C., et al. (1999). "ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms." Transpl Immunol **7**(2): 127-128.
- Pfitzenmaier, J., et al. (2003). "Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma." Cancer **97**(5): 1211-1216.
- Pietsch, T. and O. D. Wiestler (1997). "Molecular neuropathology of astrocytic brain tumors." J Neurooncol **35**(3): 211-222.
- Poli, A., et al. (2009). "CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset." Immunology **126**(4): 458-465.
- Poli, F., et al. (2002). "Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population." Eur J Immunogenet **29**(3): 237-240.
- Polkinghorn, W. R. and N. J. Tarbell (2007). "Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification." Nat Clin Pract Oncol **4**(5): 295-304.
- Pollack, I. F., et al. (1995). "Low-grade gliomas of the cerebral hemispheres in children: an analysis of 71 cases." J Neurosurg **82**(4): 536-547.
- Pravica, V., et al. (2000). "A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production." Hum Immunol **61**(9): 863-866.
- Ratner, A. and W. R. Clark (1993). "Role of TNF-alpha in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis." J Immunol **150**(10): 4303-4314.
- Rickert, C. H. and W. Paulus (2001). "Tumors of the choroid plexus." Microsc Res Tech **52**(1): 104-111.
- Ries, L. A. G., et al. (2000). "The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer." Cancer **88**(10): 2398-2424.
- Roberts, A. B., et al. (1981). "New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(9): 5339-5343.
- Rood, B. R., et al. (2004). "Current treatment of medulloblastoma: recent advances and future challenges." Semin Oncol **31**(5): 666-675.
- Rose-John, S. (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." Int J Biol Sci **8**(9): 1237-1247.
- Rutkowski, S. (2012). "Medulloblastom im Kindes- und  
Jugendalter - Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische  
Onkologie und Hämatologie." Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen  
Fachgesellschaften e.V.: 7.
- Rutkowski, S., et al. (2005). "Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone." N Engl J Med **352**(10): 978-986.
- Rutkowski, S., et al. (2009). "Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy and deferred radiotherapy." Neuro Oncol **11**(2): 201-210.
- Sankaran, D., et al. (1999). "Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation." Kidney Int **56**(1): 281-288.
- Schuz, J. and P. Kaatsch (2002). "Epidemiology of pediatric tumors of the central nervous system." Expert Rev Neurother **2**(4): 469-479.

## Literaturverzeichnis

- Schuz, J., et al. (2001). "Risk factors for pediatric tumors of the central nervous system: results from a German population-based case-control study." Med Pediatr Oncol **36**(2): 274-282.
- Seidemann, K., et al. (2005). "Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non-Hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Munster Trial NHL-BFM 95." J Clin Oncol **23**(33): 8414-8421.
- Seymour, H. E., et al. (2001). "Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis." Br J Clin Pharmacol **51**(3): 201-208.
- Shurin, M. R., et al. (1999). "Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy." Springer Semin Immunopathol **21**(3): 339-359.
- Siegel, P. M., et al. (2003). "Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8430-8435.
- Sredni, B., et al. (2004). "Ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 autocrine loop." Cancer Res **64**(5): 1843-1852.
- Stroink, A. R., et al. (1986). "Diagnosis and management of pediatric brain-stem gliomas." J Neurosurg **65**(6): 745-750.
- Sutton, L. N., et al. (1995). "Long-term outcome of hypothalamic/chiasmatic astrocytomas in children treated with conservative surgery." J Neurosurg **83**(4): 583-589.
- Swain, S. L., et al. (1991). "Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype." J Immunol **147**(9): 2991-3000.
- Swann, J. B. and M. J. Smyth (2007). "Immune surveillance of tumors." J Clin Invest **117**(5): 1137-1146.
- Takahashi, H., et al. (2000). "Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **26**(12): 1317-1323.
- Targan, S. R., et al. (1997). "A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group." N Engl J Med **337**(15): 1029-1035.
- Therasse, P., et al. (2000). "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada." J Natl Cancer Inst **92**(3): 205-216.
- Thomas, D. A. and J. Massague (2005). "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance." Cancer Cell **8**(5): 369-380.
- Trevejo, J. M., et al. (2001). "TNF-alpha -dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12162-12167.
- Tufan, K., et al. (2005). "Intracranial meningiomas of childhood and adolescence." Pediatr Neurosurg **41**(1): 1-7.
- Turner, D. M., et al. (1997). "An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter." Eur J Immunogenet **24**(1): 1-8.
- Wajant, H., et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Wiegering, V., et al. (2011). "TH1 predominance is associated with improved survival in pediatric medulloblastoma patients." Cancer Immunol Immunother **60**(5): 693-703.
- Wiegering, V., et al. (2009). "Age-related changes in intracellular cytokine expression in healthy children." Eur Cytokine Netw **20**(2): 75-80.

## Literaturverzeichnis

- Wilne, S., et al. (2007). "Presentation of childhood CNS tumours: a systematic review and meta-analysis." Lancet Oncol **8**(8): 685-695.
- Wilne, S. H., et al. (2006). "The presenting features of brain tumours: a review of 200 cases." Arch Dis Child **91**(6): 502-506.
- Wilson, A. G., et al. (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): 353.
- Winkler, B., et al. (2015). "TGFbeta and IL10 have an impact on risk group and prognosis in childhood ALL." Pediatr Blood Cancer **62**(1): 72-79.
- Wolff, J. E., et al. (1996). "[HIT-GBM: multicenter study of treatment of children with malignant glioma]." Klin Padiatr **208**(4): 193-196.
- Yang, L. and D. P. Carbone (2004). "Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction." Adv Cancer Res **92**: 13-27.
- Yoshida, N., et al. (2002). "Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma." Br J Cancer **86**(9): 1396-1400.
- Zeltzer, P. M., et al. (1999). "Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study." J Clin Oncol **17**(3): 832-845.
- Zulch, K. J. (1980). "Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors." Neuroradiology **19**(2): 59-66.
- Zuzak, T. J., et al. (2002). "Loss of caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumour/medulloblastoma." Eur J Cancer **38**(1): 83-91.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei allen Studienteilnehmern und ihren Eltern bedanken, ohne die die Verwirklichung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich denke, dass es keine Selbstverständlichkeit ist, dass Patienten und ihre Familien, für welche die Diagnose eines Hirntumors immer eine Ausnahmesituation und mitunter auch ein sehr schweres Schicksal ist, sich trotz dessen bereit erklären, an der medizinischen Forschung und Entwicklung mitzuwirken. Es ist mir ein sehr wichtiges Anliegen, auf diesem Wege meine aufrichtige Anerkennung und Dankbarkeit auszudrücken.

Für die jahrelange, konstruktive, geduldige und unermüdliche Betreuung, Beratung und Supervision bedanke ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Beate Winkler. Ihr Engagement und ihre Forschung ist das Fundament, auf dem diese Arbeit steht und ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Verena Wiegering bedanken, die meine erste Ansprechpartnerin war und mich vom ersten Moment für das Thema der Dissertation begeisterte. Auch ihr bin ich aufgrund jahrelanger Unterstützung und Betreuung zu tiefen Dank verpflichtet.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Schlegel für die Unterstützung und Supervision der Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt auch Marieke Frietsch, die mich mit viel Geduld in die hohe Kunst der Zellfärbung und der Durchflusszytometrie eingearbeitet hat und bei allen Fragen und Nöten mit Rat und Tat zu Seite stand.

Eine weitere wichtige Säule, vor allem was die statistische Auswertung angeht, war Dr. Imme R. Haubitz. Ohne ihre permanente und jahrelange Unterstützung und Beratung in der komplexen und komplizierten Welt der medizinischen Epidemiologie hätte ich diese Arbeit nicht abschließen können. Hierfür möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

## Danksagung

Auch den Mitarbeitern des Stammzelllabors des Universitätsklinikums Würzburg, insbesondere Heidi Tscherner, Christiane Krause und Johannes Rachor, wo ich den Großteil der Experimente durchführen durfte, gilt ein besonderer Dank.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie danken, die mich auf meinem Weg durch Studium, Dissertation und Beruf unermüdliche und unerschütterlich unterstützt haben.

## Lebenslauf

### **Lebenslauf**

#### Persönliche Daten

Name: Hachenberg  
Vorname: Jens Niklas  
Geburtsdatum: 11.08.1988  
Geburtsort: Münster  
Anschrift: An der Elbe 7  
39104 Magdeburg  
E-Mail: [jenshachenberg@gmail.com](mailto:jenshachenberg@gmail.com)  
Telefonnummer: 0391/5639717  
0157/35516322  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig  
Konfession: Römisch-katholisch

#### Schulischer Werdegang, Ausbildung und Beruf

2008 – 2009	Ausbildung Rettungssanitäter/ Ausbildung Rettungsassistent	Theoretische
2007 – 2008	Freiwilliges Soziales Jahr „Het Dorp“, Arnheim, Niederlande	
Juni 2007	Abschluss Allgemeine Hochschulreife am Ökumenischen Domgymnasium Magdeburg	
2001 – 2007	Ökumenisches Domgymnasium Magdeburg	
1999 – 2001	Schloßgymnasium Gützkow	
1995 – 1999	Grundschule Weitenhagen	

## Lebenslauf

### Studium

- 2012 – 2016 Julius – Maximilians Universität, Würzburg  
2010 – 2012 Riga Stradinš University (RSU), Riga, Lettland

### Famulaturen

- März 2012 Kinderkrankenhaus Amsterdamer Straße, Köln  
Kinderchirurgie  
August 2012 Hospital Lam Wah Ee, Penang, Malaysia  
Kinderheilkunde  
Februar 2013 Universitätsklinikum Würzburg, Schmerztagesklinik  
Anästhesie  
August 2013 Oshakati State Hospital, Oshakati, Namibia  
Gynäkologie

### Praktisches Jahr

- 18.05.2015 – 06.09.2015 Hôpitaux Iris Sud Ixelles-Etterbeek, Brüssel, Belgien,  
Chirurgie  
07.09.2015 – 27.12.2015 CHU Montpellier-Saint Eloi, Montpellier, Frankreich  
Innere Medizin  
28.12.2015 – 17.04.2016 CHU Caen, Caen, Frankreich  
Kinderheilkunde

### Beruf

- Seit 01.11.2016 Assistenzarzt in der Klinik für Gynäkologie und  
Geburtsmedizin, Uniklinik Aachen  
Direktor: Prof. Dr. E. Stickeler

### Weitere berufliche Erfahrungen

- April 2013 – April 2015 Studentischer Mitarbeiter in der „Arbeitsgemeinschaft  
Notfallmedizin“ des Universitätsklinikums Würzburg  
Mai 2013 – April 2015 Studentische Hilfskraft der pädiatrischen  
Epidemiologie der Kinderklinik des  
Universitätsklinikums Würzburg