

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Immunologische Parameter bei Langzeitüberlebenden mit Glioblastom

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.  
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Ariana-Berenike Zett  
aus Halle (Saale)  
Magdeburg 2018

### Bibliographische Beschreibung:

Zett, Ariana-Berenike:

Immunologische Parameter bei Langzeitüberlebenden mit Glioblastom. - 2018. -

20 Abb., 18 Tab., Anl. 3

### Kurzreferat

Das Glioblastom ist der häufigste und zugleich bösartigste aller Hirntumoren. Bei einer mittleren Überlebensdauer zwischen 14 und 15 Monaten und einer Langzeitüberlebensrate von nur drei bis fünf Prozent ist die Prognose schlecht. Nichtsdestotrotz existieren einige wenige Fälle, die diese Tumorerkrankung bis zu 20 Jahren überleben. Berichte und Studien über die sogenannten Langzeitüberlebenden sind rar. Vergleichsweise wenige Studien lassen vermuten, dass das Immunsystem bei der Pathogenese und Bewältigung des Glioblastoms eine entscheidende Rolle spielt und damit auch die Prognose beeinflusst. In dieser Arbeit wurde Tumorgewebe von 14 Langzeitüberlebenden auf die Expression einer kleinen Auswahl von Antigenen untersucht und die Ergebnisse mit Tumorgewebe von Patienten, die der durchschnittlichen Überlebensdauer entsprachen verglichen. Wir konnten feststellen, dass die Antigene CD 8 und CD 25 auf Lymphozyten im Tumorgewebe von Langzeitüberlebenden deutlich signifikant sowie CD 20 und CD 95 signifikant höher exprimiert wurden als im Tumorgewebe der Kurzzeitüberlebenden. Zudem fanden wir eine als unspezifisch zu wertende starke Positivität der Antikörper gegen CD 26 und CD 57 in beiden Gruppen. Bezüglich der bereits etablierten Prognosemarker IDH 1 und MGMT unterschieden sich beide Gruppe nicht. Somit kann eine Korrelation zwischen der Expression dieser Antigene und Langzeitüberleben angenommen werden. Weiter scheint unseren Ergebnissen zufolge nicht nur den T-Lymphozyten, sondern auch den B-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Immunpathogenese des Glioblastoms zuzukommen.

### **Schlüsselwörter**

Primäres Glioblastom

Langzeitüberleben

immunologische Parameter

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Das Glioblastom.....	8
1.2 Prognose.....	9
1.3 Histologie .....	10
1.4 Immunologie .....	10
1.5 Genetik.....	13
1.6 Therapie.....	13
1.6.1 Immuntherapie.....	14
1.7 Die etablierten Prognosemarker IDH1 R132H und MGMT .....	15
1.7.1 IDH1 R132H.....	15
1.7.2 MGMT-Methylierungsstatus .....	15
1.8 Lymphozytenantigene .....	16
1.8.1 CD 4 und CD 8.....	16
1.8.2 CD 14.....	17
1.8.3 CD 20.....	17
1.8.4 CD 25.....	18
1.8.5 CD 26.....	18
1.8.6 CD 57.....	19
1.8.7 CD 95 und CD 95-L.....	19
1.9 HLA DR Class II .....	20
1.10 Zielstellung.....	21
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Patientenkollektiv .....	22
2.2 Vorbereitung des Tumorgewebes .....	25
2.3 Antigendemaskierung .....	25
2.4 Autostaining .....	27
2.4.1 Immunfärbeautomat und Antikörperdetektionssystem .....	27
2.4.2 Ansetzen der Reagenzien.....	27
2.4.3 Antikörpertitrierung.....	28
2.4.4 Positiv- und Negativkontrolle.....	29
2.4.5 Programmierung des Autostainer .....	30
2.4.6 Prozess der Immunhistochemischen Färbung .....	30
2.5 Nachbehandlung.....	31
2.6 HE- Färbung .....	32
2.7 MGMT-Promotormethylierung.....	33
2.8 Auswertung .....	36

2.8.1	Immunhistochemie .....	36
2.8.2	MGMT-Promotormethylierung.....	36
2.8.3	Statistik .....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
3.1	Überlebensdauer.....	38
3.2	Die etablierten Prognosemarker IDH1 R132H und MGMT .....	39
3.2.1	IDH1 R132H.....	39
3.2.2	MGMT-Methylierungsstatus .....	39
3.3	CD 4.....	42
3.4	CD 8.....	43
3.5	CD 14.....	46
3.6	CD 20.....	47
3.7	CD 25.....	49
3.8	CD 26.....	51
3.9	CD 57.....	52
3.10	CD 95.....	53
3.11	CD 95-L.....	55
3.12	HLA Class II .....	57
3.13	Expression der Antigene im Vergleich .....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
4.1	Die etablierten Prognosemarker IDH1 R132H und MGMT .....	62
4.1.1	IDH 1 R132H.....	62
4.1.2	MGMT .....	63
4.2	CD 4 und CD 8.....	64
4.3	CD 14.....	66
4.4	CD 20.....	67
4.5	CD 25.....	69
4.6	CD 26.....	70
4.7	CD 57.....	71
4.8	CD 95 und CD 95-L.....	72
4.9	HLA DR II.....	75
4.10	Limitationen und methodische Einschränkungen .....	76
4.11	Ausblick.....	77
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>89</b>
	<b>Ehrenerklärung.....</b>	<b>90</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>91</b>

---

<b>A</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>93</b>
A.1	Geräte, Reagenzien, Antikörper.....	93
A.2	Abbildungsverzeichnis .....	98
A.3	Tabellenverzeichnis .....	98

# Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea
bp	Basenpaar
B-Zelle/B-Lymphozyt	Deutsche Herleitung von <b>B</b> ursa fabrici Englisch von <b>B</b> one Marrow
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalievirus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritic Cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
EGF	Epidermal Growth Factor
FAS	Fatty acid synthase
FAS-L	FAS-Ligand
Fc	Fragment crystallisable
HE	Hämatoxylin Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen, antigen D Related
HRP	Horseradish peroxidase
IDH	Isozitatdehydrogenase
IgG1	Immunglobulin G1
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Long-term survivor
MAX	Maximum
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHC	Major Histocompatibility Complex
M	Mittelwert
NK	Natural killer
PDA	Piperidindiamid
R	Rezeptor
STD	Standardabweichung
STS	Short-term survivor

---

TEMED	Tetramethylethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
TH1	Bezogen auf einen Subtyp der T-Helferzelle
TLR-4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
T-Zelle/T-Lymphozyt	Thymus-Zelle
TMZ	Temozolomid
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Glioblastom

Das Glioblastom ist der häufigste und zugleich bösartigste primäre Hirntumor des erwachsenen Menschen [70]. 51% aller Gliome [1] und 12-25% aller intrakraniellen Tumore [9, 30, 38, 46] sind Glioblastome. In den USA und Europa liegt die Inzidenz bei 3/100000 Einwohnern pro Jahr, Tendenz steigend [1]. Die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland ist mit 2,6/100000 Einwohnern pro Jahr nur wenig geringer [9]. Durch höchst aggressives, infiltrierendes Wachstum mit hohen Proliferationsraten und einer ausgeprägten Neoangiogenese [6] ist die Prognose dieser Erkrankung trotz multimodaler Therapie [65] äußerst schlecht [84, 85]. Erkrankte weisen die schlechtesten 5-Jahres-Überlebensraten aller bekannten menschlichen Krebsarten auf [1, 26, 48]. Obwohl das Glioblastom nur 1,35% aller bekannten Krebserkrankungen ausmacht, ist es doch die zweithäufigste Todesursache neurologischer Erkrankungen. Das Glioblastom ist zwar seltener als sekundäre Hirntumoren, jedoch mit einer höheren Letalität verbunden [42]. Das mittlere Überleben beträgt im Durchschnitt 14-15 Monate [1, 5, 11, 21, 35, 41, 44, 65, 71, 84, 96]. Vom Beginn der Symptomatik bis zur Diagnosestellung vergehen oft nur wenige Wochen bis Monate [57].

Obwohl das Glioblastom in jedem Alter auftreten kann, ist es doch häufiger bei Erwachsenen [42]. Primäre Glioblastome sind bei jungen Patienten selten. Sie machen nur 8,8% der kindlichen ZNS-Tumoren aus. Glioblastome der Kindheit haben ein besseres Outcome und sind sensibler gegenüber Radio- und Chemotherapie [62]. Selten kommen auch kongenitale Fälle von Glioblastomen vor [1]. Das mittlere Erkrankungsalter des primären Glioblastoms liegt zwischen 48,1 und 62 Jahren [1, 30, 36, 45]. In den letzten Jahren beobachtet man eine leichte Zunahme maligner Gliome bei älteren Menschen. Bei über 60 Jahre alten Patienten finden sich autopsisch in 20-25% der Fälle Glioblastome [45].

Primäre Glioblastome finden sich häufiger bei Männern als bei Frauen. Das Verhältnis beträgt etwa 1,3 bis 2,2:1 [30, 36, 45]. Bei sekundären Glioblastomen verhält sich dieser Zusammenhang umgekehrt [1]. Zudem scheinen Kaukasier doppelt so häufig betroffen zu sein wie Schwarzafrikaner [45].

Trotz der ausgesprochen schlechten Prognose gibt es einige wenige Fälle, die mit dieser Erkrankung weit über mehrere Jahre leben können. Das wahrscheinlich längste dokumentierte Überleben eines Patienten mit Glioblastom primärer Genese beträgt 21 Jahre [26]. Ein Überleben über 3 Jahre hinaus ist sehr selten, wird aber bemerkenswerter

Weise immer häufiger [38], nicht zuletzt dank der Fortentwicklung neuer und bewährter Therapiekonzepte. 95% aller Patienten mit primärem Glioblastom versterben binnen 36 Monaten nach Diagnose. Diejenigen, die diese 36 Monate überleben, haben gute Chancen auf ein noch längeres Überleben [83]. Diese Patienten bezeichnet man als Langzeitüberlebende, in der englischen Fachliteratur long-term survivor (LTS) genannt. Wie genau man ein solches Langzeitüberleben definiert, darüber sind sich die Autoren der Fachliteratur nicht einig. In der Regel jedoch gilt ein Patient, der 36 Monate bzw. drei Jahre nach Diagnosestellung noch lebt, als LTS [1, 5, 13, 14, 21, 48, 70]. Zu dieser Gruppe von Patienten gehören etwa 3-5% aller Glioblastompatienten [48, 65, 70, 83]. Bei Ersterkrankung nach dem 50. Lebensjahr ist ein Langzeitüberleben unwahrscheinlich [59].

Als Kurzzeitüberlebende oder short-term survivor (STS), werden jene Patienten bezeichnet, die die mittlere Überlebensdauer erfüllen, oder sogar noch unterschreiten. Auch hier schwanken die Definitionen von Autor zu Autor. Eine einheitliche Definition gibt es bis heute nicht. STS überleben in der Regel weniger als 18 Monate [13, 14, 46, 83].

Warum manche Patienten länger überleben als andere ist nach wie vor ungeklärt [21]. Studien, die sich konkret mit dieser Fragestellung beschäftigen, gibt es wenige. Zum einen sind LTS, wie bereits erwähnt, ausgesprochen selten. Eine angemessene Stichprobe zu erheben, gestaltet sich entsprechend schwierig. Zum anderen haben vielfältige Faktoren sowohl einzeln als auch im Gefüge einen Einfluss auf die Pathogenese und Prognose des Glioblastoms. Die derzeit wahrscheinlich größte Studie mit LTS stammt von *Krex et al* [48].

## 1.2 Prognose

Die Angaben zu den Überlebensraten schwanken stark von Erhebung zu Erhebung. Die mittlere 1-Jahres-Überlebensrate des Glioblastoms reicht von circa 17% [1] bis 61% [70]. Nach zwei Jahren leben oft nur noch 3-26,5% der Patienten [36, 45, 70]. Junge Patienten überleben deutlich länger. Für Patienten zwischen dem 15. und 45. Lebensjahr liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 13%, für über 75-Jährige jedoch schon weit unter 1% [1], im Mittel also unter 10% [26].

Es wurden bereits mehrere Indikatoren für ein Langzeitüberleben untersucht. Jedoch nur wenige sind tatsächlich von Relevanz. Etablierte Prognosemarker, die mit einer günstigen Prognose einhergehen sind ein junges Erkrankungsalter, weibliches Geschlecht, ein hoher Karnofsky-Index, eine hohe Punktzahl im Mini-Mental-Status-Test zur Beurteilung der kognitiven Leistungsfähigkeit, die Methylierung des MGMT-Promotors, ein mutiertes IDH1- und 2-Gen, eine radikale Resektion von mehr als 98% des Tumorgewebes mit

adjuvanter Radio-Chemotherapie und ein langes progressionsfreies Intervall [1, 13, 14, 18, 21, 24, 33, 36, 38, 39, 42, 47, 48, 62, 65, 66, 70, 75, 82, 83, 89]. Das klinische Outcome der Patienten ist zudem bedeutend besser, wenn vor der OP keine wesentlichen neurologischen Defizite vorliegen.

In erster Linie ist die Prognose jedoch tumorabhängig. Sekundäre Glioblastome haben eine bessere Prognose als primäre. Histopathologisch sprechen Riesenzellen, fokale oligodendrogliale Differenzierung, Intermediärfilamente und das Fehlen anaplastischer Anteile für einen weniger raschen Verlauf [21, 65, 82]. Zudem ist die Anzahl der Mitosen richtungsweisend [78]. Tumoren mit einer Größe unter 4cm haben ein besseres Outcome als größere. Die frontale Lokalisierung ist in der Regel besser operabel und daher auch mit einer besseren Prognose vergesellschaftet. Ebenfalls mit einer guten Prognose einhergehend sind eine TP53-Überexpression und ein 19q-Verlust [65].

Natürlich beeinflusst die Therapie das Überleben wesentlich [39]. Die meisten Neurochirurgen sind sich einig, dass ein aggressives Vorgehen besser sei als ein zurückhaltendes, auch wenn einige Patienten mit subtotaler Resektion ein ähnliches Überleben wie jene mit Totalresektion zeigten [65]. Darüber hinaus gibt es Patienten, die weder einer postoperativen Bestrahlung, noch einer adjuvanten Chemotherapie zugeführt wurden und dennoch rezidivfrei sind.

### 1.3 Histologie

Das Glioblastom ist ein hochmaligner, glialer Tumor astrozytären Ursprungs. Es kann sich aus niedriggradigen Astrozytomen entwickeln oder mit einer sehr kurzen klinischen Anamnese de novo entstehen [9]. Nach aktueller WHO-Klassifikation gehört das Glioblastom zur Gruppe der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren [55]. Alle Hirntumore werden in vier Grade unterteilt, wobei Grad IV einem schnell wachsenden, besonders bösartigen Tumor entspricht. Hierzu zählt unter anderen Tumoren auch das Glioblastom. Über 40% aller Gliome entsprechen diesem WHO Grad IV [56]. Gliome geringeren WHO-Grades können als Glioblastom rezidivieren und werden dann - im Gegensatz zu den primären Glioblastomen, die de novo entstehen - als sekundäre Glioblastome bezeichnet [1, 9, 93].

### 1.4 Immunologie

Zur Tumorbekämpfung entwickelt der menschliche Organismus zahlreiche Strategien. Ein besonderes Augenmerk ist dabei auf das Immunsystem zu richten, das es vermag, den

Tumor in seinen Eigenschaften zu modulieren [1]. Eine herabgesetzte Immunantwort ist die Ursache vieler Krebsarten von Mensch und Tier [97]. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass eine chronische Allergie - also eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems - mit einem niedrigeren Risiko assoziiert ist, an einem high-grade-Gliom zu erkranken. Im Umkehrschluss haben immunsupprimierte HIV-Patienten oder Transplantatempfänger ein erhöhtes Risiko an einem Glioblastom zu erkranken [27, 60, 94, 95]. Lange wurde spekuliert, ob die systemischen immunologischen Abläufe überhaupt auf das ZNS anwendbar sind. Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass das ZNS - immunologisch betrachtet - nicht nur mit der Peripherie kommuniziert, sondern sogar eine eigene Immunantwort generieren kann [1, 3]. Bei Enzephalitiden konnte beispielsweise eine Überexpression von T-Lymphozyten und MHC-Antigenen, trotz intakter Blut-Hirn-Schranke, beobachtet werden [85]. Beim Generieren einer Immunantwort wandern dendritische Zellen, die von zirkulierenden myeloischen Vorläuferzellen abstammen und sich differenzieren, ins Hirngewebe ein [3]. Für gewöhnlich finden sich in Hirngewebe keine dendritischen Zellen [3]. Astrozyten und Zellen der Mikroglia können im ZNS als Makrophagen fungieren [3, 97]. Zudem können Astrozyten durch Hochregulierung von HLA-DR zu antigenpräsentierenden Zellen transformiert werden [42, 97]. Die Zellen der Mikroglia können bei Inflammation echte DC-Marker aufzeigen und sich wie myeloischstämmige dendritische Zellen verhalten [3, 42]. Professionell antigenpräsentierende Zellen finden sich unter physiologischen Bedingungen im Plexus choroideus und in den Meningen.

Unter pathologischen Bedingungen allerdings kann die Blut-Hirn-Schranke zusammenbrechen. Das tumorbedingte Zusammenbrechen der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht das Eindringen von Lymphozyten sowohl in das noch gesunde Hirngewebe als auch in das Tumorpharenchym [42]. Die Ausdehnung und Lokalisierung von Immunzellen können die Tumor-Wirt-Interaktion beeinflussen und mit stärkerem oder schwächerem Tumorwachstum assoziiert sein [94]. Viele Glioblastome zeigen entzündliche Infiltrate aus T-Zellen (CD 8 > CD 4) und Makrophagen [45, 94, 95]. CD 8-positive Lymphozyten sind beispielsweise wichtige Mediatoren der Antitumorfunktion von IL4 [6]. IL4 kann die Präsentation der Antigene durch Makrophagen oder B-Lymphozyten stimulieren und eine Antitumorantwort auslösen, die zumeist auf CD 8-positiven Lymphozyten basiert [6, 72].

Leider moduliert das Glioblastom das normale Immunsystem sowohl im ZNS als auch systemisch [1, 68] und führt so zu einer ausgedehnten Depression der humoralen und zellulären Immunantwort [6, 72, 74, 97]. Zeichen dieser veränderten Immunantwort beim Glioblastom sind unter anderem eine kutane Anergie, Lymphopenie, eine gestörte Antikörperproduktion, die herabgesetzte Proteinsynthese von Lymphozyten sowie eine verminderte Lymphozytenaktivität [1]. Gliomzellen sind durch die Expression zahlreicher tumorassoziierter Antigene in der Lage, auch in nicht-Tumorzellen eine Expression von

immunsupprimierenden Botenstoffen auszulösen [1, 45, 85]. Entsprechend diesen Ausführungen könnte man folgern, dass eine effektive Immunantwort gegen Tumorzellen beim Glioblastom gar nicht möglich sei [90].

Glioblastomzellen produzieren zudem eine Lymphozyten-inhibierende Extrazellulärmatrix [45]. Durch die Wechselwirkungen zwischen der Tumorzelle und dieser Matrix sowie durch Produktion bestimmter matrixdegradierender Enzyme und Modulation der Matrixrezeptoren kommt es zur diffusen Infiltration der Tumorzellen, die das Glioblastom so einzigartig maligne macht [45]. Ein weiterer Grund für die immunsupprimierenden Eigenschaften des Glioblastoms ist die durch das Glioblastom induzierte Apoptose tumorinfiltrierender Lymphozyten [90]. Die Apoptoserate der Lymphozyten scheint mit der Prognose der Patienten assoziiert zu sein, denn Patienten mit ausgeprägten Lymphozyteninfiltraten zeigten ein deutlich längeres Überleben als entsprechende Kontrollgruppen [90]. Bisher wurde jedoch angenommen, dass gliominfiltrierende Lymphozyten in der Regel inaktiv seien [90]. Dass viele Glioblastompatienten ein Defizit der T-Zell-Immunaktivität haben konnte auch in Versuchen mit in-vitro-Glioblastomkulturen gezeigt werden, die die T-Lymphozytenantwort hemmten [97]. Zudem wurde beobachtet, dass Tumorgewebe von LTS Zeichen einer chronischen Inflammation aufweist. Die Tumorpräparate zeigten eine ausgeprägte T-Zell und Makrophagen-/Mikrogliafiltration. [23]

Darüber hinaus ähneln Glioblastompatienten hinsichtlich der immunologischen Abnormalitäten HIV-infizierten Patienten, besonders in Bezug auf die geringe Zahl an CD 4-positiven Lymphozyten. Die Zahl an CD 8-positiver Lymphozyten ist dagegen nicht reduziert [97].

Bemerkenswert ist, dass Kinder die Erkrankung leichter zu bekämpfen vermögen als Erwachsene. Darum wurden auch vergleichende Studien bei pädiatrischen Tumorpatienten durchgeführt, um eventuelle Besonderheiten des Immunsystems und dessen Signalwege aufdecken zu können [1]. Bislang ließen sich noch keine klinisch relevanten Ergebnisse finden.

Die Modulation immunologischer Vorgänge kann also einen entscheidenden Schritt bei der Pathogenese des Glioblastoms darstellen. Möglicherweise kann das Immunmilieu, wie auch bei anderen Erkrankungen, durch eine gezielte Therapie beeinflusst werden [94]. Besonders der Immunsuppression durch das Glioblastom muss entgegengewirkt werden [74]. Bisher wurden schon wenige immunologische Ansätze entwickelt [71, 77], die im *Kapitel 1.6.1 Immuntherapie* näher ausgeführt werden.

## 1.5 Genetik

Durch zahlreich mutierte Onkogene ist die Apoptosefähigkeit der Glioblastomzellen drastisch reduziert. Veränderte DNA-Reparaturmechanismen ziehen ein schlechtes Ansprechen auf zytotoxische Substanzen und Zellstress nach sich [68]. Hier soll nur auf eine der zahlreichen Mutationen eingegangen werden.

MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, dessen Expression im Glioblastom gesteigert ist. Es entfernt promutagene Alkylgruppen aus der O6-Position von Guanin in der DNA. Somit schützt es die Zellen vor der Karzinogenese durch alkylierende Substanzen. Dieser als Zellschutz konzipierte Prozess führt zu einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber alkylierenden Substanzen. Durch epigenetische Veränderungen kann das MGMT-Gen in Glioblastomen stillgelegt werden. Die Methylierung des MGMT-Promotors auf den CpG-Inseln erhöht dadurch die Sensitivität der Glioblastome gegenüber alkylierenden Substanzen, wie etwa BCNU, Procarbazin, CCNU und TMZ [1, 21, 33, 70, 84]. Bei 30-50% der Glioblastome ist eine MGMT-Promotormethylierung mit einem längeren progressionsfreien Intervall sowie mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert [58]. Auf dieser Basis existieren bereits einige Therapieversuche mit MGMT-Inhibitoren [89].

## 1.6 Therapie

Für den aggressivsten primären Hirntumor gibt es bislang keine Heilung. Die Therapie ist daher leider oft nur palliativ, auch wenn eine kurative Therapie angestrebt wird [30, 89]. Zahlreiche Therapieansätze wurden in den letzten Jahren und Jahrzehnten entwickelt. Nur wenige von ihnen konnten sich in der Klinik etablieren, auch da das Glioblastom in vielerlei Hinsicht therapieresistent ist [7, 68].

Die Operation ist nach wie vor Mittel der ersten Wahl. Eine Tumorresektion über 98% verdoppelt die Überlebenszeit auf bis zu 11-12 Monate und verbessert das Ansprechen auf Bestrahlung und Chemotherapie. Seit circa 1960 schließt sich der Operation eine adjuvante Radiotherapie an. Einen Meilenstein in der Glioblastomtherapie stellt Temozolomid dar. Als adjuvante Chemotherapie zur Bestrahlung kann es sowohl intraarteriell als auch intravenös verabreicht werden [89]. Seit 2005 ist die Operation mit anschließender Bestrahlung und Temozolomidtherapie Goldstandard für neu diagnostizierte Glioblastompatienten unter 70 Jahren [70]. Neue Therapieansätze greifen auf Molekularebene, Tumorstammzellidentifizierung und der Charakterisierung und Modulation der tumorbezogenen Immunantwort. Dabei spielt vor allem die Untersuchung der LTS eine besonders große Rolle [42].

### 1.6.1 Immuntherapie

Der Pionier der Immuntherapie zur Behandlung von Malignomen ist S.T. Rosenberg. Zwischen 1981 und 1998 entwickelte er für bestimmte Patienten mit fortgeschrittenem Karzinom eine Immuntherapie [64]. Von 1995 [15, 85] bis heute werden verschiedenste Ansätze der Immuntherapie auch zur Behandlung des Glioblastoms entwickelt [71, 77].

Bei der passiven Immunisierung beispielsweise werden den Patienten Antikörper oder Immunotoxine verabreicht. Sowohl Antikörper als auch Immunotoxine richten sich direkt gegen tumorspezifische Oberflächenmoleküle, ohne eine systemische Immunantwort auszulösen [1].

Die aktive Immunisierung erfolgt mittels einer Vakzine, etwa durch eine autologe Tumorzellimpfung - Vitespen® oder PEP-3-KLH - die eine Antitumorantwort in vivo auslöst [1].

Bei der adoptiven Immuntherapie werden die Effektorzellen, zumeist Lymphozyten, vom Patienten isoliert, an tumorspezifische Moleküle gekoppelt, ex vivo vermehrt und anschließend reinfundiert. So kann beispielsweise eine Impfung mit autologen dendritischen Zellen erfolgen und eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorantigene auslösen, ein Verfahren, das zur Zeit mit dem Vakzin DCVax®-L in einer Phase-III-Studie erprobt wird [1, 22, 67, 72, 73, 76, 77]. Auf diesem Ansatz basierend könnten künftig insbesondere jene Lymphozytenpopulationen mit Tumorantigenen konjugiert und reinfundiert [72, 94] werden, denen eine wesentliche Beteiligung bei der Tumorabwehr der LTS zugesprochen wird. Ein ähnlicher Ansatz wird auch bereits mit antiviralen T-Zellen verfolgt, nachdem Virusantigene, wie etwa von CMV, auf Glioblastomzellen nachgewiesen werden konnten [76, 77, 92].

Die Immuntherapie sollte ein praktikables, sicheres und wenig toxisches Therapieverfahren darstellen [72, 73, 77], das das progressionsfreie Intervall und das Gesamtüberleben durch Stimulierung zum Beispiel der tumorreaktiven T-Gedächtniszellen und der CD 8-positiven, tumorinfiltrierenden T-Zellen steigern könnte. Diese Immuntherapie wäre, im Gegensatz zu anderen Therapieverfahren, hoch tumorspezifisch und individuell, da die jeweiligen Zellkulturen aus den Tumorzellen des einzelnen Patienten entnommen werden [72, 73, 85].

In den letzten Jahren sind einige Phase III-Studien zur klinischen Erprobung von beispielsweise Bevacizumab, einem VEGF-Antikörper, einem EGFRvIII-Impfstoff oder DCVax (Dendritic cell Vaccine) angelaufen, deren endgültige Ergebnisse noch erwartet werden [22, 67, 72, 76, 77, 92].

## 1.7 Die etablierten Prognosemarker IDH1 R132H und MGMT

### 1.7.1 IDH1 R132H

Mutationen des Gens IDH1 R132H sind charakteristisch für diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren [45]. Sowohl in-vitro- als auch in-vivo-Versuche konnten zeigen, dass eine Mutation von IDH1 R132H das Tumorwachstum deutlich hemmt [29], indem es die Zellproliferation verlangsamt und die Zellmorphologie und -migration wesentlich beeinflusst [12, 49]. Die Mutation dieses Gens ist daher mit einer günstigeren Prognose verbunden [45]. Primäre Glioblastome sind selten IDH1-mutiert [49]. Allerdings haben IDH1-positive Glioblastome eine günstigere Prognose als beispielsweise IDH1-negative anaplastische Astrozytome [45]. Dieser Marker ist bereits so etabliert, dass er auch bei der neuen Fassung der WHO-Klassifikation von ZNS-Tumoren von 2016 berücksichtigt wurde [55]. Nach neuer WHO-Klassifikation wird mittlerweile bei allen diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren zwischen IDH1-Wildtyp und IDH1-mutiert unterschieden [55]. Die Bestimmung des Mutationsstatus des IDH R132H-Gens diente in dieser Arbeit als Beleg dafür, dass alle untersuchten Gewebeproben primäre Glioblastome und somit eigentlich mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet waren. Die primäre Genese der Glioblastome war Voraussetzung für den Einschluss in unser Patientenkollektiv. Insgesamt sind bislang 5 IDH1-Mutationen bekannt, von denen IDH1 R132H die häufigste ist [49].

### 1.7.2 MGMT-Methylierungsstatus

In der Fachliteratur gilt eine MGMT-Promotor-Methylierung mittlerweile als einer der bedeutendsten biologischen Marker zur Prognoseabschätzung bei Glioblastomen. Eine MGMT-Promotor-Methylierung ist mit einer längeren Überlebenszeit sowie einem besseren Ansprechen auf Temozolomid assoziiert [1, 5, 45, 48, 58, 83, 84, 88]. Bei 79% der LTS ist diese epigenetische Veränderung zu beobachten [83]. Es wurden jedoch auch Patienten beschrieben, die trotz eines unmethylierten MGMT-Promotors deutlich länger überlebten als diejenigen, deren MGMT-Promotor methyliert war [83].

In dieser Arbeit wurde die MGMT-Promotor-Methylierung sekundär untersucht, um zu zeigen, dass sich die Gruppen der LTS und STS in Bezug auf diesen wesentlichen, bekannten prognostischen Faktor nicht unterscheiden.

## 1.8 Lymphozytenantigene

Wir untersuchten neun Lymphozytenantigene auf eine Reaktion im vitalen Tumorgewebe und verglichen LTS mit STS.

### 1.8.1 CD 4 und CD 8

CD 4 und CD 8 sind Rezeptoren, die auf der Oberfläche von reifen T-Lymphozyten exprimiert werden. CD 4 wird insbesondere auf T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert, CD 8 auf zytotoxischen T-Zellen. Die meisten CD 8-T-Zell-Reaktionen können nicht ohne CD 4-T-Helferzellen ablaufen. Durch immunhistochemische Färbung mit einem entsprechenden Antikörper können diese Zellen im histologischen Präparat markiert und quantifiziert werden. In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Ausmaß der Lymphozyteninfiltration beim Glioblastom mit dem Langzeitüberleben positiv korreliert [45, 95].

Circa 45% der Gliome zeigen Lymphozyteninfiltrate [45, 95]. *Yang et al* zufolge setzen sich die das Glioblastom infiltrierenden Lymphozyten unter anderem aus CD 4-positiven und CD 8-positiven Zellen zusammen [95]. CD 4 wird darüber hinaus auch auf Histiozyten und Langerhanszellen exprimiert [91]. CD 8 findet sich außerdem auf Mikroglia und Makrophagen [71]. Der CD 8-Antikörper, Klon 144B wurde zur Markierung zytotoxischer und Suppressor-T-Zellen entwickelt [52, 91]. 30% der NK-Zellen exprimieren CD 8 [52, 91]. NK-Zellen scheinen am effektivsten bei der Tumorbekämpfung zu sein. Sie beeinflussen die Entwicklung der tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen und induzieren eine TH1-Antwort [71]. Auch bei Gliomen konnten bereits zytotoxische T-Zellinfiltrate durch immunhistochemische Behandlung mit Anti-CD 8 nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Gliome von LTS eine höhere T-Zellinfiltration aufweisen als jene von STS [95].

*Ali et al* führten eine Versuchsreihe durch, bei der ein Vektor in das Striatum injiziert und dann anhand der immunhistochemischen Marker MHC I, MHC II, CD 8 und CD 4 das Ausmaß der Inflammation gemessen wurden [3]. Vermehrt exprimiert wurden vor allem MHC I und CD 8. MHC I wurde insbesondere auf der ortständigen Mikroglia und infiltrierenden Monozyten exprimiert. MHC II konnte nur auf das ipsilaterale Striatum, Corpus callosum und den ipsilateralen Cortex begrenzt nachgewiesen werden. CD 4 fand sich auch auf aktivierten Makrophagen und Mikroglia [3].

### 1.8.2 CD 14

Das Antigen CD 14 ist ein Rezeptor, der auf Monozyten, Makrophagen und Langerhanszellen exprimiert wird und Lipopolysaccharide bindet [20, 40, 51, 69]. Durch Bindung eines LPS erfolgt die Aktivierung des TLR-4-Signalweges, welcher wiederum zur Aktivierung und Reifung der entsprechenden Zelle und Aktivierung von T-Zellen führt [40]. Auch auf Zellen der Mikroglia konnte mittlerweile CD 14 nachgewiesen werden [50].

Allerdings tragen auch Glioblastomstammzellen TLR-4. Im Gegensatz zu den immunkompetenten Zellen hemmt eine gesteigerte TLR-4-Expression bei Glioblastomstammzellen Proliferation und Reifung, da der TLR-4-Signalweg in der Glioblastomstammzelle nachgeschaltete Kaskaden hemmt, die Transkriptionsfaktoren im Stammzellkern aktivieren [4]. Sollte sich in dieser Arbeit eine deutlich gesteigerte Zahl CD 14-positiver, immunkompetenter Zellen bei LTS zeigen, so ist zu unterstellen, dass der Toll-Like-Rezeptor-Signalweg bei der Bekämpfung des Glioblastoms eine entscheidende Rolle spielen könnte.

### 1.8.3 CD 20

Das Antigen CD 20 ist ein Transmembranprotein, welches auf jeder Entwicklungsstufe des B-Lymphozyts, außer der ersten und letzten exprimiert wird [61] und stellt damit den bislang besten B-Zell-Marker dar [52]. B-Zellen werden durch Antigene und T-Helferzellen (vor allem CD 4-positiv) aktiviert und differenzieren sich zu antikörpersezernierenden Plasmazellen, welche die humorale Immunantwort vermitteln [40]. Für CD 20 ist bislang kein natürlicher Ligand bekannt [17, 61]. CD 20 ist für die Aktivierung der B-Zell-Immunantwort verantwortlich, insbesondere gegen T-Zell-unabhängige Antigene. Man vermutet, dass CD 20 als Calciumkanal agiert [17, 61]. Bislang ist CD 20 jedoch wenig erforscht [17]. Mittlerweile konnte CD 20 auch eine Rolle bei der Tumorbekämpfung nachgewiesen werden. CD 20 spielt zudem eine große Rolle bei der Immunphänotypisierung maligner Lymphome und Leukämien [52]. Mithilfe eines entsprechenden Antikörpers (Rituximab) kann in CD 20-positiven Zellen die Kernfragmentierung und damit die Apoptose induziert werden. Dieses Prinzip wird bereits bei der Behandlung von malignen Lymphomen und Kollagenosen eingesetzt [94].

Mit der Bestimmung des CD 20-Antigens in dieser Arbeit soll die Rolle der B-Zell-Antwort bei der Tumorbekämpfung und die Bedeutung für ein längeres Überleben bei Patienten mit Glioblastom untersucht werden.

### 1.8.4 CD 25

CD 25-positive Zellen sind natürliche regulatorische T-Zellen, die die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen unterdrücken und somit autoimmunen Reaktionen vorzubeugen vermögen. Diese regulatorischen T-Zellen tragen auch CD 4 und machen circa 10% der CD 4-tragenden Zellen aus [61]. In Tierexperimenten konnte man bereits Autoimmunerkrankungen durch Transplantation von CD 4- und CD 25-positiven regulatorischen T-Zellen behandeln [31]. Gegen entartete, körpereigene Zellen bei Malignomen allerdings wäre eine Autoimmunreaktion und damit verbunden eine Hemmung der CD 25-positiven Zellen durchaus erwünscht. Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen bei Malignomen ist bislang wenig untersucht.

Darüber hinaus existieren auch CD 25 exprimierende CD 8-positve T-Lymphozyten, die die Funktion nicht regulatorischer T-Gedächtnis-Zellen erfüllen [34].

CD 25 wird außerdem von aktivierten T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert [16]. Sollte sich in dieser Arbeit zeigen, dass CD 25 bei LTS und STS signifikant unterschiedlich exprimiert wird, muss den regulatorischen T-Zellen eine Bedeutung für das Überleben beim Glioblastom zugesprochen werden.

### 1.8.5 CD 26

Das Antigen ist auch als Dipeptidylpeptidase-IV bekannt und wird auf aktivierten T- und B-Zellen, NK-Zellen [10] und Makrophagen exprimiert [69]. Diesem Protein werden zahlreiche Funktionen zugesprochen. Unter anderem fungiert es als Rezeptor, Serinprotease, kostimulierendes Protein und ist wesentlich an apoptotischen Vorgängen beteiligt [10]. CD 26-positive T-Helferzellen sind vor allem CD 4 (76%)- und CD 8-positve Zellen (16%). Eine hohe Zahl CD 26-positiver T-Zellen in entzündetem Gewebe geht häufig mit Autoimmunerkrankungen einher, während wenige CD 26-positive Zellen für ein Defizit des Immunsystems sprechen. Für unsere Untersuchungen relevant ist vor allem ihre Beteiligung an der T-Zellproliferation und Chemotaxis sowie der Apoptose von aktivierten T-Zellen [10]. Auch Tumorzellen exprimieren CD 26, wie etwa Prostatakarzinome und Melanome. An Gliomen konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität von CD 26 auf Gliomzellen mit der Differenzierung der Gliome assoziiert zu sein scheint. So zeigten kaum differenzierte Gliome eine geringe CD 26-Aktivität, während hoch differenzierte Gliome eine starke CD 26-Aktivität zeigten [10]. Unsere Untersuchungen sollen zeigen, inwiefern CD 26-positive T-Helferzellen eine Rolle im immunologischen Milieu des Glioblastoms bei LTS und STS spielen.

### 1.8.6 CD 57

CD 57 wird von germinal-center T-Helferzellen, einigen CD 8-positiven T-Zellen [52], B-Zellen, NK-Zellen und auch von Schwannschen Zellen exprimiert. Die genaue Funktion ist noch unbekannt [69]. Es scheint eine besondere Rolle bei der neuronalen Zelladhäsion zu spielen [20]. CD 57-positive T-Zellen sind in erster Linie Suppressor-T-Zellen, also regulatorische T-Zellen, und unterdrücken eine überschießende Immunantwort [52]. Sie unterscheiden sich von anderen T-Lymphozyten durch ihre besondere Eigenschaft, das HLA DR-Antigen aufnehmen zu vermögen [52]. CD 57-positive T-Zellen sind auch bei HIV-Infektion und anderen Erkrankungen mit einem CD 4<sup>+</sup>/CD 8<sup>+</sup>-Missverhältnis erhöht [52]. CD 57 ist mittlerweile auch als Marker zur Differenzierung von Oligodendrogliomen etabliert [54]. Zum Glioblastom liegen bislang noch keine Untersuchungen vor. Der Nachweis CD 57-positiver Zellen soll in dieser Arbeit zeigen, ob das Vorhandensein CD 57-positiver regulatorischer T-Zellen das Überleben bei Glioblastom signifikant beeinflusst.

### 1.8.7 CD 95 und CD 95-L

Der FAS-Ligand CD 95-L gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren, FAS, also CD 95 - sein Rezeptor - hingegen zur Familie der Tumornekrosefaktorrezeptoren. Unter physiologischen Bedingungen induziert FAS-L, selbst ein Trimer, nach der Bindung an FAS dessen Trimerisierung und aktiviert Caspase 8. Dieser Vorgang löst eine Proteasekaskade aus, in deren Folge caspaseaktivierte DNase in den Zellkern gelangt und die DNA spaltet. Es entstehen DNA-Fragmente, die Zelle verliert jegliche Funktion und wird abgebaut [7, 8, 28, 40, 43, 74, 90, 96]. FAS wird auf vielen immunkompetenten Zellen, darunter auch CD 4- und CD 8-positiven T-Lymphozyten exprimiert [90]. In gesundem menschlichen Gewebe ist FAS kaum nachweisbar [96].

Eine pathologisch aktive und gesteigert exprimierte FAS konnte unter anderem bei Karzinomen der Mamma, Prostata, des Kolons und der Lunge nachgewiesen werden und ging mit einem aggressiven Wachstum einher. Die genauen Mechanismen dieses eigentlich nach bisherigem Verständnis paradoxen Effektes sind nicht vollständig verstanden. Bereits 1984 wurde hieraus gefolgert, dass auf Tumorzellen exprimierte FAS die Proliferation und das Überleben dieser Krebszellen fördern muss [96]. Auch konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit FAS-L oder anti-FAS-Antikörper durch Phosphorylierung des extrazellulären Anteils des FAS-Rezeptors zur Inhibition der FAS-Bindung und somit zum Zelltod führt [7]. Daher werden zur Therapie dieser Krebserkrankungen bereits seit mehreren Jahren FAS-Inhibitoren eingesetzt, die das Tumorstadium reduzieren sollen [28].

Das Glioblastom wächst diffus und infiltrativ, ist apoptoseresistent, hat ein hohes replikatives Potential und induziert Angiogenese und Migration. So zeigten auch *Kleber et al.*, dass eine Hemmung und nicht die Induktion des Todessystems als Therapie gegen das Glioblastom anzustreben sei [44]. Sie stellten fest, dass die Tumorzellen auch die Expression von CD 95-L in das umgebende Gewebe und damit auch in immunkompetenten Lymphozyten induzierten. Es konnte gezeigt werden, dass das hoch invasive Verhalten des Glioblastoms in vitro, in vivo und ex vivo allein durch eine Neutralisierung der CD 95-Aktivität gehemmt werden kann, sofern diese für das invasive Verhalten des Glioblastoms verantwortlich ist. Eine niedrige Expression von FAS konnte auch in gesunden Astrozyten gefunden werden [96]. In Gliom-Zelllinien wurde ein um 4-20-fach höherer FAS-Spiegel gefunden [96]. Beim Gliom führten geringe Dosen von FAS-Inhibitoren zum Zellzyklusarrest der Gliomzelle in der S-Phase. Höhere Dosen wirkten bei Gliomzelllinien zytotoxisch. Normale Astrozyten jedoch blieben von der Wirkung der FAS-Inhibitoren unberührt [96]. Daher verspricht die Inhibition von CD 95 weniger Nebenwirkungen als die Therapie mit anderen migrationsfördernden Faktoren, die gewöhnlich in die normale Hirnfunktion involviert sind [44].

Der Einfluss einer Induktion beziehungsweise Inhibition des FAS/FAS-L-Komplexes auf immunkompetente Zellen des zentralen Nervensystems ist in Bezug auf das Glioblastom bislang wenig untersucht. Nach bisherigem Kenntnisstand wäre eine selektive Induktion des Todessystems in Glioblastomzellen, ohne damit gleichzeitig die Todeskaskade der immunkompetenten Zellen zu induzieren, als prognostisch günstig zu erachten. Mit dieser Arbeit soll die Expression von FAS und FAS-L auf T-Zellen zwischen LTS und STS verglichen werden, um an oben aufgeführte Studien anknüpfen und eine Bedeutung des FAS/FAS-L-Systems der T-Lymphozyten für die Prognose beim Glioblastom ableiten zu können.

## 1.9 HLA DR Class II

HLA DR class II ist ein Oberflächenmolekül, welches von verschiedenen Zellen exprimiert wird. Dieses Molekül wird von CD 4-positiven T-Helfer-Lymphozyten erkannt und aktiviert diese [52, 69]. *Ali et al.* konnten MHC II, gleichbedeutend mit HLA DR II, eine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen im zur Entzündung ipsilateral gelegenen Striatum, Corpus callosum und Cortex nachweisen [3]. Besonders auf Tumorzellen, aber auch auf Mikrogliazellen von Astrozytomen und anaplastischen Astrozytomen, welche prinzipiell mit einer besseren Prognose vergesellschaftet sind als das Glioblastom, konnte HLA DR II nachgewiesen werden [86]. Bei Glioblastomen war die HLA DR II-Expression bis um die Hälfte reduziert [86], andere Quellen sprechen von einer Reduktion bis auf 30% [64]. Sollte auch in der gesteigerten HLA-DR II-Expression auf tumorinfiltrierenden,

immunkompetenten Zellen ein Überlebensvorteil für die Patienten liegen, so sollte diese bei den LTS zu erwarten sein. Zusätzlich würde man auch eine im ähnlichen Ausmaß gesteigerte Expression von CD 4 auf T-Helfer-Lymphozyten vermuten.

## 1.10 Zielstellung

Trotz der hohen Malignität und Letalität des Glioblastoms gibt es einige wenige Patienten, die die mittlere Überlebensdauer bei weitem übertreffen. Die Gründe hierfür sind bislang noch nicht abschließend gefunden und werden in der Fachliteratur kontrovers diskutiert. Bestandteil dieser Diskussionen ist unter anderem die Möglichkeit, dass LTS eine andere Immunantwort gegen das Glioblastom zu generieren vermögen als STS. Bis in die 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts galt eine solche Immunabwehr bei Hirntumoren als unmöglich. Der Immunogenität von Hirntumoren wurde bis dahin allgemein nur eine geringe Bedeutung zugesprochen. Vor circa 25 Jahren konnten dann unterschiedliche Ansätze zeigen, dass eine Immuntherapie zur Behandlung des Glioblastoms, zum Beispiel durch zellbasierte Vakzination, prinzipiell möglich ist. Richtungsweisende Therapieerfolge blieben jedoch bislang aus.

Bisher existieren sowohl zur Immunologie des primären Glioblastoms, als auch zu Langzeitüberlebenden vergleichsweise wenige Publikationen. Studien, die die Immunologie von primären Glioblastomen bei Langzeitüberlebenden untersuchen, sind umso seltener. Eine Aufarbeitung der immunologischen Situation bei LTS könnte daher grundlegende weitere Informationen zur Pathogenese des Glioblastoms liefern und eventuell neue therapeutische Ansätze aufzeigen.

Mit dieser Arbeit wird versucht, Antworten auf folgende Fragen zu finden:

1. Unterscheiden sich LTS und STS in der Expression bestimmter immunologischer Parameter und wenn ja, wie?
2. Ist dieser Unterschied inhaltlich und statistisch relevant?
3. Zeigen sich Trends oder Zusammenhänge der immunologischen Parameter untereinander?
4. Welche therapeutischen oder diagnostischen Konsequenzen erwachsen daraus?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Die Studiengruppe dieser retrospektiven Fall-Kontroll-Studie wurde nach folgenden Kriterien ausgesucht. Aus allen Patienten, die zwischen 1997 und 2008 mit der Diagnose Glioblastom in Behandlung der Universitätsklinik für Neurochirurgie in Magdeburg waren, wurden zunächst diejenigen ausgewählt, die länger als 24 Monate nach Diagnosestellung noch am Leben waren. Diese Grenze wurde vorerst willkürlich gesetzt. Die Definition von Langzeitüberleben bei Glioblastom schwankt je nach Studie und Autor zwischen 18 Monaten und drei Jahren. Die Grenze für die Kategorie Kurzzeitüberlebende alterniert zwischen unter 6 und 18 Monaten [21]. Den Langzeitüberlebenden wurden entsprechende Kontrollpatienten zugeordnet, die weniger als 24 Monate nach Diagnosestellung überlebten (durchschnittliches Überleben der LTS 43,6 Monate, der STS 6,6 Monate). Die weitere Selektion erfolgte nach verschiedenen Match-Kriterien (Vgl. *Tabelle 1: Patientenbezogene Daten*, S. 24). Das Erkrankungsalter potentieller Kontrollpatienten wurde, bis auf eine einzige Ausnahme, mit einer Spanne von plus/minus 2 Jahren Altersunterschied selektiert. Diese Ausnahme betrifft einen Erkrankungsfall bei einem Mädchen im Alter von 11 Jahren. Da dieses Erkrankungsalter untypisch ist, aber aufgrund des außergewöhnlich langen Überlebens nicht auf diese Patientin verzichtet werden konnte, wurde ihr als Kontrolle ein junger Mann mit einem Erkrankungsalter von 17 Jahren zugeordnet. Das mittlere Erkrankungsalter der Langzeitüberlebenden lag bei 51,4 Jahren (Spanne von 11 bis 69 Jahre), das der Kurzzeitüberlebenden bei 51,7 Jahren (Spanne von 17 bis 70). Das mittlere Erkrankungsalter der gesamten Kohorte lag somit bei 51,5 Jahren mit einem Minimum von 11 Jahren und einem Maximum von 70 Jahren. Mit einer Abweichung von maximal 15% wurden die Patienten auch nach ihrem Karnofsky-Index gematcht. Die Gruppe der LTS zeigte bei stationärer Aufnahme einen mittleren Karnofsky-Index von 70,7%, wobei das Maximum bei 80% und das Minimum bei 55% lagen. Erstaunlicherweise hatte die Gruppe der STS einen im Mittel höheren Karnofsky-Index von 72,1%, mit einem Maximum von 85% und einem Minimum von 55%. So ergibt sich für beide Gruppen ein im Mittel errechneter Karnofsky-Index von 71,4%, mit einem Maximum von 85% und einem Minimum von 55%. Unter Berücksichtigung des Geschlechts wurde, bis auf oben genannte Ausnahme, jeder Patientin eine weibliche und jedem Patienten eine männliche Kontrolle zugeordnet. 35,7% (5/14) der LTS und 42,9% (6/14) der STS mit primärem Glioblastom waren männlich. 64,3% (9/14) der LTS und 57,1% (8/14) der STS weiblich. Somit waren insgesamt 39,3% (11/28) des Patientenkollektivs männlich und 60,7% (17/28) weiblich. Zudem wurden die Patienten

annähernd, mit einer Abweichung von 5 Jahren nach dem Erkrankungsjahr gemacht, um den damaligen Stand der Forschung als Fehlerquelle im Studiendesign mit zu berücksichtigen. Auch hier wurde bei einem Patienten eine Ausnahme gemacht, der 2007 erkrankte. Sein zugeordneter Kontrollpatient erkrankte 1997. Diese Diskrepanz wurde zugunsten eines höheren Stichprobenumfangs billigend in Kauf genommen, ist aber dennoch in der Fehlerbetrachtung zu diskutieren. Alle Patienten wurden des Weiteren auf die Punktmutation IDH1 R132H untersucht, um eine primäre Genese des Glioblastoms belegen zu können. Die histopathologische Diagnose wurde von zwei unabhängigen Neuropathologen gesichert. Oligodendrogliale Differenzierungen wurden ausgeschlossen. Patienten, die im Rahmen vorhergehender Studien eine Immuntherapie erhalten hatten, wurden von dieser Studie ebenfalls ausgeschlossen. Unter Zusammenschau aller erhobenen Daten reduzierte sich die Stichprobe auf 14 Patienten und 14 Kontrollen. Anhand deren Überlebenszeiten wurden dann die Cut-off-Werte noch einmal korrigiert. So definierten sich die Langzeitüberlebenden in dieser Studie mit einem Überleben von über 30 Monaten. Das mittlere Überleben dieser Gruppe betrug 43,6 Monate (Spanne 31 bis 107 Monate). Patienten, die weniger als 16 Monate nach Diagnosestellung überlebten, wurden der Kontrollgruppe und somit der Kategorie Kurzzeitüberlebende (STS) zugeordnet. Jene Gruppe zeigte ein mittleres Überleben von 6,6 Monaten (Spanne 0 bis 16 Monate). Der Abstand von 14 Monaten zwischen beiden Cut-Off-Werten wurde bewusst groß gewählt, um systematische Fehler so klein wie möglich zu halten.

Tabelle 1: Patientenbezogene Daten

Nr.	Überleben (Monate)	Erkrankungsalter (Jahre)	Karnofsky-Index (Prozent)	Geschlecht
1	51	60	60	M
K1	3	60	60	M
2	47	69	80	W
K2	3	70	75	W
3	34	68	60	W
K3	1	66	60	W
4	34	62	75	W
K4	5	62	75	W
5	32	54	70	W
K5	4	56	85	W
6	33	11	75	W
K6	15	17	75	M
7	69	46	55	M
K7	0	45	55	M
8	107	31	75	W
K8	13	32	75	W
9	34	54	80	W
K9	16	53	80	W
10	34	57	75	M
K10	1	56	75	M
11	38	56	75	W
K11	7	56	85	W
12	33	64	75	W
K12	10	62	75	W
13	34	56	55	M
K13	10	57	55	M
14	31	31	80	M
K14	4	32	80	M

## 2.2 Vorbereitung des Tumorgewebes

Für die Experimente wurde Tumorgewebe verwendet, das den Patienten während der ersten Tumorexzision entnommen und im Institut für Neuropathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg aufbereitet, in Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und aufbewahrt wurde. Die entsprechenden Paraffinblöcke wurden aus dem Gewearchiv der Neuropathologie herausgesucht. Nach circa 30-minütiger Kühlung auf Eis wurden von diesen Blöcken mit einem Schlittenmikrotom (*Vgl. Tabelle 16: Geräte, S.93*) 3µm dünne Schnitte gefertigt, auf dem Wasserbad geglättet und auf für die Immunhistochemie geeignete Objektträger der Firma Dako (*Vgl. Tabelle 16: Geräte, S.93*) aufgezogen. Diese Objektträger haben eine spezielle Beschichtung, in der Regel Silane, was zu einer besseren Haftung der Gewebeschnitte beitragen soll. Im Anschluss an diese Prozedur wurden die fertigen Schnitte im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht getrocknet.

## 2.3 Antigendemaskierung

Da die Tumorgewebe durch Formalinfixierung und Paraffineinbettung in ihrer Struktur verändert wurden und man befürchten musste, dass zumindest einige Epitope nicht mehr für eine Antigen-Antikörper-Reaktion zur Verfügung stehen würden, erfolgte eine Vorbehandlung. Bei der sogenannten Antigendemaskierung sollten diese Prozesse rückgängig gemacht werden. In dieser Studie wurde das Verfahren der Hitzebehandlung im Dampfgarer angewandt.

Den ersten Schritt der Antigendemaskierung stellte das Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte dar. Paraffin erschwert durch seine hydrophoben und alkoholunlöslichen Eigenschaften ein gleichmäßiges Färben des Gewebes. Wird es nicht vollständig aus den Schnitten gelöst, entstehen Flecken in der Färbung und eine Auswertung ist nicht präzise möglich. Zu diesem Zweck wurden alle zu färbenden Schnitte mit Xylol (Cleaning-Reagenz, *Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) behandelt. Die Objektträger wurden für fünf Minuten in einer Küvette mit Xylol 1 entparaffiniert. Dann wurde die Küvette abgegossen und mit Xylol 2 aufgefüllt. In diesem standen die Objektträger erneut fünf Minuten. Während dieser fünf Minuten wurde darauf geachtet, dass alle Objektträger von jeder Seite gleichermaßen mit Xylol benetzt werden, um das Paraffin vollständig aus den Gewebeschnitten lösen zu können. War dies nach Abschluss der Behandlung nicht gelungen, erkennbar an einer Schlierenbildung bei der Rehydrierung, mussten oben genannte Schritte nochmals wiederholt werden.

Die anschließende Rehydrierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe. Für je zwei mal fünf Minuten wurden die Schnitte in einer Küvette mit 100%igem Alkohol, danach

für fünf Minuten in 70%igem Alkohol rehydriert (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*). Im Anschluss daran wurden sie in destilliertem Wasser gespült.

Der Boden des Dampfgeräts wurde währenddessen mit 1l destilliertem Wasser befüllt. Die Saftauffangschale wurde eingelegt. Auf diese wurde die Dampfkammer gestellt, in welche wiederum der Garbehälter gestellt wurde. Die Inkubationskammer wurde mit dem entsprechenden Puffer gefüllt und in den Garbehälter gestellt. Für die überwiegende Zahl der Antikörper wurden die Schnitte mit dem gebrauchsfertigen Target Retrieval-Puffer 9,0 der Firma DAKO vorbehandelt (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*). Für die Antikörper CD 4 und CD 20 musste mit Citratpuffer 6,0 und für CD 8 mit BDA-Puffer vorbehandelt werden (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*).

Der Citratpuffer wurde nach Laborprotokoll eigens hergestellt. Dafür wurde eine Lösung A, aus 100ml destilliertem Wasser und 2,101g Zitronensäure der Firma Merck (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) und eine Lösung B, bestehend aus 200ml destilliertem Wasser und 7,35g Natriumcitrat der Firma Merck (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*), angesetzt. 18ml der Lösung A wurden dann mit 82ml der Lösung B auf 100ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mittels Natronlauge und 1%iger Salzsäure (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) auf 6,0 eingestellt.

Die Herstellung des BDA-Puffers erfolgte durch den Ansatz von 18ml Retrieval Solution 1 und 82ml Retrieval Solution 2 der Firma BD Biosciences (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) mit destilliertem Wasser auf insgesamt 1l. Der pH-Wert wurde auf 6,0 eingestellt.

Die Auswahl der Puffer erfolgte für übliche Antikörper nach Protokoll des Neuropathologielabors. Bei den ungebräuchlicheren Antikörpern erfolgte die Wahl der Puffer nach Empfehlung des entsprechenden Antikörper-Herstellers (*Vgl. Tabelle 2: Antikörpertitrierung, S.29*). Nachdem der Deckel auf die Dampfkammer gelegt wurde, erfolgte die Erhitzung des Puffers bei circa 95 °C für eine Dauer von etwa 20 Minuten. Anschließend wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte in die Inkubationskammer gestellt und für 20 Minuten im Wasserdampf inkubiert. Nach erfolgter Inkubation und anschließender zehnmütiger Abkühlung in der Pufferlösung wurden die Objektträger nochmals mit destilliertem Wasser und für fünf Minuten mit Spülpuffer der Firma DAKO gespült (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94*).

## 2.4 Autostaining

### 2.4.1 Immunfärbeautomat und Antikörperdetektionssystem

Die gewählte immunhistochemische Färbetechnik erfolgte mit einem Immunfärbeautomat der Firma DAKO mittels firmeneigenem entwickeltem Detektionssystem (Vgl. *Tabelle 16: Geräte, S.93*).

Bei diesem Zwei-Schritt-Detektionssystem wurde das Gewebe im ersten Schritt mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung und im zweiten Schritt mit einem peroxidasekonjugierten Dextranpolymer (HRP) inkubiert, welches an die Moleküle sekundärer Antikörper gekoppelt war. Die Antigen-Antikörperreaktion wurde dann durch Färbung mit einem Substratsystem, bestehend aus einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB<sup>+</sup> Chromogen) und einem wasserstoffperoxidhaltigen Puffer (Substrate Buffer), sichtbar gemacht. Zu diesem Zweck musste jedoch zu Beginn des Färbeprozesses die endogene Peroxidase im Gewebe blockiert werden (DAKO REAL Peroxidase-Blocking Solution, Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*).

### 2.4.2 Ansetzen der Reagenzien

Die Lösung zur Blockierung der endogenen Peroxidase und HRP wurde vom Hersteller gebrauchsfertig (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) im Kit mitgeliefert, sodass die benötigte Menge Substrat direkt in die dafür vorgesehenen Reagenzröhrchen pipettiert werden konnte. 20µl der DAB<sup>+</sup> Chromogen-Lösung wurden mit 1ml Substrate Buffer (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) angesetzt und bildeten nach gründlicher Durchmischung das Substratsystem.

Welche Menge an Reagenzien pro Färbedurchlauf benötigt wurde, zeigte die Gerätesoftware an. Dazu musste der geplante Durchlauf vorher im Programm angelegt und eingegeben werden. Die Reagenzien wurden anschließend im dafür vorgesehenen Reagenzhalter in den Färbeautomat gestellt. Die Anordnung der Reagenzien im Reagenzhalter war vom Autostainer vorgegeben (Vgl. *Abbildung 1: Position der Substrate im Autostainer, S.28*).

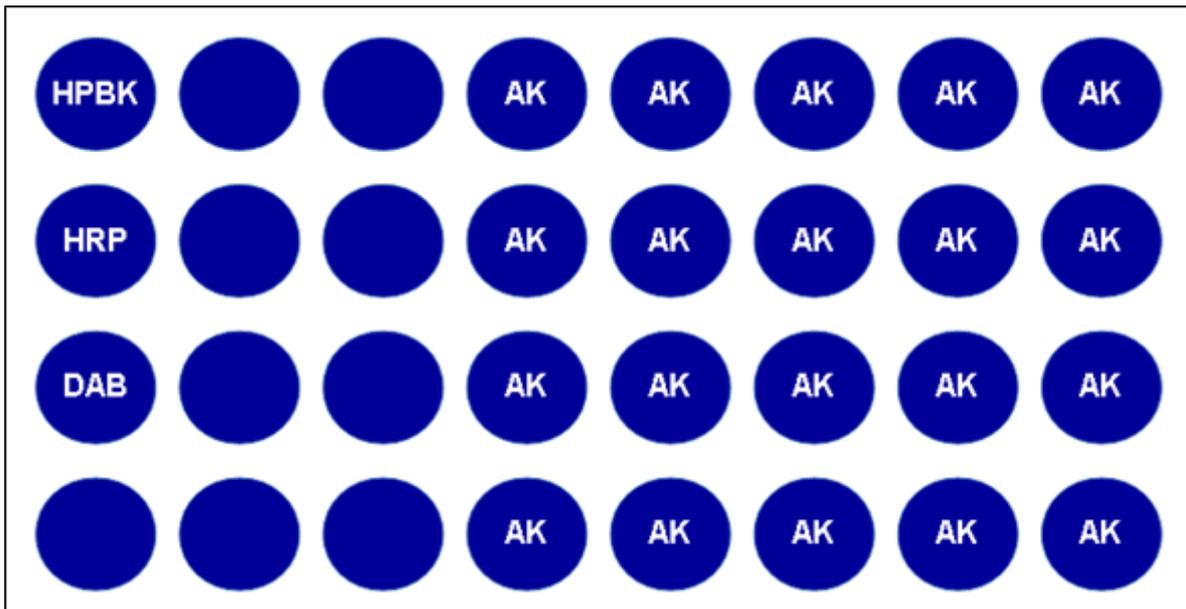


Abbildung 1: Position der Substrate im Autostainer

### 2.4.3 Antikörpertitrierung

Zur Ermittlung des optimalen Verdünnungsverhältnisses wurden die vom Hersteller vorgegebenen Testgewebe nach Anweisung immunhistochemisch gefärbt und die Antikörper bis zum bestmöglichen Ergebnis auftitriert (Vgl. Tabelle 2: Antikörpertitrierung, S. 29). Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit Antikörper-Diluent der Firma Dako (Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S.94). Alle Reagenzien wurden mit Pipetten der Firma Eppendorf in Kunststoffreagenzröhrchen derselbigen Firma hinein pipettiert. Mithilfe eines Vortexers (Vgl. Tabelle 16: Geräte, S.93) wurde eine gute Durchmischung gewährleistet. Anschließend wurden die Antikörperlösungen zu den Detektionsreagenzien in den dafür vorgesehenen Reagenzhalter gestellt.

Tabelle 2: Antikörpertitrierung

Primärantikörper	Positivkontrolle	Verdünnung	Vorbehandlung
CD 4	Appendix	1:30	Citrat 6,1
CD 8	Tonsille	1:30	BDA-Puffer
CD 14	Makrophagen	1:100	Target 9.0
CD 20	Appendix	1:800	Citrat 6,1
CD 25	Lymphknoten	1:100	Target 9.0
CD 26	Prostata	1:100	Target 9.0
CD 57	Lymphknoten	1:100	Target 9.0
CD 95	Pankreas	1:200	Target 9.0
CD 95L	Plazenta	1:100	Target 9.0
HLA Class II (DR) Antigen	Lymphknoten	1:400	Target 9.0
IDH1 R132H	Glioblastom	1:300	Target 9.0

#### 2.4.4 Positiv- und Negativkontrolle

Bei jedem Färbedurchlauf wurde eine als positiv bekannte Kontrollprobe (Testschnitt) mitgeführt, um die Leistung der verwendeten Reagenzien zu bestätigen (Vgl. Tabelle 2: Antikörpertitrierung, S.29). Durchläufe, in denen die Testschnitte keine Färbung aufwiesen, wurden als ungültig erklärt und wiederholt. Als spezifische Färbung galt eine Braunfärbung des Zielantigens.

Zum Ausschluss falsch positiver oder unspezifischer Reaktionen wurden bei jedem nicht in der Routinediagnostik gebräuchlichem Antikörper Leerschnitte mitgeführt. Durchläufe, in denen sich das Testgewebe unspezifisch anfärbte, wurden als ungültig erklärt und wiederholt. Unspezifische Färbungen zeigten sich in Form einer diffusen Braunfärbung. Waren die Antikörper in der Routine erprobt, wurden entsprechend Laborprotokoll im Verlauf keine Leerschnitte mehr mitgeführt.

### 2.4.5 Programmierung des Autostainer

Über die Gerätesoftware wurden die Färbedurchläufe programmiert. Ein neuer Durchlauf wurde im Programm aufgerufen und nach dem Datum der Durchführung und eventuellen Zusätzen benannt. Die Anzahl der zu färbenden Objektträger wurde angegeben und entsprechend benannt. Die zu färbenden Antikörper wurden den Objektträgern zugeordnet. Dabei waren die zur Vorbehandlung verwandten Puffer bereits für jeden Antikörper im System hinterlegt. Anschließend wurden Etiketten gedruckt und auf die Objektträger aufgetragen. Das Programm zeigte anschließend eine Matrix, nach deren Vorgabe die Reagenzröhrchen im Gerät positioniert wurden (*Vgl. Abbildung 1: Position der Substrate im Autostainer, S.28*).

### 2.4.6 Prozess der Immunhistochemischen Färbung

Nach Abschluss aller Vorbereitungen wurde der Autostainer mit den zu färbenden Objektträgern beladen. Sinnvollerweise lagen Objektträger, die die gleiche Antikörperbehandlung erhielten, beieinander. Alle Objektträger wurden nochmals mit Spülpuffer der Firma DAKO (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S. 94*) vorsichtig befeuchtet. Vor Beginn des Durchlaufs wurde auf einen gefüllten Spülpuffertank geachtet. Die Schläuche der Pumpe wurden entlüftet, der Deckel geschlossen und das Programm gestartet. Der Autostainer begann die Position der Objektträger anhand des Barcodes zu scannen. So wurde gewährleistet, dass jeder Objektträger die richtige Antikörperbehandlung erhielt. Nach erfolgter Selbstreinigung der Pipettieradel wurden alle Objektträger vorgespült. Dann pipettierte die Pumpe exakt die Menge Substrat, die für die Behandlung von vier Objektträgern nötig war. Nachdem vier Objektträger abgeblasen und mit entsprechendem Substrat behandelt wurden, pipettierte das Gerät erneut und behandelte die nächsten vier Objektträger. Die erste Behandlung erfolgte mit der Peroxidase-Blocking-Solution zur Blockierung der endogenen Peroxidase. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurden alle Objektträger gründlich gespült. Die Pipettieradel wurde gereinigt. Es schloss sich die Behandlung mit den zu untersuchenden Primärantikörpern nach dem gleichen Verfahren an. Nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten und gründlicher Spülung wurden die Objektträger mit HRP (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S. 94*) behandelt, welches für eine Inkubationsdauer von 30 Minuten auf den Objektträgern belassen wurde. Zu allerletzt erfolgte eine 15-minütige Behandlung mit DAB<sup>+</sup> (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S. 94*). Alle Inkubationsvorgänge erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

## 2.5 Nachbehandlung

Nach Ende des Programmlaufs wurden die Objektträger dem Gerät entnommen und der Hämatoxylin-Gegenfärbung zugeführt. Dazu wurden sie nochmals in mit destilliertem Wasser befüllten Küvetten gespült. Das destillierte Wasser wurde verworfen und die Küvette mit Hämatoxylin (*Vgl. Tabelle 17: Reagenzien, S. 94*) gefüllt. Nach einer Minute Kernfärbung wurde das Hämatoxylin wieder abgegossen und die Objektträger mit heißem Wasser (H<sub>2</sub>O) gespült. Dieser Prozess bewirkte eine Blaufärbung des Zellkerns (Bläuen) und somit eine Kontrastverstärkung.

Abschließend erfolgte die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die die Objektträger enthaltende Küvette wurde mit 70%igem Alkohol befüllt. Dieser Prozess diente der Differenzierung. Nach fünf Minuten Einwirkzeit wurde der Alkohol verworfen. Die Objektträger wurden nun zweimal kurz in 96%igem Alkohol gespült. Im Anschluss wurden die Gewebe für fünf Minuten mit 100%igem Alkohol behandelt. Abschließend wurden die Schnitte in Xylol geklärt, davon fünf Minuten in Xylol 3 und mindestens fünf Minuten in Xylol 4 entsprechend Laborprotokoll.

Die Eindeckung der Schnitte erfolgte mit Deckgläschen der Firma Menzel und Corbitbalsam (*Vgl. Tabelle 16: Geräte, S.93; Tabelle 17: Reagenzien, S. 94*). Bis zur Eindeckung wurden die Schnitte in Xylol 4 aufbewahrt.

Alle Schritte sind zusammenfassend in unten stehender Abbildung aufgeführt (*Vgl. Abbildung 2: Protokoll Immunhistochemie, S.31*).

### Protokoll Immunhistochemie

1. Entparaffinieren
2. Rehydrieren
3. Demaskierung
4. Dako Autostainer plus
5. Gegenfärbung
6. Dehydrieren
7. Klären
8. Eindecken

Abbildung 2: Protokoll Immunhistochemie

## 2.7 HE- Färbung

Von allen 28 Tumorschnitten wurde zusätzlich eine HE-Übersichtsfärbung angefertigt, anhand derer die Diagnose Glioblastom WHO Grad IV nochmals durch Prof. Dr. Mawrin, Leiter des Instituts für Neuropathologie der Universitätsklinik Magdeburg, verifiziert wurde. Zusätzlich wurden die HE-Schnitte zur genaueren Differenzierung und Lokalisierung von Nekrose und vitalem Tumor bei der Auswertung herangezogen.

Um eine gleichmäßige Färbung des Gewebes zu erzielen, mussten die Paraffinschnitte, wie oben bereits beschrieben, entparaffiniert und rehydriert werden. Nachdem die Objektträger mit Leitungswasser gründlich gespült wurden, wurden sie für fünf Minuten in Harris-Hämatoxylin gefärbt (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*). Danach wurden sie erneut gründlich mit Leitungswasser gespült. Die Differenzierung erfolgte mit Salzsäurealkohol. Dieser wurde entsprechend Laborprotokoll eigens hergestellt. Zu diesem Zwecke wurde 1l 70%igen Alkohols mit 30ml 25%iger Salzsäure der Firma Roth versetzt (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*). Im Anschluss wurden die Objektträger abermals mit Leitungswasser gespült. Mittels heißen Leitungswassers erfolgte das Bläuen. Für die Plasmafärbung wurde die Küvette mit 1% wässrig, gelblichem Eosin (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) befüllt und nach 20 Sekunden abgegossen. Die Objektträger wurden mit Leitungswasser gespült. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert. Die Klärung erfolgte fünf Minuten in Xylol 3 und fünf Minuten in Xylol 4. Die Schnitte wurden abschließend mit Corbitbalsam eingedeckt (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*).

### Protokoll HE- Färbung

- |                                                                           |                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Schnitte in Xylol entparaffinieren<br>2 x 5min                         | 8. Bläuen mit heißem Wasser<br>1-2 x spülen                                                  |
| 2. In absteigender Alkoholreihe<br>hydrieren<br>100% 2 x 5min<br>70% 5min | 9. Plasmafärbung in Eosin<br>20s                                                             |
| 3. Vorsichtig mit Wasserschlauch<br>spülen                                | 10. Mehrmals mit Wasserschlauch<br>spülen                                                    |
| 4. Kernfärbung in Hämatoxylin<br>5min                                     | 11. In aufsteigender Alkoholreihe<br>dehydrieren<br>70% spülen<br>96% 2x spülen<br>100% 5min |
| 5. Vorsichtig mit Wasserschlauch<br>spülen                                | 12. Klären in Xylol<br>2 x 5min                                                              |
| 6. Differenzierung mit HCl                                                | 13. Eindecken                                                                                |
| 7. Mehrmaliges Spülen mit<br>Wasserschlauch                               |                                                                                              |

Abbildung 3: Protokoll HE-Färbung

## 2.8 MGMT-Promotormethylierung

Zur Gewinnung von Tumorgewebe wurden anhand der HE-Schnitte von Prof. Mawrin jene Areale markiert, die Tumorgewebe enthielten. Diese Areale wurden aus den Paraffinblöcken mit einer Rasierklinge entfernt und das gewonnene Präparat in mehreren Arbeitsschritten entparaffiniert und entwässert. Die Proben wurden getrocknet und durch die Behandlung mit verschiedenen Puffern des Methylierungskits der Firma Zymo Research (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) der Prälyse, also dem Andauen der Zelle und ihrer Bestandteile, zugeführt.

Am nächsten Tag erfolgte die DNA-Präparation mit den Reagenzien des entsprechenden Kits. Die Zellbestandteile wurden verdaut und die DNA durch Behandlung mit 100%igem Alkohol denaturiert. Nach mehrmaliger Zentrifugation und Binden der DNA an eine spezielle Membran wurde diese Silica-Membran in mehreren Arbeitsschritten gewaschen. Die Proben wurden getrocknet und zum Eluieren der DNA aus der Membran mit einem speziellen Puffer versetzt. Der Durchfluss enthielt hochreine DNA.

Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der DNA mit einem Photometer (Vgl. *Tabelle 16: Geräte, S.93*). Die Messwerte wurden in einem Protokoll festgehalten (Vgl. *Tabelle 3: Photometermessung der Reinheit und Konzentration der DNA, S.40*). Aus der DNA-Konzentration wurde dann stöchiometrisch das benötigte Volumen an DNA berechnet.

Als Positivkontrolle diente ein methylierter Standard (Cp-Genome Universal Methylated DNA, Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*). Blut diente als unmethylierter Standard. Beide wurden mit entsprechenden Puffern des Methylierungskits behandelt und inkubiert. Die Behandlung mit dem Conversion-Reagenz (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*) stellte die eigentliche Bisulfidbehandlung dar. Durch diese Behandlung erfolgte bei nicht-methylierter DNA eine Konversion des unmethylierten Cytosins zu Uracil. Blieb diese Konversion aus, so handelte es sich um methyliertes Cytosin und damit methylierte DNA. Am Folgetag wurden die Proben erneut mit Puffern behandelt und an eine Membran in entsprechend präparierten Röhrchen gebunden. Nach dem Eluieren der DNA aus der Membran enthielt der Durchfluss wieder reine DNA.

Der Ansatz der PCR erfolgte gemäß Protokoll (Vgl. *Abbildung 4: Protokoll PCR-Ansatz, S.34*) für den methylierten und unmethylierten Ansatz. Der PCR-Puffer, die Nucleotide, DMSO und die Taq-Polymerase waren Bestandteile des Kits der Firma Qiagen (Vgl. *Tabelle 17: Reagenzien, S.94*). Zu diesem Ansatz wurden je 2µl der jeweiligen DNA pipettiert. Alle Proben wurden also jeweils einmal mit einem methylierten und einem unmethylierten Primer (Vgl. *Abbildung 4: Protokoll PCR-Ansatz, S.34*) angesetzt. Die

Proben wurden anschließend in den Thermocycler gestellt und durchliefen dort 38 Zyklen gemäß Protokoll (Vgl. Abbildung 5: Protokoll Thermocycler, S.35.).

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 8%igen Polyacrylamidgel, welches gemäß Protokoll (Vgl. Abbildung 6: Protokoll Polyacrylamidgel, S.35) in einer Elektrophoresekammer der Firma Pharmacia (Vgl. Tabelle 16: Geräte, S.93) hergestellt und gefärbt wurde (Vgl. Abbildung 7: Protokoll Silberfärbung von Gelen, S.36).

<u>Protokoll PCR-Ansatz</u>			
Primer-			
Sequenzen:	unmethyliert forward (UF2):	tgtgttttagaatgtttgtgtttgat	
	unmethyliert reverse (UR2):	ctaccaccatcccaaaaaaaaaactcca	
	methyliert forward (MF2):	gttttagaacgtttgcgtttcgac	
	methyliert reverse (MR2):	ctaccaccatcccaaaaaaaaaactcca	
1. <u>Für den unmethylierten Ansatz</u>		2. <u>Für den methylierten Ansatz</u>	
10 x PCR-Puffer	12,5µl	10 x PCR-Puffer	12,5µl
2mM dNTPs	2,5µl	2mM dNTPs	2,5µl
Forward UF2	2,0µl	Forward MF2	2,0µl
Reverse UR2	2,0µl	Reverse MR2	2,0µl
Hotstar-Taq	0,125µl	Hotstar-Taq	0,125µl
H <sub>2</sub> O	6,5µl	DMSO	1,25µl
		H <sub>2</sub> O	5,25µl

Abbildung 4: Protokoll PCR-Ansatz

Protokoll Thermocycler1. Für den unmethylierten Ansatz

Zyklen	Temp.	Zeit
38	95°C	15min
	95°C	30s
	56°C	30s
	72°C	30s
	72°C	5min
	4°C	über Nacht

2. Für den methylierten Ansatz

Zyklen	Temp.	Zeit
36	95°C	15min
	95°C	30s
	54°C	30s
	72°C	30s
	72°C	5min
	4°C	über Nacht

Abbildung 5: Protokoll Thermocycler

Protokoll Polyacrylamidgel

22,8ml Acryl-PDA  
 17,2ml Tris-Puffer (120mM)  
 400µl APS (10%ig)  
 40µl TEMED

1. Acryl-PDA

66,5g Acrylamid +  
 3,5g PDA  
 ad 500ml Acqua dest.  
 anschließend durch Filter gießen

2. Tris-Puffer 120mM

90,75g Tris-base +  
 5,21ml 85%iger Ameisensäure  
 ad 1000ml Acqua dest.

3. APS 10%ig

10g APS  
 ad 100ml Acqua dest.

Abbildung 6: Protokoll Polyacrylamidgel

### Protokoll Silberfärbung von Gelen

1. 3min in 2-3%iger Salpetersäure schwenken, bis blauer Teststreifen in gelb umschlägt
2. 3 x mit Acqua dest. spülen
3. 20min in Silbernitratlösung reagieren lassen
4. 3 x mit Acqua dest. spülen
5. 4-5 x in Natriumcarbonat-Formalinlösung spülen, bis Banden erscheinen
6. 1 x mit Acqua dest. spülen
7. 3min in 10%iger Essigsäure schwenken
8. 2min mit Acqua dest. spülen
9. 5min in Glycerol reagieren lassen
10. Hinterseite der Folie abwischen und zum Trocknen aufhängen

Abbildung 7: Protokoll Silberfärbung von Gelen

## 2.9 Auswertung

### 2.9.1 Immunhistochemie

Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop nach dem Prinzip der ten high-power fields. Bei diesem semiquantitativen Verfahren wurden diejenigen zehn Areale bestimmt, die die stärkste Reaktion zeigten, also die meisten gefärbten Zellen enthielten und dann in 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Dabei fanden nekrotische oder eingeblutete Areale und der perivaskuläre Raum keine Berücksichtigung. Als positive Zellen galten diejenigen, deren Zytoplasma, im Falle von CD 14, CD 57 und CD 95-L, oder deren Zellmembran (alle anderen) sich nach der immunhistochemischen Behandlung braun anfärbten. Unspezifische Färbungen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

### 2.9.2 MGMT-Promotormethylierung

Die Auswertung der MGMT-Promotormethylierung erfolgte anhand der Fragmentlängen, welche für methylierte DNA bei 114bp und für unmethylierte DNA bei 120bp lagen. Zuerst wurden die Banden der methylierten Standard-DNA und des unmethylierten Blutes betrachtet. Der methylierte Standard sollte hierbei eine starke Bande und das Blut keine Bande aufweisen. Zur Auswertung wurden dann erst jene Proben abgelesen, die mit dem unmethylierten Primer behandelt wurden. Bei allen Proben, die keine unmethylierte Bande aufwiesen, konnte die PCR nicht ausgewertet werden. Anschließend wurden die methylierten Banden abgelesen und alle Proben, die Banden aufwiesen, als methyliert gewertet. Proben, die keine Banden aufwiesen, wurden als unmethyliert gewertet.

### 2.9.3 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS Statistics beziehungsweise PASW 19 und wurde vom Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit betreut. Die Auswahl des richtigen Testverfahrens gestaltete sich unter anderem aufgrund des geringen Stichprobenumfangs schwierig. Wegen starker Schwankungen innerhalb der Ergebnisse (Vgl. *Abbildung 17-Abbildung 20, S.60-61*) und sehr schiefer Verteilungskurven entschieden wir uns gegen ein metrisches Verfahren und somit für einen zweiseitigen nicht-metrischen Test. Mit dem Statistikprogramm SPSS berechneten wir mittels U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney den Unterschied beider Gruppen in Hinsicht auf die jeweilige Zahl positiver Zellen im Tumorschnitt, bezogen auf die jeweiligen Mittelwerte. Wir führten den U-Test außerdem für die Standardabweichungen der erhobenen Daten aus und erhielten gleiche inhaltliche Ergebnisse. Alle p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant, alle p-Werte unter 0,01 als hoch signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Überlebensdauer

Das mittlere Überleben der untersuchten Gruppe der LTS betrug 43,6 Monate (Spanne 31 bis 107 Monate). So definierten wir für unsere Untersuchungen alle Patienten, die länger als 30 Monate nach Diagnosestellung überlebten, als LTS. Patienten, die weniger als 16 Monate nach Diagnosestellung überlebten, wurden der Kontrollgruppe zugeordnet und somit als STS definiert. Der Abstand zwischen beiden Cut-Off-Werten wurde bewusst groß gewählt, um systematische Fehler so klein wie möglich zu halten.

Um zu zeigen, dass sich die Kontrollpatienten in Bezug auf wichtige prognostische Parameter nicht wesentlich unterscheiden, führten wir für diese Einflussgrößen einen Zweistichproben-t-Test durch. Nach dem Welch-Test ergab sich so für das Erkrankungsalter ein p von 0,9526 und für den Karnofsky-Index ein p von 0,7019. Um zu zeigen, dass die Überlebensdauer vom Geschlecht der Patienten unabhängig war, führten wir den exakten Test nach Fisher durch. Hier ergab sich ein p von 1,0. *Abbildung 8* zeigt die Überlebensrate des Patientenkollektivs. Vier Patienten waren zum Zeitpunkt der Erhebung noch am Leben und mussten bezüglich der Überlebensdauer zensiert werden. Die Cox-Regressionsanalysen für relevante Parameter erbrachten daher leider nur unbefriedigende Ergebnisse (Daten nicht ausgewiesen).

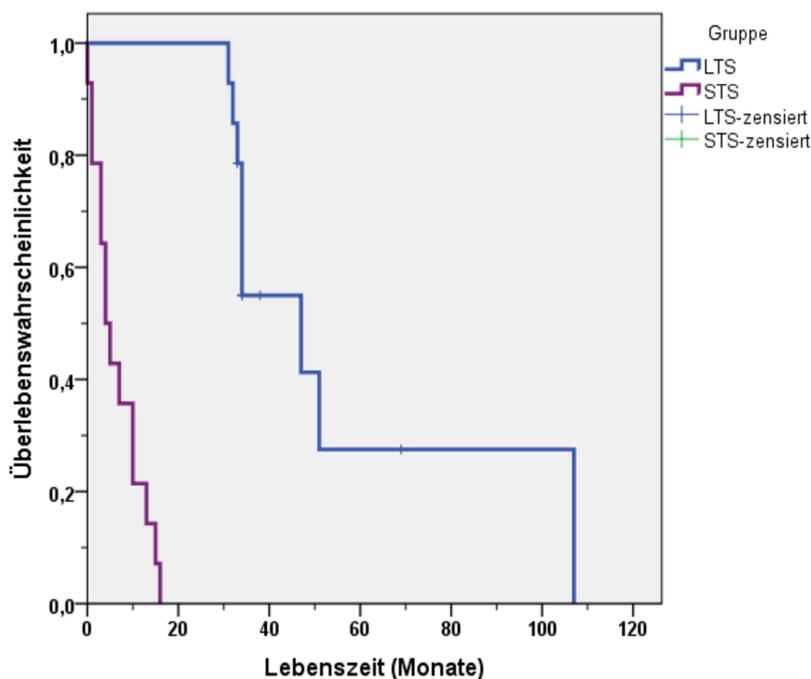


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve

## **3.2 Die etablierten Prognosemarker IDH1 R132H und MGMT**

### **3.2.1 IDH1 R132H**

In der Auswertung zeigte sich eine zytoplasmatische Braunfärbung. Als Positivkontrolle diente Glioblastomgewebe mit bekannter IDH1 R132H-Mutation. Der Testschnitt war positiv. Die Auswertung erfolgte qualitativ. Alle Schnitte waren negativ. Die Ergebnisse bestätigen, dass zwischen LTS und STS kein Unterschied bezüglich der IDH1 R132H-Mutation bestand. Folglich litten ausnahmslos alle 28 Patienten unter einem primären Glioblastom.

### **3.2.2 MGMT-Methylierungsstatus**

In der Gruppe der LTS konnten 3 von 14 Proben (21,4%) nicht ausgewertet werden. Von den 11 ausgewerteten Proben der Langzeitüberlebenden waren 54,5% methyliert, 45,5% unmethyliert. Von den Proben der 14 Kurzzeitüberlebenden konnten 5 (35,7%) nicht ausgewertet werden. Von den verbleibenden 9 auswertbaren Proben waren 55,5% der STS methyliert, 44,5% unmethyliert. Die nicht auszuwertenden Proben wurden zensiert, um sie nicht in die statistischen Berechnungen, wie beispielsweise die Cox-Regressionsanalyse, mit einfließen zu lassen. Die Zahl der zensierten Werte war jedoch so hoch, dass keine validen Aussagen zur statistischen Signifikanz dieser Ergebnisse möglich waren.

Zumindest lassen unsere Untersuchungen den Schluss zu, dass sich die Methylierungsstatus des MGMT-Promotors in beiden Gruppen nicht wesentlich unterscheiden.

Tabelle 3: Photometermessung der Reinheit und Konzentration der DNA

Patient	DNA-Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Reinheitwert 260/280	Reinheitwert 260/230	Vol. DNA ( $\mu\text{l}$ )	Vol. Acqua ( $\mu\text{l}$ )
1	0,20	1,83	2,04	5	40
2	0,008	-	0,62	45	0
4	0,01	1,73	0,5	45	0
5	0,21	1,37	1,8	5	40
6	0,16	1,27	1,03	7	38
7	0,08	1,76	1,59	13	32
8	0,09	1,35	1,11	12	33
9	0,1	2,03	2,02	10	35
10	0,08	0,02	2,05	13	32
11	0,12	1,47	1,27	9	36
12	0,16	1,41	1,11	7	38
13	0,28	2,39	1,41	4	41
14	0,02	3,59	0,6	45	0
K1	0,03	2,1	1,64	34	11
K3	0,04	2,01	1,47	25	20
K4	0,09	1,65	1,44	12	33
K5	0,09	1,79	1,56	12	33
K6	0,05	1,77	1,43	20	25
K7	0,02	2,3	1,31	45	0
K8	0,01	-	0,97	45	0
K10	0,32	1,78	1,78	4	41
K11	0,01	-	0,71	45	0
K12	0,58	1,91	2,1	2	43
K13	0,35	1,6	1,48	3	42
K14	0,15	1,94	1,9	7	38

Tabelle 4: Elektrophoresebanden

	Unmethylierter Primer	Methylierter Primer	Ergebnis
Patient	Bande	Bande	
1	+	-	unmethyliert
2	<i>Keine Auswertung möglich</i>		
3			Ergebnis aus Datenbank methyliert
4	<i>Keine Auswertung möglich</i>		
5	+	+	methyliert
6	+	-	unmethyliert
7	+	(+)	schwach methyliert
8	+	+	methyliert
9	+	+	methyliert
10	+	-	unmethyliert
11	+	+	methyliert
12	<i>Keine Auswertung möglich</i>		
13	+	-	unmethyliert
14	+	-	unmethyliert
K1	<i>Keine Auswertung möglich</i>		
K2	<i>Keine Auswertung möglich</i>		
K3	+	(+)	schwach methyliert
K4	+	-	unmethyliert
K5	<i>Keine Auswertung möglich</i>		
K6	+	-	unmethyliert
K7	+	(+)	schwach methyliert
K8	+	-	unmethyliert
K9	<i>Keine Auswertung möglich</i>		
K10	+	-	unmethyliert
K11	<i>Keine Auswertung möglich</i>		
K12	+	+	methyliert
K13	+	+	methyliert
K14	+	+	methyliert

### 3.3 CD 4

CD 4-markierte Zellen wiesen in der Auswertung eine Oberflächenfärbung auf. Als Positivkontrolle ließen wir menschliches Appendixgewebe mitlaufen. Der Testschnitt war positiv.

*Tabelle 5: Ergebnisse für CD 4*

LTS		STS	
Patient	Summe positiver Zellen der HPF	Kontrolle	Summe positiver Zellen der HPF
1	46	K1	24
2	2	K2	20
3	148	K3	22
4	0	K4	200
5	11	K5	9
6	47	K6	56
7	106	K7	155
8	108	K8	2
9	229	K9	13
10	59	K10	21
11	94	K11	12
12	47	K12	7
13	32	K13	67
14	48	K14	21
Mittelwerte	69,79		44,93

Die Mittelwerte der Anzahl CD 4-positiver Zellen lagen für LTS bei 69,79 und für STS bei 44,93. Mit einem p-Wert von 0,1974 ist dieser Unterschied der CD 4-positiven Zellen mit einem höheren Mittelwert bei den LTS statistisch nicht signifikant.

### 3.4 CD 8

CD 8-markierte Zellen wiesen in der Auswertung eine Oberflächenfärbung auf. Als Testschnitt ließen wir menschliches Tonsillengewebe mitlaufen. Dieser Testschnitt war positiv.

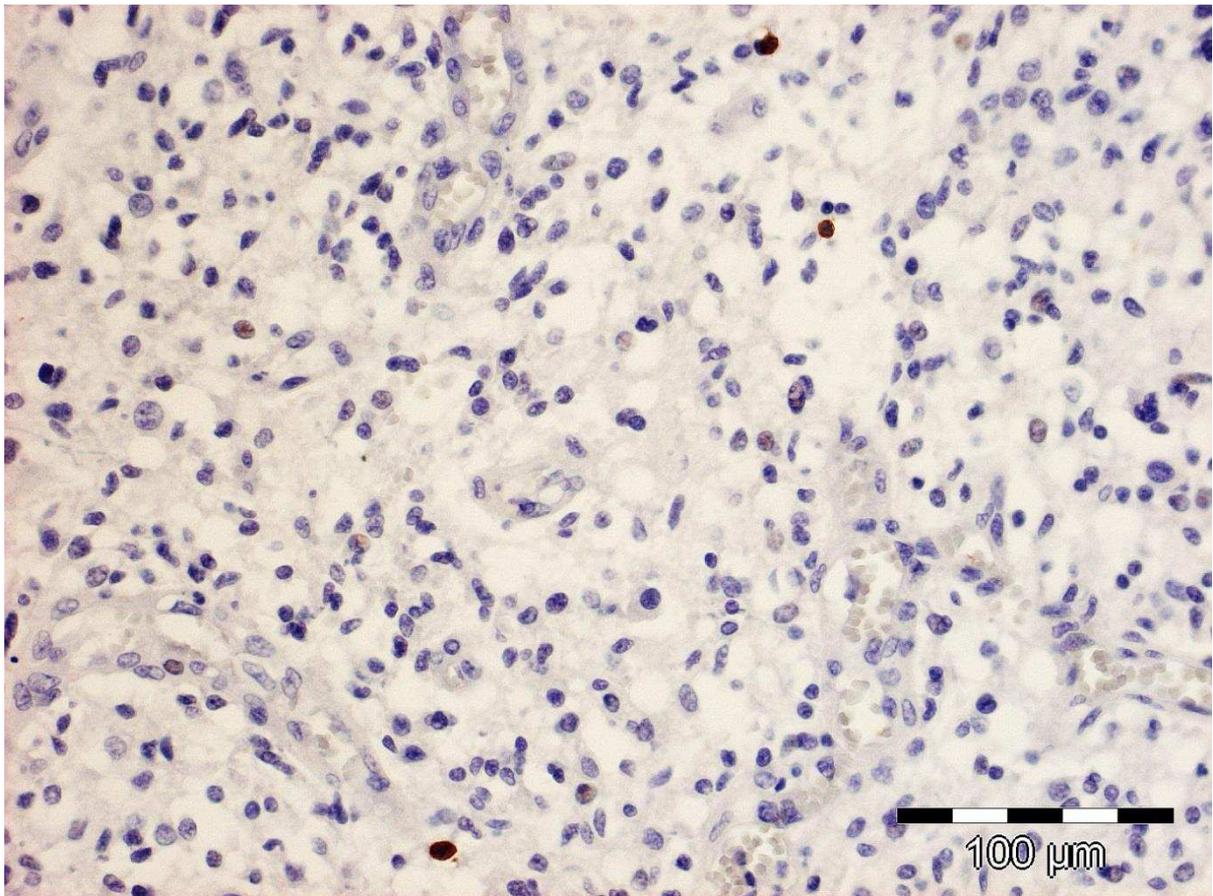


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 8

Tabelle 6: Ergebnisse für CD 8

LTS		STS	
Patient	Summe positiver Zellen der HPF	Kontrolle	Summe positiver Zellen der HPF
1	84	K1	1
2	0	K2	6
3	102	K3	17
4	2	K4	87
5	42	K5	1
6	123	K6	1
7	56	K7	35
8	199	K8	0
9	154	K9	0
10	238	K10	6
11	88	K11	0
12	38	K12	7
13	27	K13	57
14	65	K14	4
Mittelwerte	87		15,86

Die Anzahl CD 8-positiver Zellen war bei den LTS mit 87 mehr als fünfmal so hoch wie bei den STS (15,86). Mit einem p-Wert von 0,0015 konnten wir einen statistisch signifikanten Unterschied der CD 8-Expression zwischen LTS und STS feststellen. Wenn man die Mittelwerte der Anzahl CD 4-positiver Zellen und CD 8-positiver Zellen vergleicht, so zeigt sich im Mittelwert eine höhere Zahl CD 8-positiver Zellen als CD 4-positiver Zellen bei den LTS, wobei sich in der Einzelbetrachtung das Verhältnis auch umkehrt. Bei den STS scheint sowohl im Mittelwert als auch in der Einzelbetrachtung die Expression der CD 4-positiven Zellen gegenüber der der CD 8-positiven Zellen zu überwiegen. Der errechnete CD 4/CD 8-Quotient war bei den STS deutlich höher als bei den LTS (Vgl. Tabelle 7: CD 4/CD 8-Quotient, S. 45). Ein Signifikanzniveau konnte nicht errechnet werden. Aufgrund der Division durch Null entstanden vier zensierte Werte.

Tabelle 7: CD 4/CD 8-Quotient

LTS		STS	
Patient	CD 4/ CD 8-Quotient	Kontrolle	CD 4/ CD 8-Quotient
1	0,55	K1	24,00
2	-	K2	3,33
3	1,45	K3	1,29
4	0,00	K4	2,30
5	0,26	K5	9,00
6	0,38	K6	56,00
7	1,89	K7	4,43
8	0,54	K8	-
9	1,49	K9	-
10	0,25	K10	3,50
11	1,07	K11	-
12	1,24	K12	1,00
13	1,19	K13	1,18
14	0,74	K14	5,25
Mittelwerte	0,80		2,83

### 3.5 CD 14

In der Auswertung zeigte sich eine charakteristische zytoplasmatische und eine Oberflächenfärbung. Als Positivkontrolle dienten menschliche Makrophagen. Der Testschnitt war positiv.

*Tabelle 8: Ergebnisse für CD 14*

LTS		STS	
Patient	Summe positiver Zellen der HPF	Kontrolle	Summe positiver Zellen der HPF
1	20	K1	9
2	0	K2	3
3	40	K3	34
4	0	K4	37
5	8	K5	15
6	0	K6	61
7	128	K7	35
8	8	K8	17
9	113	K9	31
10	81	K10	78
11	90	K11	0
12	46	K12	3
13	38	K13	127
14	22	K14	42
Mittelwerte	42,43		35,14

Bei der statistischen Analyse der Mittelwerte von 42,43 für LTS und 35,14 für STS zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei einem p-Wert von 0,8114.

### 3.6 CD 20

In der Auswertung zeigte sich eine Färbung der Zellmembran. Der menschliche Appendix diente als Positivkontrolle und war im Durchlauf positiv. Den Akten zufolge wurde keiner der von uns selektierten Patienten mit Rituximab behandelt. Bei Patienten, die mit Rituximab behandelt worden sind, kann möglicherweise keine CD 20-Expression mehr nachgewiesen werden.

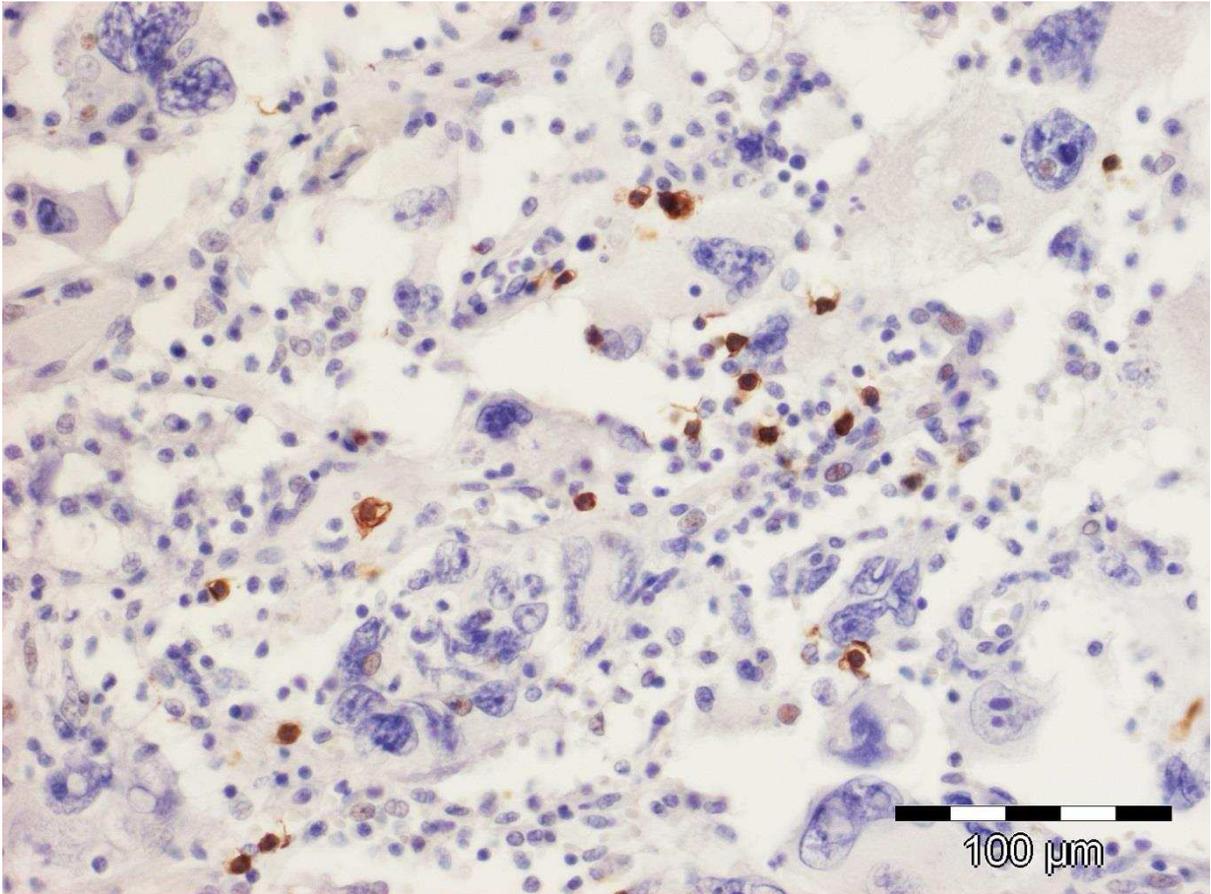


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 20

Tabelle 9: Ergebnisse für CD 20

LTS		STS	
Patient	Summe positiver Zellen der HPF	Kontrolle	Summe positiver Zellen der HPF
1	1	K1	0
2	0	K2	0
3	31	K3	0
4	0	K4	3
5	0	K5	0
6	3	K6	0
7	19	K7	7
8	9	K8	0
9	41	K9	0
10	0	K10	0
11	0	K11	0
12	8	K12	0
13	0	K13	0
14	0	K14	0
Mittelwerte	8		0,71

Die Anzahl positiver Zellen lag bei den LTS im Mittelwert bei 8, bei den STS bei 0,71 Zellen. Mit einem p-Wert von 0,0303 ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Nur bei 2 von 14 STS konnten überhaupt Anfärbungen nachgewiesen werden. Bei den LTS war dies bei der Hälfte der Patienten der Fall.

### 3.7 CD 25

Die positiven Zellen stellten sich in der Auswertung in Form einer Braunfärbung der Oberflächenmembran dar. Als Positivkontrolle lief ein Testschnitt von menschlichem Lymphknoten mit. Der Testschnitt war positiv.

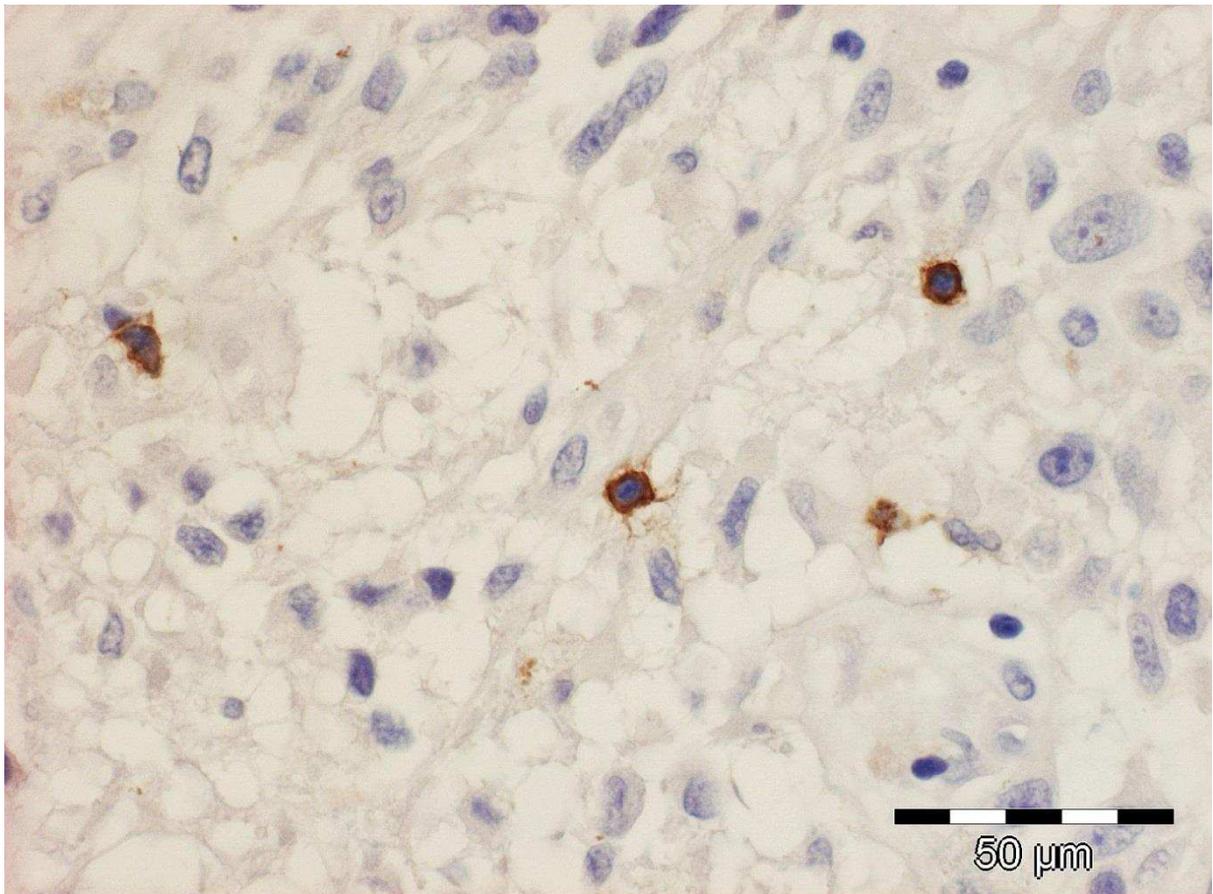


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 25

Tabelle 10: Ergebnisse für CD 25

LTS		STS	
Patient	Summe positiver Zellen der HPF	Kontrolle	Summe positiver Zellen der HPF
1	0	K1	0
2	0	K2	0
3	14	K3	0
4	0	K4	0
5	1	K5	0
6	1	K6	0
7	19	K7	0
8	2	K8	0
9	14	K9	0
10	3	K10	1
11	6	K11	0
12	4	K12	0
13	19	K13	10
14	1	K14	0
Mittelwerte	6		0,79

Bei Mittelwerten von 6 positiven Zellen für LTS und 0,79 positiven Zellen für STS ergab sich bei einem p-Wert von 0,0007 ein hochsignifikanter Unterschied, wobei nur 2 von 14 untersuchten STS-Schnitten und 11 von 14 LTS-Schnitten eine Anfärbung zeigten.

### 3.8 CD 26

In der Auswertung zeigte sich eine Braunfärbung der Oberflächenmembran. Das als Testschnitt mitgeführte humane Prostatagewebe war positiv auf CD 26. Die Auswertung erfolgte qualitativ, da eine quantitative Beurteilung aufgrund deutlicher Positivität nicht möglich war. Alle Tumorschnitte waren stark positiv. Hier bestätigte sich die Spezifität der Färbung zusätzlich durch die Antigen-Antikörper-Reaktion im perivaskulären Bereich.

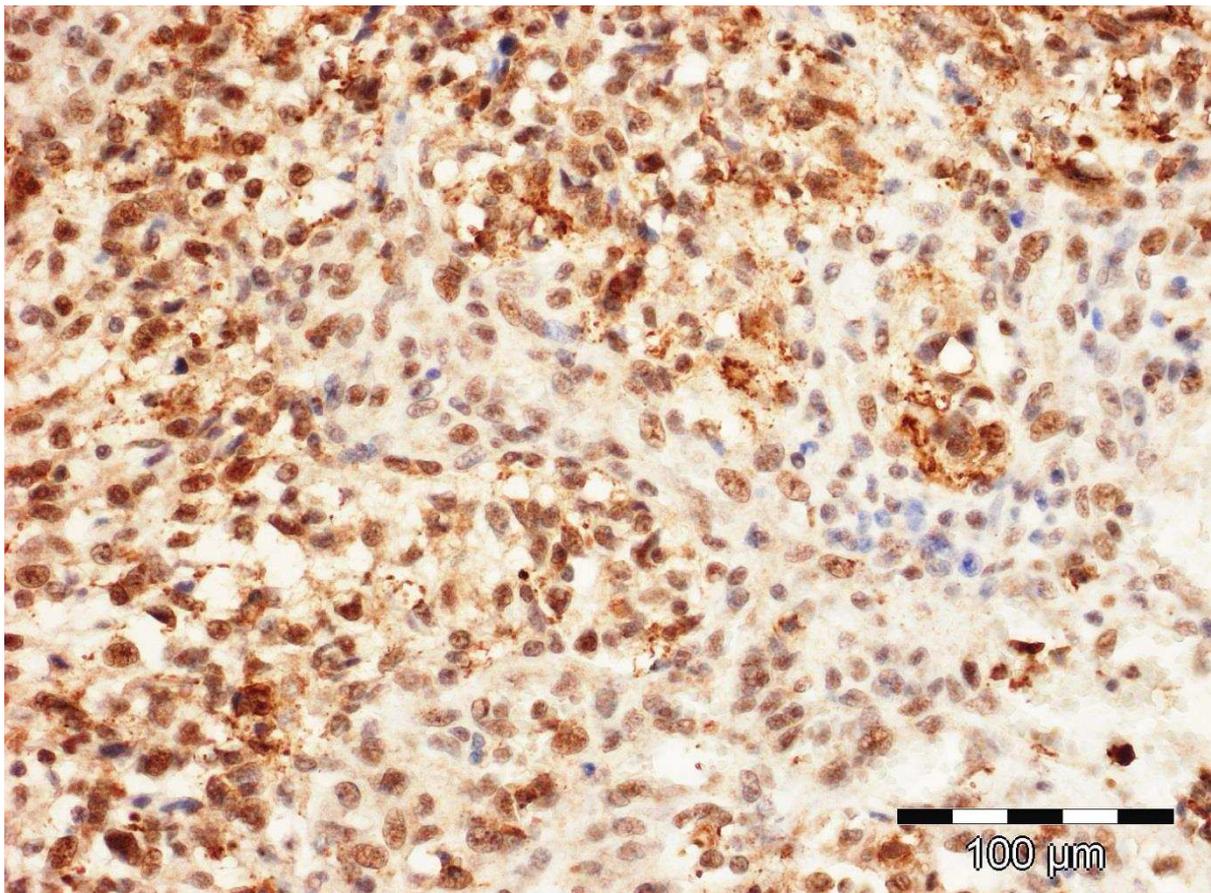


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 26

Alle untersuchten Proben waren stark positiv für CD 26. Eine Wiederholung des Färbeprozesses erbrachte das gleiche Ergebnis. Aufgrund der starken Positivität war keine Differenzierung zwischen Immunzellen und Tumorzellen möglich.

### 3.9 CD 57

Mit diesem Antikörper markierte Zellen wiesen in der Auswertung eine Braunfärbung der oberflächlichen Membran und des Zytoplasmas auf. Als Positivkontrolle ließen wir menschlichen Lymphknoten mitlaufen. Dieser war positiv. Die Auswertung erfolgte qualitativ, da eine quantitative Beurteilung aufgrund deutlicher Positivität nicht möglich war. Ausnahmslos alle Schnitte waren stark positiv. Auch hier lässt sich eine Spezifität der Färbung durch die Antigen-Antikörper-Reaktion im perivaskulären Bereich bestätigen.

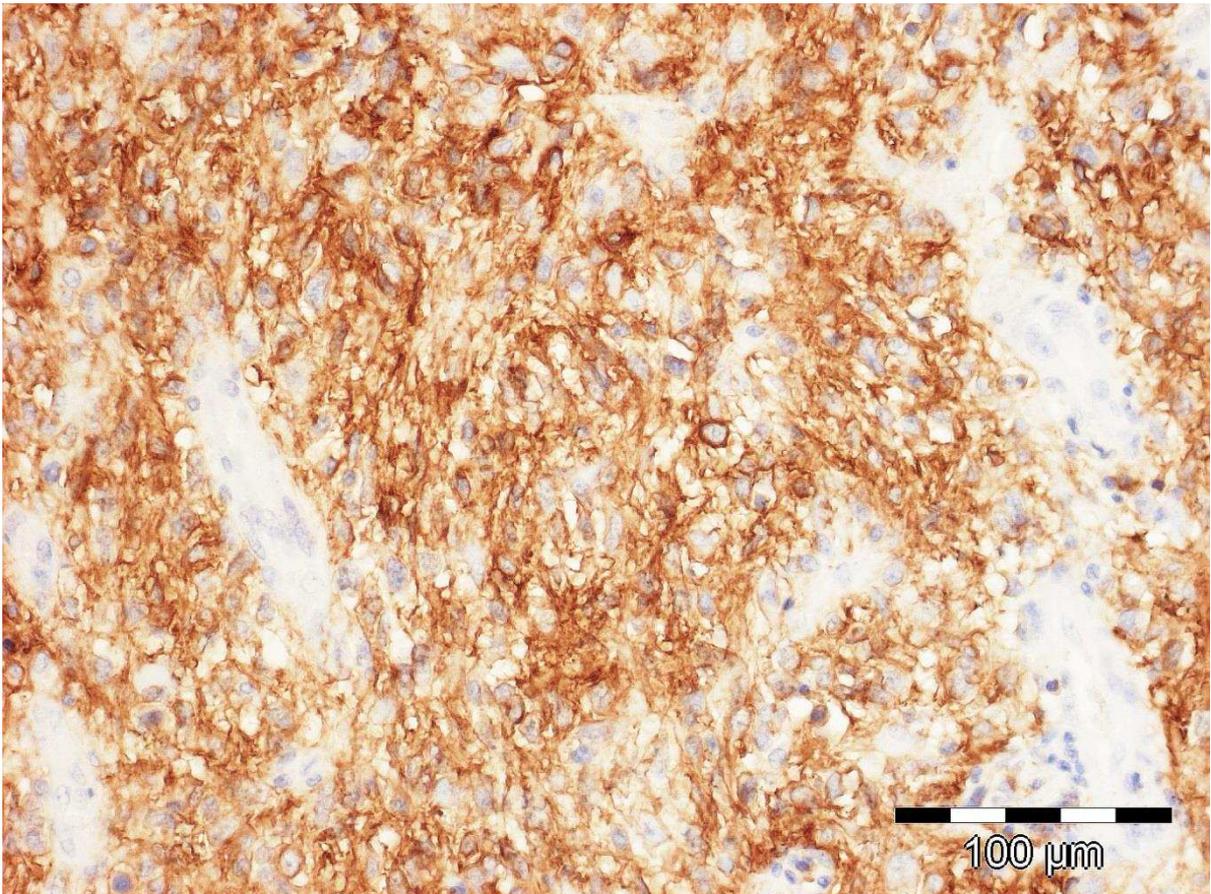


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 57

Alle untersuchten Proben waren stark positiv für CD 57. Eine Wiederholung des Färbeprozesses erbrachte das gleiche Ergebnis. Aufgrund der starken Positivität war auch hier keine Differenzierung zwischen Immunzellen und Tumorzellen möglich.

### 3.10 CD 95

Mit CD 95-Antikörper markierte Zellen wiesen in der Auswertung eine Braunfärbung der Oberflächenmembran auf. Als Testschnitt diente menschliches Pankreas. Dieser war positiv. Bei der Auswertung nach der Methode der ten high-power fields wurden nur Lymphozyten berücksichtigt.

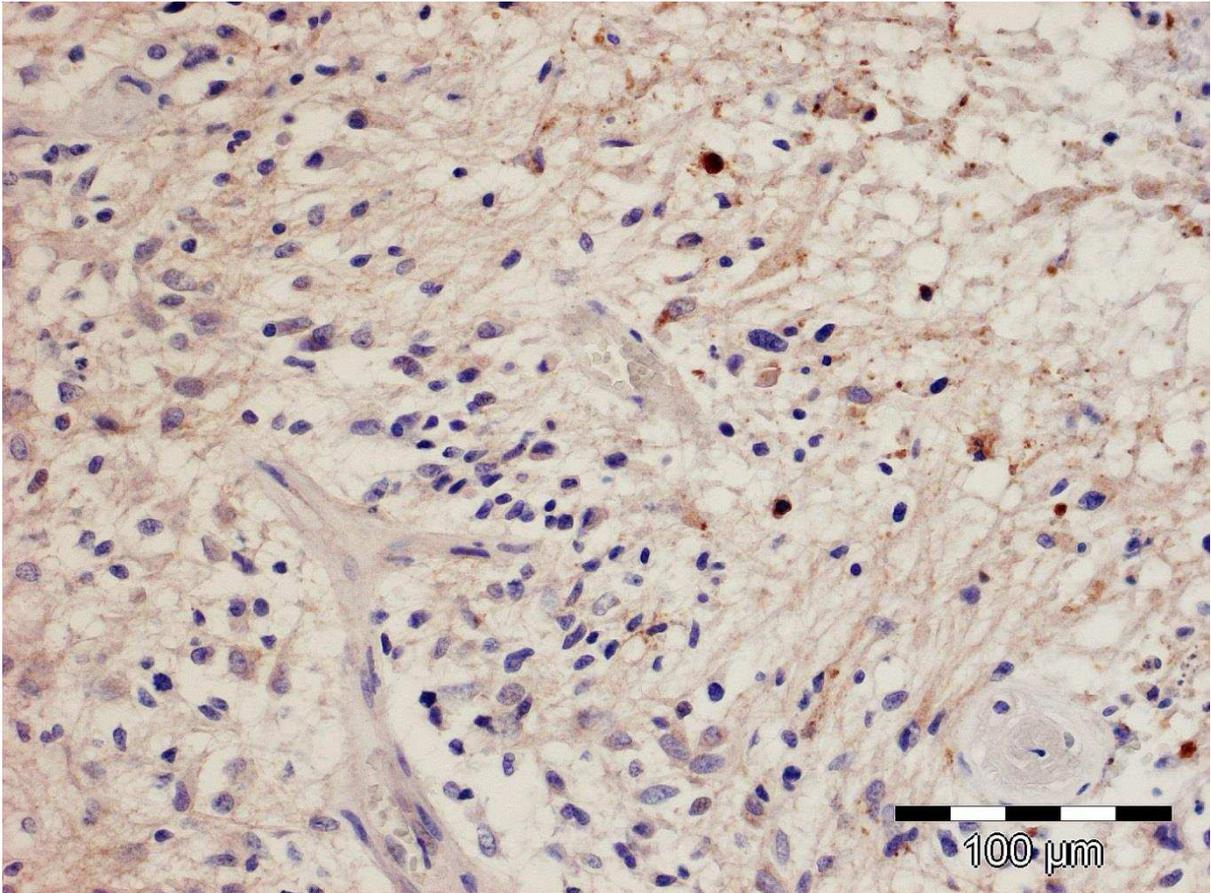


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 95

Tabelle 11: Ergebnisse für CD 95/FAS

LTS		STS	
Patient	Summe positiver Zellen der HPF	Kontrolle	Summe positiver Zellen der HPF
1	16	K1	1
2	0	K2	21
3	13	K3	12
4	4	K4	3
5	3	K5	4
6	50	K6	1
7	13	K7	8
8	18	K8	0
9	9	K9	3
10	19	K10	17
11	5	K11	1
12	8	K12	2
13	21	K13	10
14	18	K14	4
Mittelwerte	14,07		6,21

Im U-Test ergab sich ein p von 0,0279 bei Mittelwerten von 14,07 für die LTS und 6,21 für die STS. Damit konnten wir nachweisen, dass FAS beziehungsweise CD 95 bei den LTS signifikant höher exprimiert wird als bei den STS.

### 3.11 CD 95-L

In der Auswertung zeigte sich eine zytoplasmatische und Oberflächenfärbung. Als Positivkontrolle ließen wir menschliches Plazentagewebe mitlaufen. Der Testschnitt war positiv. Erythrozyten stellten sich ebenfalls stark positiv dar. Bei der Auswertung nach der Methode der ten high-power fields wurden nur Lymphozyten berücksichtigt.

*Tabelle 12: Ergebnisse für CD 95-L/FAS-L*

LTS		STS	
Patient	Summe positiver Zellen der HPF	Kontrolle	Summe positiver Zellen der HPF
1	35	K1	54
2	0	K2	0
3	53	K3	70
4	0	K4	22
5	65	K5	292
6	13	K6	6
7	57	K7	2
8	40	K8	94
9	107	K9	12
10	0	K10	77
11	25	K11	2
12	17	K12	24
13	9	K13	185
14	9	K14	11
Mittelwerte	30,71		60,79

Bei Mittelwerten von 30,71 in der Gruppe der LTS und 60,79 in der Gruppe der STS konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen. Der ermittelte p-Wert beträgt 0,5180. Im Gegensatz zu CD 95 ist der Mittelwert von CD 95-L jedoch bei den STS höher.

Der Vergleich des CD 95/CD 95-L-Quotienten der LTS und STS zeigte daher auch einen im Mittel höheren CD 95/CD 95-L-Quotienten bei den LTS (Vgl. *Tabelle 13: CD 95/CD 95-L-Quotient*, S.56). Aufgrund der mehrfachen Division durch Null entstanden hier vier zensierte Werte, weshalb keine validen Aussagen zur statistischen Signifikanz getroffen werden konnten.

Tabelle 13: CD 95/CD 95-L-Quotient

LTS		STS	
Patient	CD 95/CD 95L-Quotient	Kontrolle	CD 95/CD 95L-Quotient
1	0,46	K1	0,02
2	-	K2	-
3	0,25	K3	0,17
4	-	K4	0,14
5	0,05	K5	0,01
6	3,85	K6	0,17
7	0,23	K7	4,00
8	0,45	K8	0,00
9	0,08	K9	0,25
10	-	K10	0,22
11	0,20	K11	0,50
12	0,47	K12	0,08
13	2,33	K13	0,05
14	2,00	K14	0,36
Mittelwerte	0,46		0,10

### 3.12 HLA Class II

In der Auswertung zeigte sich eine Braunfärbung der Oberflächenmembran. Als Positivkontrolle ließen wir Gewebe von humanem Lymphknoten mitlaufen. Der Testschnitt war positiv. Bei der Auswertung nach der Methode der ten high-power fields wurden nur Lymphozyten berücksichtigt.

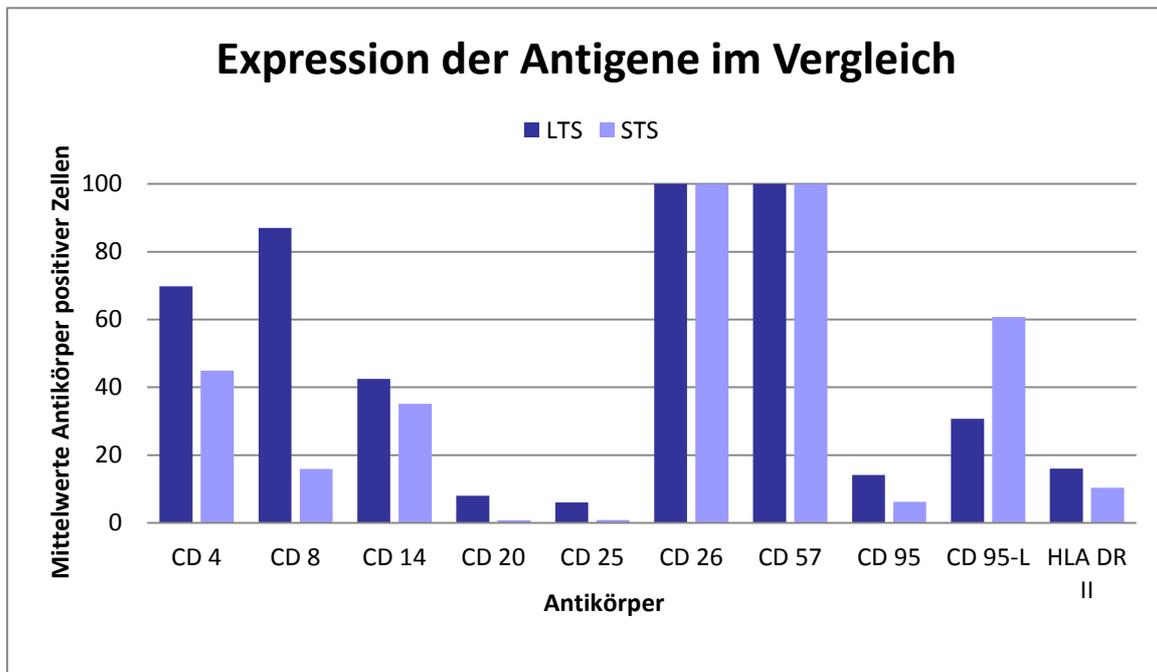
*Tabelle 14: Ergebnisse für HLA DR II*

LTS		STS	
Patient	Summe positiver Zellen der HPF	Kontrolle	Summe positiver Zellen der HPF
1	21	K1	0
2	0	K2	0
3	87	K3	0
4	17	K4	17
5	1	K5	30
6	1	K6	1
7	23	K7	1
8	5	K8	0
9	9	K9	1
10	3	K10	16
11	10	K11	4
12	3	K12	24
13	41	K13	44
14	3	K14	7
Mittelwerte	16		10,36

Die Mittelwerte HLA DR II positiver Zellen lagen für LTS bei 16 und bei den STS bei 10,36. Mit einem p-Wert von 0,3314 ergab sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

### 3.13 Expression der Antigene im Vergleich

In *Abbildung 15* ist die Expression der Lymphozytenantigene in Form eines Säulendiagramms dargestellt.



*Abbildung 15: Expression der Antigene im Vergleich*

Für CD 8, CD 20, CD 25 und CD 95 ließen sich statistisch signifikante Ergebnisse nachweisen, wobei die Ergebnisse für CD 8 und CD 25 hoch signifikant waren. Ergänzend wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test sowohl bezogen auf die jeweiligen Mittelwerte, als auch auf die Standardabweichungen untersucht. Wir erhielten hierfür gleiche inhaltliche Ergebnisse bezüglich der Signifikanz (*Vgl. Tabelle 15: Ergebnisse des U-Test nach Wilcoxon, S. 59*).

Tabelle 15: Ergebnisse des U-Test nach Wilcoxon

Antikörper	p-Werte U-Test	
	M	STD
CD 4	0,1974	0,2056
CD 8	0,0015	0,0018
CD 14	0,8114	0,5783
CD 20	0,0303	0,0529
CD 25	0,0007	0,0015
CD 95	0,0279	0,0115
CD 95-L	0,5180	0,2899
HLA-DR II	0,3314	0,6565

Diese Ergebnisse sollen anhand der folgenden Boxplots graphisch verdeutlicht werden. Zur besseren Übersicht ist die Legende exemplarisch in *Abbildung 16* aufgeführt und gilt für alle folgenden Boxplots.

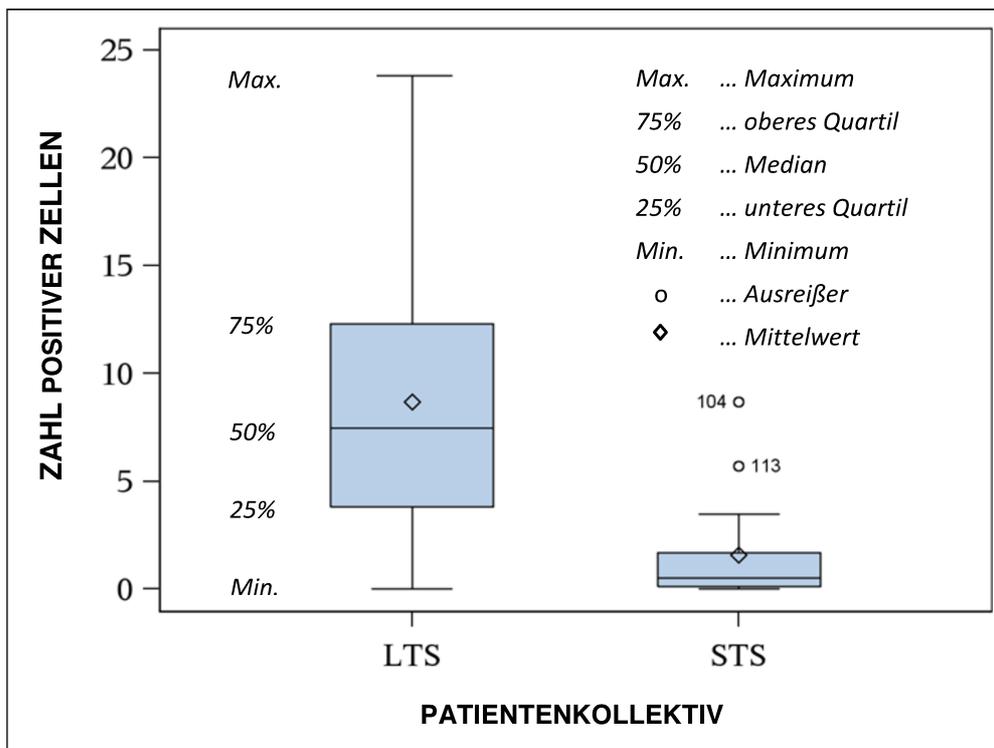


Abbildung 16: Legende Boxplots

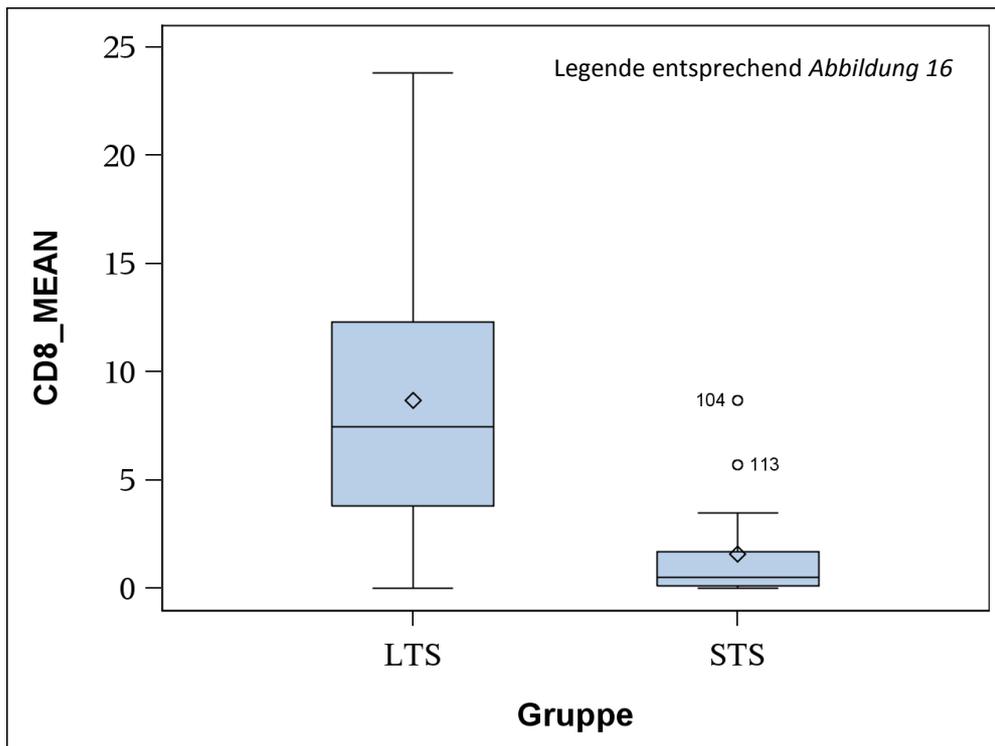


Abbildung 17: Boxplot CD 8

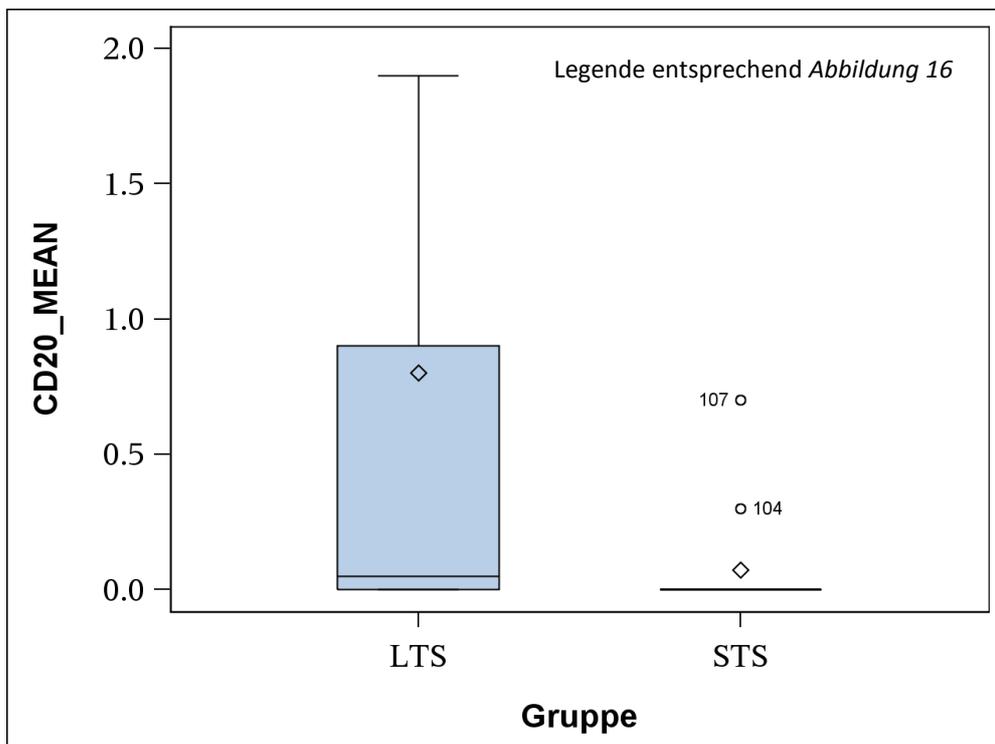


Abbildung 18: Boxplot CD 20

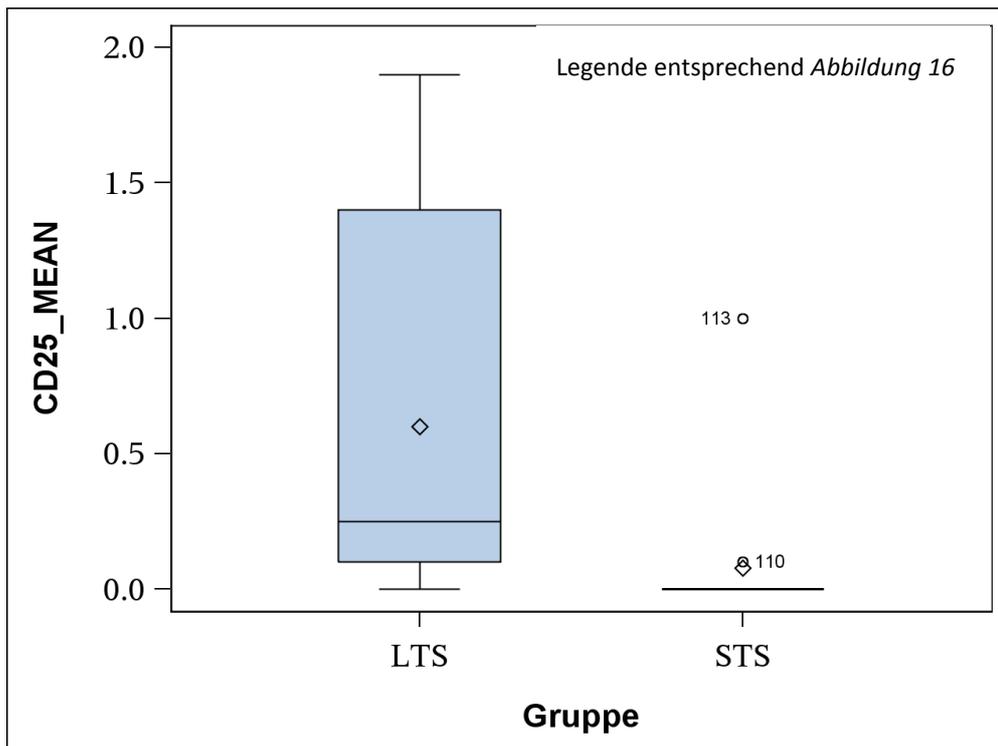


Abbildung 19: Boxplot CD 25

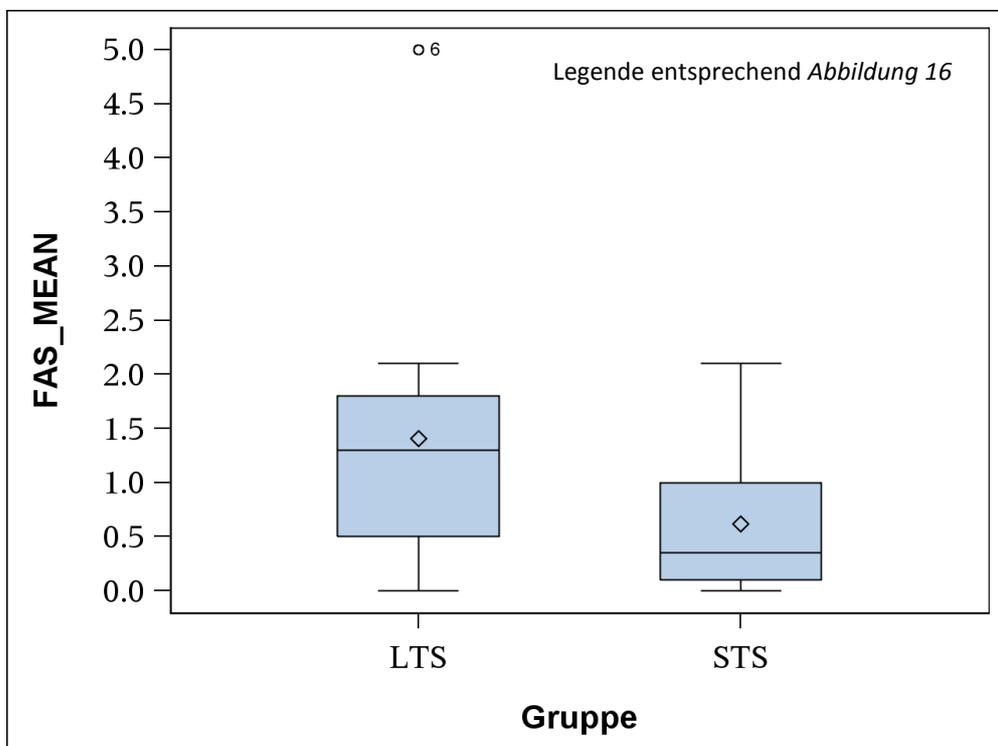


Abbildung 20: Boxplot CD 95/FAS

## 4 Diskussion

### 4.1 Die etablierten Prognosemarker IDH1 R132H und MGMT

#### 4.1.1 IDH 1 R132H

Die Bestimmung des Mutationsstatus des IDH1 R132H-Gens diente in dieser Arbeit als Beleg dafür, dass es sich bei allen Gewebeproben um primäre Glioblastome handelt. Der Nachweis des negativen IDH1 R132H-Mutationsstatus bei allen untersuchten Patienten zeigte, dass zum Zeitpunkt der Diagnose alle Träger eines primären Glioblastoms waren.

Die Untersuchung auf einen kombinierten Verlust der Allele 1p/19q, wie sie nach neuer WHO-Klassifikation von 2016 zur histopathologischen Klassifizierung von Hirntumoren verlangt wird, erfolgte nicht.

Die Mutation des IDH1-R132H-Gens wird in der Literatur mit einem längeren Überleben assoziiert und ist daher bereits als sicherer Prognosemarker etabliert [2, 5, 12, 29, 37, 45, 88, 93]. Patienten mit negativem IDH1 R132H-Mutationsstatus haben folglich eine schlechte Prognose [12]. Trotz negativem IDH1 R132H-Mutationsstatus überlebten unsere LTS über 30 Monate nach Diagnosestellung. Eine Mutation des IDH1 R132H-Gens kann also kein Grund für ein Langzeitüberleben der untersuchten Patienten mit primärem Glioblastom sein. Das längste dokumentierte Überleben unserer Studie betrug 107 Monate (Daten nicht zensiert) nach initialer Diagnosestellung. Dieser Patient war bei Diagnosestellung 31 Jahre alt. Sicher ist in diesem Falle auch das junge Erkrankungsalter als Grund für das lange Überleben zu diskutieren. *Barbus et al* zufolge sind LTS bei Diagnosestellung meist jünger als 50 Jahre und weisen eine IDH1- oder IDH2-Mutation auf [5]. Dies steht im Widerspruch zu unseren Ergebnissen. Alle untersuchten LTS trugen den IDH1-Wildtyp und hätten oben aufgeführten Arbeiten zufolge eine sehr geringe Überlebenszeit nach Diagnosestellung aufweisen müssen. Das mittlere Erkrankungsalter unserer Erhebung lag bei 51,4 Jahren.

Der IDH-Mutationsstatus ist inzwischen festes Kriterium zur neuropathologischen Klassifikation der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren, zu denen entsprechend neuer WHO-Klassifikation von 2016 auch das Glioblastom gehört [55].

Trotz des unbestritten hohen diagnostischen und prognostischen Stellenwerts der Mutation IDH 1 R132H für das Glioblastom konnte unsere Arbeit zeigen, dass deren Bestimmung nicht als alleiniger Prognosemarker herangezogen werden sollte. Eher ist die Entwicklung

eines ganzen Biomarkerpanels zwingend von Nöten, um zuverlässige Aussagen zur Prognose treffen und Therapiestrategien entwickeln zu können.

### 4.1.2 MGMT

In dieser Arbeit wurde auch die MGMT-Promotor-Methylierung untersucht, um deutlich zu zeigen, dass sich die Gruppen der LTS und STS nicht in Bezug auf diesen wesentlichen, bekannten prognostischen Faktor unterscheiden. Die vorliegende Arbeit zeigt damit weitere Parameter in der fortwährenden Diskussion um die Etablierung valider Biomarker für das Glioblastom auf.

54,5% der Langzeitüberlebenden waren methyliert, 45,5% unmethyliert. Von den STS waren 55,5% methyliert, 44,5% unmethyliert. Die Cox-Regressionsanalyse (Daten nicht ausgewiesen) zeigte, im Gegensatz zum aktuellen wissenschaftlichen Konsens, keine signifikante Korrelation zwischen methyliertem MGMT-Promotor und der Überlebensdauer. Einige Proben konnten leider nicht ausgewertet werden und wurden somit zensiert, sodass diese Analyse nicht valide ist. DNA in ausreichender Menge und Qualität zu finden wurde aufgrund des Alters mancher archivierter Paraffinschnitte schwierig. Wir vermuten hierin die Ursache, dass 8 von insgesamt 28 Proben(28,6%) auch nach Wiederholung der Versuchsreihe nicht ausgewertet werden konnten. Zu einer Verfälschung der Ergebnisse kann es bei der Bisulfidbehandlung (*Vgl. 2.8 MGMT-Promotormethylierung*) gekommen sein. Durch diese Behandlung erfolgte bei nicht-methylierter DNA eine Konversion des unmethylierten Cytosins zu Uracil. Blieb diese Konversion aus, so handelte es sich um methyliertes Cytosin und damit methylierte DNA. Bei stattgehabten Fehlern im Ablauf konnte eine Konversion ebenfalls ausbleiben, wodurch falsch positive Ergebnisse hätten entstehen können.

In der Fachliteratur gilt eine MGMT-Promotor-Methylierung mittlerweile als etablierter Prognosemarker [1, 5, 45, 48, 58, 83, 84, 88]. Unser Ergebnis ist insofern interessant, als dass wir keine Korrelation zwischen methyliertem MGMT-Promotor und Langzeitüberleben nachweisen konnten.

Auch in der bislang größten bekannten Studie zu prognostischen Faktoren bei Langzeitüberlebenden mit Glioblastom von *Krex et al* konnte bei nur 74% eine MGMT-Promotor-Methylierung nachgewiesen werden [48]. Alle untersuchten Patienten zeigten eine Überlebensdauer von über 36 Monaten nach Diagnosestellung. Folglich ist auch ohne methylierten MGMT-Promotor Langzeitüberleben möglich [48]. Mit unseren Ergebnissen konform geht auch eine Studie von *Sonoda et al* [83]. Hier wurden Patienten beschrieben, die trotz eines unmethylierten MGMT-Promotors deutlich länger überlebten als solche, deren MGMT-Promotor methyliert war.

Die Hypothese von *Barbus et al.*, dass unter 50-jährige Patienten häufiger einen methylierten MGMT-Promotor haben als über 50-jährige Patienten [5], können wir so nicht bestätigen. Entsprechend unserer Ergebnisse haben 50% der unter 50-jährigen Patienten einen methylierten und 50% einen unmethylierten MGMT-Promotorstatus und unterscheiden sich diesbezüglich nicht. Von insgesamt 20 über 50-jährigen Patienten konnten 40% nicht ausgewertet werden, 35% hatten einen methylierten MGMT-Promotor, 25% einen unmethylierten MGMT-Promotor.

*Tuonen et al.* erkannten, dass eine Methylierung des MGMT-Promotors häufig mit einer IDH1-Mutation assoziiert sei [88]. Diesen direkten Zusammenhang konnten wir in unseren Untersuchungen ebenfalls nicht finden. Alle untersuchten Tumorproben waren IDH1 R132H negativ.

Eine Mutation der IDH1-Gens und die Methylierung des MGMT- Promotors sind also, wie gezeigt werden konnte, nicht die entscheidenden Prädiktoren für das Langzeitüberleben der hier untersuchten Patienten. Die gefundenen Ergebnisse für die immunologischen Parameter unterliegen somit in dieser Hinsicht keinem systematischen Fehler.

## 4.2 CD 4 und CD 8

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine höhere Zahl CD 4-positiver T-Lymphozyten im Tumorgewebe der LTS als in dem der STS. Diese Beobachtung stellte sich allerdings nicht als statistisch signifikant heraus. Bei Patient 4 und dessen Kontrolle 4 zeigte sich interessanterweise ein deutlich umgekehrtes Verhältnis. Das Ergebnis wurde insbesondere auf mögliche Verwechslungen überprüft, welche ausgeschlossen werden konnten. In einer Studie von *Ali et al.* konnte CD 4 auch auf aktivierten Makrophagen und Mikroglia nachgewiesen werden [3]. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Zellen in unserer Untersuchung als T-Lymphozyten verkannt wurden und somit als falsch-positive Zellen Berücksichtigung fanden.

Bei an AIDS erkrankten Patienten werden durch die Anzahl der im peripheren Blut vorhandenen CD 4-positiven T-Lymphozyten das Ausmaß der Immundefizienz und zugleich auch der Erfolg der Pharmakotherapie gemessen. Eine solche Anwendung ist auch für Glioblastompatienten denkbar. Weiterführende Studien sollten neben der Zahl CD 4-positiver T-Lymphozyten im vitalen Tumor auch die CD 4-T-Zellpopulation im peripheren Blut bei LTS und STS untersuchen.

Für die Zahl CD 8-positiver T-Lymphozyten ließ sich trotz des geringen Stichprobenumfangs ein hoch signifikanter Unterschied zwischen LTS und STS zeigen. Bei den LTS wurden fünfmal mehr CD 8-positive Lymphozyten nachgewiesen als bei den

STS. Dieses Ergebnis spiegelt den gegenwärtigen Stand der Literatur wieder. Hier wurden bereits Zusammenhänge zwischen einer hohen CD 8-Expression und längerem Überleben beschrieben. So konnten *Yang et al* zeigen, dass das Ausmaß der CD 8-Expression direkt mit dem Langzeitüberleben der Glioblastompatienten korrelierte [95]. Da CD 8 ein spezifischer Marker für zytotoxische T-Zellen ist [19, 94], liegt der Schluss nahe, dass eine hohe Zahl zytotoxischer T-Zellen das Outcome der Glioblastompatienten verbessern könnte. Während bei unseren Untersuchungen ausschließlich CD 8-positive T-Zellen im Tumorporenchym Berücksichtigung fanden, wurden bei *Yang et al* zusätzlich CD 8-positive T-Lymphozyten des perivaskulären Raums berücksichtigt [94]. Trotz geringem Stichprobenumfang und Ausschluss CD 8-positiver T-Lymphozyten des perivaskulären Raumes konnten wir einen deutlichen Unterschied der Antigenexpression zwischen LTS und STS nachweisen.

*Walker et al* konnten in einer Studie von 2006 zeigen, dass ein großer Teil der CD 4- und CD 8-positiven, tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten in menschlichem Glioblastomgewebe der Apoptose zugeführt wird und somit nicht mehr zur Tumorbekämpfung zur Verfügung steht [90]. Unter diesen unterlagen insbesondere die FAS-L exprimierenden T-Lymphozyten der Apoptose. Hierzu verweisen wir auf Punkt 4.8 *CD 95 und CD 95-L*. Dennoch hatten Patienten mit vielen Lymphozyteninfiltraten ein deutlich längeres Überleben als entsprechende Kontrollgruppen [90]. Zu diesem Ergebnis kamen auch *Dewey et al*, die Zeichen einer chronischen Inflammation mit ausgeprägten T-Zell- und Makrophagen-/Mikrogliafiltrationen im Tumorgewebe von LTS beschrieben [23]. Der Vergleich der Antigene untereinander zeigt, dass sich in beiden Patientengruppen (LTS und STS) deutlich weniger CD 4- als CD 8-positive T-Lymphozyten nachweisen ließen. Es stellt sich erstens die Frage, ob also CD 4-positive T-Lymphozyten vermehrt der Apoptose zugeführt werden und wenn ja, warum. Da die Gesamtzahl der CD 4- und CD 8-positiven T-Lymphozyten bei den LTS deutlich höher ist als bei den STS, stellt sich zweitens die Frage, ob aus einem bislang nicht bekannten Grund die Glioblastomzellen der LTS insgesamt weniger T-Lymphozyten in die Apoptose überführen als die Glioblastomzellen der STS. Ob ein suffizienteres Immunsystem oder aber eine insuffiziente Tumorzelle hierfür Verantwortung trägt, ist nicht hinreichend geklärt. Das Gliompatienten generell ein Defizit der T-Zell-Immunaktivität haben müssen, konnte in Versuchen mit in-vitro-Glioblastomkulturen gezeigt werden, die die T-Lymphozytenantwort hemmten [97]. Neben der Möglichkeit, dass die zur Verfügung stehenden CD 4- und CD 8-positiven T-Lymphozyten durch Glioblastomzellen der Apoptose zugeführt wurden und daher nicht mehr zur Immunabwehr und Tumorbekämpfung zur Verfügung standen, muss auch erwogen werden, dass bei der Gruppe der STS von vorherein weniger CD 4- und CD 8-positive T-Lymphozyten zur Verfügung standen als bei den LTS. Ein weiterer, wichtiger Aspekt, den es zu berücksichtigen gilt ist, dass gliominfiltrierende Lymphozyten in der Regel inaktiv sind [90]. Die Frage ist, wie dann diese gravierenden Unterschiede beider

Gruppen zustande kommen. Sind die infiltrierenden Lymphozyten doch nicht inaktiv, oder nur bei den STS inaktiv? Wenn dem so sei, wo liegt der Grund hierfür? Diesen und weiteren Fragen sollten weitere Studien und Experimente nachgehen. Ob es sich bei den von uns untersuchten CD 4- und CD 8-positiven Lymphozyten um aktivierte oder inaktive Zellen handelt und welche Funktion ihnen genau zukommt, entzieht sich den Möglichkeiten unserer Methodik.

Aufgrund der Diskrepanzen betrachteten wir zusätzlich den CD 4/CD 8-Quotienten aller untersuchten Patienten. *Zou et al* beschrieben 1999 bereits das Missverhältnis zwischen CD 8- und CD 4-positiven Zellen bei Gliompatienten und verglichen es mit den immunologischen Abnormitäten von AIDS-Patienten, bei denen ebenfalls eine geringe Zahl an CD 4-positiven Zellen vorliegt, die Zahl an CD 8-positiven Zellen dagegen nicht reduziert ist [97]. Die Untersuchung des CD 4/CD 8-Quotienten im peripheren Blut oder Material der bronchoalveolären Lavage ist bereits fester Bestandteil der Diagnostik von immunologisch bedingten Erkrankungen. So ist der CD 4/CD 8-Quotient bei Patienten mit Sarkoidose, Kollagenosen und Morbus Crohn deutlich erhöht, während er bei Exogen Allergischer Alveolitis und HIV-Infektion erniedrigt ist. Wie erwähnt wird dieser Wert für oben genannte Erkrankungen bislang nur im Vollblut, nicht im erkrankten Gewebe untersucht.

In der von uns untersuchten Gruppe der STS war der CD 4/CD 8-Quotient im Mittel (*Vgl. Tabelle 7: CD 4/CD 8-Quotient, S. 45*) deutlich höher als bei den LTS. Das scheint widersprüchlich, da wir bei den LTS im Mittel mehr CD 4-positive Zellen nachweisen konnten als bei den STS und somit für die LTS auch ein höherer CD 4/CD 8-Quotient zu erwarten gewesen wäre. Dieses Ergebnis kommt durch vier zensierte Werte zustande, welche durch Division mit Null entstanden. Aus diesem Grunde sind die Mittelwerte des errechneten CD 4/CD 8-Quotienten nicht verwertbar. Wenn also bei den STS ein niedrigerer CD 4/CD 8-Quotient zu erwarten gewesen wäre als bei den LTS, müsste man den STS eine Immundefizienz unterstellen und insbesondere eine relative Immundefizienz als Mitursache für die schlechte Überlebensprognose von Glioblastompatienten diskutieren.

Künftige Studien sollten diese Fragestellung auch prospektiv eingehender untersuchen, denn bislang ist die Studienlage zu Untersuchungen von CD 4- und CD 8-positiven T-Zellen bei Glioblastomen gering.

### 4.3 CD 14

Für die Expression von CD 14 ließ sich in der vorliegenden Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen LTS und STS nachweisen, auch wenn Mittelwert und die

überwiegende Zahl der Einzelproben der LTS eine höhere Zahl CD 14-positiver Zellen als bei den STS zeigten. Zwischen Zellen der Mikroglia und Lymphozyten konnte nicht sicher unterschieden werden.

CD 14 ist in der Immunhistochemie als Marker für Monozyten, Makrophagen und Langerhanszellen etabliert [51, 69], welche die Phagozytose von Pathogenen steuern [69] und somit eine Rolle bei der Tumorbekämpfung spielen sollen [71]. An Glioblastomen wurden CD 14-positive Immunzellen und deren Bedeutung bislang nicht untersucht. *Alvarado et al* untersuchten jedoch den Einfluss der TLR-4-Expression auf Glioblastomstammzellen und konnten zeigen, dass sogenannte sich selbst regenerierende Krebsstammzellen eine verminderte TLR-4- Expression aufweisen und so die feindliche Immunantwort des Wirtes zu unterwandern vermögen [4]. CD 14 und TLR-4 induzieren nach Bindung von LPS den TLR-4-Signalweg, der in der Folge zur Aktivierung und Reifung von T-Zellen führt [40].

*Lacroix et al* konnten CD 14 auch auf Mikrogliazellen nachweisen [50]. Mikrogliazellen sind die Immuneffektorzellen des ZNS und haben sowohl antigenpräsentierende und immunmodulierende als auch Phagozytosefunktion. Welche Rolle CD 14 bei der Erkennung von Glioblastomzellen spielt und wie es zur Bekämpfung dieser beiträgt, ist unklar.

Zukünftige Studien sollten erstens untersuchen, ob die Oberfläche von Glioblastomzellen von CD 14-positiven, immunkompetenten Zellen erkannt wird und welche nachgeschalteten Signalwege hierdurch ausgelöst werden. Denkbar ist, dass diese Signalwege durch die Glioblastomzellen wesentlich beeinflusst werden. Zweitens sollte die TLR-4-Expression von Glioblastomzellen bei LTS und STS verglichen werden, um hieraus weitere prognostische und bestenfalls auch therapeutische Konsequenzen ableiten zu können.

#### 4.4 CD 20

Das Antigen CD 20 gilt als einer der besten B-Zell-Marker [52] und spielt eine große Rolle bei der Immunphänotypisierung maligner Lymphome und Leukämien. Die prognostische Relevanz der CD 20-Expression ist für B-Zell-Neoplasien jedoch gering [52]. In Bezug auf die Prognose des Glioblastoms wurde CD 20 noch nicht betrachtet. Es gibt zwar eine Studie, in der dieses Antigen bereits beim Glioblastom untersucht wurde, jedoch wurde in dieser keine einzige CD 20-positive Zelle im Tumorgewebe gefunden [94]. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass beim Glioblastom eine positive Korrelation zwischen Langzeitüberleben und Infiltraten CD 20-positiver B-Lymphozyten besteht, denn die

Anzahl CD 20-positiver B-Zellen lag bei den LTS im Mittelwert bei 8 (bei einer Spannweite von 0 bis 41 Zellen), bei den STS bei 0,71 Zellen. Mit einem p-Wert von 0,0303 ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Es konnten nur bei 2 von 14 STS überhaupt Anfärbungen nachgewiesen werden. Bei den LTS war dies bei der Hälfte der Patienten der Fall.

*Yang et al* untersuchten eine Stichprobe von 91 Patienten, von denen 63 an einem Glioblastom und 28 an einem pilozytischen Astrozytom litten, auf verschiedene Antigene [94]. In Bezug auf die Expression CD 20-positiver Lymphozyteninfiltrate konnten sie in beiden Gruppen keine CD 20-positiven Lymphozyten im Tumorgewebe finden. Lediglich in 4 Fällen von pilozytischem Astrozytom fanden sich vereinzelt CD 20-positive Lymphozyteninfiltrate im perivaskulären Raum. Die Überlebensdauer der Patienten nach Diagnosestellung wurde in der Studie jedoch nicht berücksichtigt. Wenn unsere Hypothese stimmt und das Ausmaß CD 20-positiver Lymphozyten positiv mit dem Überleben korreliert, so ist anzunehmen, dass sich unter den von *Yang et al* [94] untersuchten Patienten kein einziger Langzeitüberlebender entsprechend unseren Kriterien befand. Eine Überlebensanalyse wäre daher durchaus interessant gewesen, um unsere Ergebnisse besser mit denen von *Yang et al* [94] vergleichen und damit in den wissenschaftlichen Kontext einordnen zu können.

In CD 20-positiven B-Lymphozyten kann mit Hilfe eines entsprechenden Antikörpers die Kernfragmentierung und damit die Apoptose induziert werden. Dieses Prinzip wird bereits bei der Behandlung von malignen Lymphomen und auch bei Rheumatoider Arthritis und Systemischem Lupus Erythematoses eingesetzt [69]. Hätte sich in dieser Arbeit bei STS eine deutlich stärkere Expression von CD 20-positiven B-Lymphozyten als bei LTS gezeigt, so hätte dies Rituximab auch als Therapieoption bei Glioblastom ins Gespräch gebracht, da man den CD 20-positiven B-Lymphozyten-Infiltraten einen nachteiligen Effekt auf das Überleben der Patienten hätte unterstellen müssen. Doch verhält es sich umgekehrt. CD 20-positive B-Lymphozyten wurden in unserer Studie im Verhältnis mehr bei LTS als bei STS nachgewiesen. Im Falle des Glioblastoms wäre eine Rituximabtherapie unseren Ergebnissen zufolge nicht zielführend, sondern sogar kontraproduktiv, da die durch Rituximab in die Apoptose beförderten CD 20-positiven B-Lymphozyten einen prognostisch günstigen Effekt auf Patienten mit Glioblastom zu haben scheinen.

Außerdem interessant ist, dass B-Lymphozyten vor allem durch CD 4-positiv T-Helferzellen aktiviert werden. Da wir, wenn auch nicht statistisch signifikant, bei den LTS eine höhere Zahl CD 4-positiver T-Lymphozyten nachweisen konnten als bei den STS, bestätigte sich unsere Erwartung, dass auch die CD 20-positiven Lymphozyten bei LTS im Vergleich zu den STS erhöht sein könnten. Es entzieht sich unserer Methodik ob es sich

bei den nachgewiesenen CD 20-positiven Lymphozyten um aktivierte B-Lymphozyten handelt.

Auf dieser Arbeit aufbauende Studien sollten die CD 20-Expression im Tumorgewebe an einem größeren Patientenkollektiv weiter untersuchen. Wir können nun nicht nur den T-Lymphozyten, sondern auch den B-Lymphozyten einen prognostisch günstigen Effekt bei Patienten mit Glioblastom unterstellen. Dies deutet insgesamt darauf hin, dass LTS eine stärkere Immunantwort gegen das Glioblastom generieren können oder sogar von vornherein ein suffizienteres Immunmilieu besitzen als die STS. Umgekehrt lässt sich aus unseren Ergebnissen folgern, dass STS aus bislang nicht abschließend geklärtem Grund an einer relativen Immundefizienz leiden. Ob das Glioblastom allein diese Immundefizienz induziert oder bereits eine Immundefizienz vorliegen muss, damit sich ein Glioblastom entwickeln kann, ist weiterhin ungeklärt. Ein Argument mehr, den Ansatz der Immuntherapie bei Glioblastom weiter zu verfolgen.

## 4.5 CD 25

Für das Antigen CD 25 konnten wir ebenfalls eine positive Korrelation zwischen CD 25-positiven Lymphozyten und Langzeitüberleben nachweisen. Dieser Unterschied war bei Mittelwerten von 6 positiven Zellen für LTS und 0,79 positiven Zellen für STS, bei einem p-Wert von 0,0007 sogar hochsignifikant. Dazu ist anzumerken, dass nur 2 von 14 untersuchten STS-Schnitten im Gegensatz zu 11 von 14 LTS-Schnitten eine Anfärbung aufwiesen. Der Testschnitt war positiv. Das Ergebnis wurde überprüft.

CD 25 wird von unreifen B-Zellen, Thymozyten, NK-Zellen und Makrophagen sowie von regulatorischen T-Zellen, jedoch auch auf aktivierten T- und B-Zellen exprimiert [16, 53]. In unserer Untersuchung konnte leider nicht zwischen CD 25-positiven B-Lymphozyten und CD 25-positiven T-Lymphozyten sowie zwischen aktivierten und inaktiven Lymphozyten unterschieden und somit kein Verhältnis der Zusammensetzung ermittelt werden. Entsprechende Co-Anfärbungen zur weiteren Differenzierung wurden nicht durchgeführt.

Interessanterweise fand sich in unseren Untersuchungen bei den LTS eine relativ höhere Zahl CD 20-positiver B-Lymphozyten als bei den STS. CD 20 ist, wie bereits erwähnt, ein etablierter B-Zell-Marker [52]. Es existieren zwar auch CD 25-positive regulatorische T-Zellen, die zumeist auch gleichzeitig CD 4 tragen [61]. Allerdings waren die absoluten Zahlen CD 4-positiver Zellen in beiden Gruppen mehr als 10-fach höher als die der CD 25-positiven Zellen, sodass das Ergebnis keinen Schluss auf die vorliegende Lymphozytenpopulation CD 25-positiver Zellen erlaubt. Das gleiche gilt für CD 25

exprimierende, CD 8-positive T-Zellen mit Gedächtnisfunktion, um die es sich bei den angefärbten Lymphozyten ebenfalls handeln könnte. Das würde unsere Hypothese, dass das Vorhandensein vieler CD 8-positiver Lymphozyten mit längerem Überleben korreliert, stützen. Auch hier konnten wir jedoch in absoluten Zahlen circa 15-mal mehr CD 8-positive Zellen als CD 25-positive Zellen nachweisen.

Da die absoluten Zahlen CD 20-positiver Zellen und CD 25-positiver Zellen annähernd einander entsprechen, müssen die von uns nachgewiesenen CD 25-positiven Lymphozyten in erster Linie B-Lymphozyten sein. Dieser Schluss ist insofern bedeutend, als dass B-Lymphozyten eine größere Bedeutung bei der Tumorbekämpfung zugeschrieben werden muss als bisher angenommen. Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei den von uns nachgewiesenen CD 25-positiven Zellen in erster Linie um B-Lymphozyten handelt, lässt dies weiter den Schluss zu, dass regulatorische T-Zellen bei LTS mit Glioblastom nicht gesteigert in den untersuchten Tumoren vorlagen. Die ausbleibende Hemmung der autoreaktiven T-Zellen durch das Fehlen regulatorischer T-Zellen könnte den Überlebensvorteil der LTS miterklären.

## 4.6 CD 26

Für den Antikörper gegen das Protein Dipeptidylpeptidase-IV konnten wir bei allen untersuchten Proben eine starke Positivität nachweisen. Wie bereits oben aufgeführt, wird es auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen [10] und Makrophagen exprimiert [69]. *Sedo et al* konnten CD 26 jedoch auch auf Astrozytomen, Gliomen und Neuroblastomen nachweisen [79–81]. Eine Differenzierung zwischen Immunzellen und Tumorzellen gelang uns aufgrund der starken immunhistochemischen Reaktion leider nicht. Wir überprüften unser Ergebnis, indem wir die Schnitte in jeweils zwei anderen Konzentrationsverhältnissen mit CD 26 erneut immunhistochemisch anfärbten. Auch hier zeigte sich eine deutliche Positivität des gesamten Gewebes. Denkbar ist, dass aufgrund der zahlreichen apoptotischen Vorgänge, sowohl durch Tumor, als auch durch gesundes Gewebe induziert, so viele CD 26-positive Zellen nachweisbar waren. In Studien zur Multiplen Sklerose und der Rheumatoidarthritis konnte gezeigt werden, dass eine hohe Zahl CD 26-positiver, immunkompetenter Zellen in entzündetem Gewebe häufig mit Autoimmunerkrankungen einher ging, während wenige CD 26-positive, immunkompetente Zellen für ein Defizit des Immunsystems sprachen [32, 63]. Schlussfolgernd läge bei allen Patienten unserer Arbeit eine gesteigerte Immunabwehr, quasi eine Hyperimmunität vor, auch bei Patienten, die die Kriterien eines STS erfüllen. Das würde unsere Hauptthese, dass das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Tumorbekämpfung und somit beim Langzeitüberleben spielt, entkräften. Die Pathophysiologie des Glioblastoms ist allerdings sehr komplex. Darum lässt sich aus unseren Ergebnissen vielmehr folgern, dass

CD 26 als Biomarker zur Prognoseabschätzung des Glioblastoms ungeeignet zu sein scheint. Die scheinbar geringe Spezifität des Markers CD 26 mit Anfärbung vieler verschiedener Zellen ist abschließend am ehesten für die deutliche Positivität der Tumorgewebeschnitte in dieser Arbeit verantwortlich.

*Sedo et al* beschrieben einen möglichen Zusammenhang zwischen der CD 26-Aktivität und der Differenzierung von Gliomen, da in deren Arbeit hoch differenzierte Gliome eine stärkere CD 26-Aktivität zeigten als proliferierende Gliomzellen [80]. Wir überprüften das Ausmaß der Differenzierung des Tumorgewebes in Relation zur CD 26-Aktivität nicht, da es nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Jedoch erscheint es sinnvoll, an dieses Ergebnis in einer weiteren Studie anzuknüpfen, denn bezugnehmend auf *Sedo et al* [80] bedeutete unser Ergebnis, vorausgesetzt eine gesteigerte CD 26-Expression ist mit einer gesteigerten CD 26-Aktivität gleichzusetzen, dass die LTS gleichermaßen wie die STS an einem hoch differenzierten Gliom litten. Gut differenzierte Tumore haben allerdings in der Regel eine gute Prognose, sodass sich die Studie von *Sedo et al* [80] unseren Ergebnissen zufolge schlecht auf das Glioblastom anwenden lässt. Alle untersuchten Präparate waren IDH1-Wildtyp-Glioblastome [55] und damit primäre Glioblastome mit schlechter Prognose.

## 4.7 CD 57

Auch für das Antigen CD 57 erbrachte unsere Auswertung eine so deutliche Anfärbung aller Tumorschnitte, dass keine quantitative Bestimmung CD 57-positiver Lymphozyten erfolgen konnte. Nach erneutem Titrieren des Antikörpers und Wiederholung der immunhistochemischen Färbung erhielten wir zwei weitere Male das gleiche Ergebnis, sodass CD 57 wie auch CD 26 als Biomarker für die Prognoseabschätzung des Glioblastoms ungeeignet zu sein scheinen. Eine sichere Differenzierung zwischen einzelnen Populationen wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und Schwannzellen war nicht möglich. Es ist anzunehmen, dass wir all diese Zellen bei all unseren Präparaten immunhistochemisch erfasst haben. CD 57 wird von germinal-center T-Helferzellen, einigen CD 8-positiven T-Zellen [52], B-Zellen und NK-Zellen exprimiert [69]. Den CD 57-positiven T-Zellen wird eine regulatorische Funktion zugesprochen [52]. In diesem Zusammenhang und unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse zu CD 25, kann nun angenommen werden, dass regulatorische T-Zellen doch eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie des Glioblastoms zu spielen scheinen. Eine Bedeutung CD 8/CD 57-positiver T-Lymphozyten als regulatorische T-Zellen ist anzunehmen. Im Gegensatz zu CD 8 und CD 25 fand sich jedoch für CD 57 keine positive Korrelation mit dem Überleben, da alle untersuchten Proben sowohl der LTS als auch der STS positiv waren. Da auch B-Lymphozyten CD 57 auf der Oberfläche exprimieren, sei hier abermals auf die potentielle Bedeutung der B-Lymphozyten hingewiesen. Weil die einzelnen

Subpopulationen der CD 57-positiven Zellen nicht voneinander abgegrenzt werden konnten, wissen wir abschließend nicht, ob der Großteil dieser Zellen aus B-Lymphozyten oder regulatorischen T-Zellen bestand. Aufgrund der deutlichen Positivität aller Tumorproben ist diese Fragestellung in Bezug auf die unterschiedlichen immunologischen Merkmale von LTS und STS ohnehin nicht zielführend.

CD 57 wird auch zur Differenzierung von Oligodendrogliomen herangezogen [54]. Die genaue Funktion von CD 57 und sein Vorkommen in Nervengewebe sind jedoch noch unzureichend untersucht. CD 57-positive T-Zellen konnten auch bei Patienten mit HIV-Infektion und anderen Erkrankungen mit einem CD 4/CD 8-Missverhältnis vermehrt nachgewiesen werden [52]. In unserer Arbeit zeigte sich ein solches Missverhältnis für die STS, nicht aber für die LTS, sodass keine Korrelation zwischen dem CD 4/CD 8-Missverhältnis und der CD 57-Expression der Lymphozyteninfiltrate nachgewiesen werden konnte.

## 4.8 CD 95 und CD 95-L

Das Glioblastom weist viele immunsupprimierende Eigenschaften auf. So ist unter anderem bekannt, dass das Glioblastom in tumorinfiltrierenden Lymphozyten Apoptose induzieren kann [90]. Die Apoptoserate der Lymphozyten scheint mit der Prognose der Patienten assoziiert zu sein, denn Patienten mit vielen Lymphozyteninfiltraten zeigten in einer Studie von *Walker et al* ein deutlich längeres Überleben als entsprechende Kontrollgruppen [90]. Bisher wurde jedoch angenommen, dass gliominfiltrierende Lymphozyten in der Regel inaktiv seien [90]. Dass Gliompatienten ein Defizit der T-Zell-Immunaktivität haben müssen, konnte auch in Versuchen mit in-vitro-Glioblastomkulturen gezeigt werden, die die T-Lymphozytenantwort hemmten [97]. Auch konnte gezeigt werden, dass Tumorgewebe von LTS Zeichen einer chronischen Inflammation zeigt. Tumorpräparate von LTS wiesen eine ausgeprägte T-Zell-, Makrophagen- und Mikrogliafiltration auf [23]. Die Beobachtung, dass Patienten mit stärker ausgeprägten Lymphozyteninfiltraten länger als andere Patienten überleben, legt die Vermutung nahe, dass die infiltrierenden Lymphozyten nicht, wie bislang vermutet, inaktiv sind.

Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikant höhere Expression von FAS auf Lymphozyten der LTS im Vergleich zu den STS. Eine gesteigerte FAS-Expression auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten scheint also einen prognostisch günstigen Effekt bei Glioblastompatienten zu haben. Die gesteigerte FAS-Expression auf Glioblastomzellen jedoch fördert das Überleben der Krebszellen [96] und hat damit einen negativen Einfluss auf das Patientenüberleben. Die Cox-Regressionsanalyse für FAS und die Überlebensdauer

(Daten nicht ausgewiesen) der Patienten zeigte zwar eine positive Korrelation, diese war jedoch mit einem p-Wert von 0,3 ohne statistische Signifikanz.

FAS-L wurde entsprechend unserer Ergebnisse auf T-Lymphozyten im Tumorgewebe der STS im Vergleich zu den LTS gesteigert exprimiert. Mit Verweis auf *Abbildung 15: Expression der Antigene im Vergleich, S.58*, ist CD 95-L das einzige Antigen, das bei STS im Vergleich zu den LTS gesteigert exprimiert wurde. Dieses Ergebnis war in der statistischen Analyse zwar nicht signifikant, ist jedoch ein Indiz dafür, dass eine gesteigerte Expression von FAS-L auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten ein Hinweis für eine schlechtere Prognose beim Glioblastom sein könnte. FAS-L wird überwiegend auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert [25], um feindliche Zellen erkennen und der Apoptose zuführen zu können. Gliomzellen exprimieren sowohl FAS, als auch FAS-L und sind somit in der Lage, als nicht-professionelle antigenpräsentierende Zelle zu fungieren und T-Lymphozyten anzulocken. Nach Bindung von FAS-L des T-Lymphozyten an FAS der Gliomzellen fehlt allerdings das kostimulatorische Signal, welches die T-Zelle vor der Apoptose schützen soll, sodass nicht die Gliomzelle, sondern der T-Lymphozyt der Apoptose zugeführt wird [44, 90]. FAS exprimierende Gliomzellen können also zur T-Zellapoptose führen [90]. T-Zellen, die FAS-L exprimieren, sind achtmal anfälliger für Apoptose als jene, die keinen FAS-L exprimieren [90].

Die gesteigerte Expression von FAS auf der T-Zelloberfläche erfolgt erst nach Aktivierung der T-Lymphozyten und induziert zugleich die Expression von FAS-L [90]. Nun haben wir aber gezeigt, dass bei den LTS weniger FAS-L-positive T-Lymphozyten, also weniger aktivierte T-Zellen nachweisbar waren, was in unserer Studie mit einem längeren Überleben einherging. Bisher nahm man an, dass aktivierte T-Lymphozyten für eine suffiziente Immunabwehr unentbehrlich sind. Wie können LTS mit verhältnismäßig wenig aktivierten T-Lymphozyten eine doch scheinbar suffiziente Immunantwort generieren? Dass diese besteht, haben wir bereits mithilfe anderer Antigene belegt. Denkbar ist, dass wir in unseren Präparaten nicht alle aktivierten T-Lymphozyten sahen, da die Expression bereits induziert, aber noch nicht vollendet war. Zudem ist anzunehmen, dass auch inaktive T-Lymphozyten eine Rolle bei der aktiven Immunabwehr spielen. Schließlich lassen unsere Ergebnisse die Vermutung zu, dass die T-Lymphozyten der LTS der durch die Glioblastomzelle induzierten Apoptose durch verminderte Expression von FAS-L entkommen können.

Auch entsprechend der Ausführungen von *Walker et al* [90] wäre bei den LTS auf tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten eine niedrigere FAS-L-Expression und eine höhere FAS-Expression als bei den STS zu erwarten gewesen. Damit gehen unsere Ergebnisse konform. Somit zeichnet sich ab, dass die Expression von FAS-L auf tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten maßgeblich zur Immundefizienz bei Glioblastompatienten beiträgt [90].

*Kleber et al* konnten zeigen, dass Gliomzellen die Expression von FAS-L in das umgebende Gewebe induzieren, sodass der Tumor Apoptose im gesunden Gewebe, auch den Lymphozyten induziert [44]. *Tuettenberg et al* zufolge könnte eine effektive Hemmung des CD 95/CD 95-L-Systems auch die Radio- und Chemosensitivität der Gliome steigern [87]. Es sind bereits Medikamente in der Entwicklung und klinischen Testung, die eine solche Inhibition herbeiführen sollen. *Tuettenberg et al* untersuchten in ihrer Studie von 2012 die Wirkung eines glykosylierten Fusionsproteins, bestehend aus der extrazellulären Domäne von CD 95 und der Fc-Domäne von IgG1 [87]. Die Applikation dieses Medikaments führte zur Hemmung der Interaktion zwischen CD 95 und CD 95-L und somit zur Hemmung aller nachgeschalteten Signalwege, welche an der Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptoseinduktion unter anderem in T-Lymphozyten beteiligt sind. Das Medikament wurde gut toleriert und zeigte nur wenig Nebenwirkungen [87], vor allem weil FAS in gesundem menschlichen Gewebe, abgesehen von Leber- und Fettgewebe, kaum nachweisbar ist [96].

Zur Verdeutlichung unserer Ergebnisse wurde zusätzlich der FAS/FAS-L-Quotient ermittelt. Der errechnete FAS/FAS-L-Quotient war bei den LTS im Durchschnitt geringfügig höher als bei den STS. Da diese Berechnung jedoch durch Division mit null einige nicht verwertbare, zensierte Informationen lieferte, ist die Prüfung der statistischen Signifikanz hier sicher nicht valide.

Bezugnehmend auf Abschnitt 1.8.7 *CD 95 und CD 95-L* muss nochmal betont werden, dass eine gesteigerte Expression von FAS auch auf Gliomzelllinien nachgewiesen wurde [96]. So hätten FAS-positive Gliomzellen fälschlicherweise als FAS-positive Lymphozyten gewertet werden können. Dieser Fehler hätte dann allerdings in ähnlichem Ausmaß auch bei der Auswertung der STS unterlaufen müssen. FAS wird außerdem auf der Oberfläche von gesunden Astrozyten [96], T- und B-Lymphozyten, hormonsensitiven Zellen und Zellen des Fettstoffwechsels exprimiert [96]. Auch wenn sorgfältig auf die Unterscheidung zwischen FAS-positiven Immunzellen und anderen FAS-positiven Zellen geachtet wurde, sind falsch positiv berücksichtigte Zellen nicht sicher ausgeschlossen. Zwischen FAS-positiven T- und B-Lymphozyten konnte nicht eindeutig unterschieden werden. Eine Co-Anfärbung erfolgte nicht.

Unsere Arbeit zeigt, dass eine hohe Expression von FAS auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten positiv und die hohe Expression von FAS-L auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten negativ mit dem Patientenüberleben korreliert sind. Die genauen pathophysiologischen Abläufe sind bislang nur in unbefriedigendem Ausmaß erforscht und müssen zwingend weiter verfolgt werden. Zukünftige Studien sollten, unterstützt von den vorliegenden Ergebnissen, zwingend die Rolle des FAS/FAS-L-Komplexes

tumorinfiltrierender Lymphozyten bei der körpereigenen Bekämpfung des Glioblastoms weiter untersuchen.

## 4.9 HLA DR II

Der Nachweis dieses Parameters sollte zeigen, ob Langzeitüberlebende mit Glioblastom von einer gesteigerten Expression von HLA DR II auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten profitieren. Unsere Untersuchungen ergaben eine im Mittelwert gering höhere Expression von HLA DR II bei LTS als bei STS. Dieses Ergebnis ist - möglicherweise dem geringen Stichprobenumfang geschuldet - statistisch nicht signifikant. Allerdings konnten wir bei 4 der 14 untersuchten STS keine einzige positive Zelle finden, bei den LTS nur bei 1 von 14 Patienten.

Eine erhöhte HLA DR II Expression konnte von *Poli et al* auch in Mikroglia nachgewiesen werden [71], was die immunkompetente Funktion der Mikroglia als potente antigenpräsentierende Zellen unterstreicht. *Poli et al* induzierten durch eine immunmodulatorische Therapie im Tiermodell eine erhöhte HLA DR II Expression der Mikroglia im Glioblastom, was zu einem längeren Überleben führte [71]. HLA DR II wird, wie bereits in Kapitel 1.9 *HLA DR Class II* aufgeführt, von zahlreichen Zellen exprimiert. Die Differenzierung zwischen Tumorzellen, Mikroglia und anderen Immuneffektorzellen gestaltete sich schwierig. Eine Co-Anfärbung erfolgte nicht.

In einer eingangs kurz erwähnten Studie von *Tran et al* wurde die HLA DR II-Expression der Mikroglia in Bezug auf den Tumorgrad untersucht [86]. Bei Glioblastomen war die HLA DR II-Aktivität bis um die Hälfte reduziert [86], andere Studien fanden eine Reduktion bis auf 30% [64]. Es geht hier jedoch nicht deutlich hervor, ob HLA DR II-exprimierende Gliom- oder Mikrogliazellen untersucht wurden. Dennoch scheint ein Zusammenhang zwischen der Expression von HLA DR II und der Malignität hirneigener Tumore zu bestehen. Einen solchen Zusammenhang kann man aus unseren Ergebnissen nicht ableiten, da wir die HLA DR II-Expression auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten untersuchten.

Im Vergleich mit der Expression CD 4-positiver Lymphozyten zeigte sich ein erkennbarer Zusammenhang. Eingangs vermuteten wir, dass die Expression von HLA DR II in ähnlichem Ausmaß gesteigert sein würde wie die von CD 4, da HLA DR II von CD 4-positiven T-Helfer-Zellen erkannt und aktiviert wird [52, 69]. Wir konnten eine gesteigerte Expression von CD 4-positiven Lymphozyten in LTS in unserer Arbeit nachweisen. Diese war jedoch - vermutlich auch dem geringen Stichprobenumfang geschuldet - ebenfalls nicht statistisch signifikant.

HLA DR II vermittelte Signalwege scheinen, wie oben aufgeführte Studien zeigen, eine beträchtliche Rolle bei der körpereigenen Hirntumorbekämpfung zu spielen. Dieser Ansatz sollte, anknüpfend an unsere Arbeit und das Tiermodell von *Poli et al.*, in weiteren experimentellen Studien weiter verfolgt werden.

## 4.10 Limitationen und methodische Einschränkungen

Doch hat diese Studie auch ihre Grenzen in der Methodik. So lieferten beide Kohorten sowohl viele kleine Gewebeschnitte mit wenig vitalem Tumor, als auch große Schnitte mit wenig vitalem Tumor, viel Einblutung und Nekrose. Immunhistochemisch anzufärbenden, vitalen Tumor zu finden gestaltete sich mitunter schwierig. Dass unsere Tumorproben zum Zeitpunkt der Untersuchung in einzelnen Fällen bereits 13 Jahre in Paraffin eingebettet lagerten, kam erschwerend hinzu. Patienten, bei deren Gewebeschnitt kein vitaler Tumor mehr gefunden werden konnten, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Wir versuchten die Patienten nach dem Jahr der Erstdiagnose zu matchen, jedoch wurden hier Diskrepanzen bis zu 10 Jahren zugunsten eines höheren Stichprobenumfangs billigend in Kauf genommen. Auch wenn alle Kontrollpatienten nach dem Erkrankungsalter, mit einer Spanne von plus/minus 2 Jahren Altersunterschied, gematcht wurden, musste aufgrund des außergewöhnlich langen Überlebens eine einzige Ausnahme gemacht werden, welche ein junges Mädchen mit einem Erkrankungsalter von 11 Jahren betraf. Ihr wurde als Kontrolle ein junger Mann, mit einem Erkrankungsalter von 17 Jahren zugeordnet.

Sicher kann in dieser Arbeit bei einem maximalen Überleben von 107 Monaten auch die Tumorentität angezweifelt werden. Ein Oligodendrogliom wäre mit dieser Überlebenszeit deutlich besser vereinbar als ein primäres Glioblastom [21, 65]. Die Gewebeschnitte wurden daher von zwei unabhängigen Neuropathologen untersucht und sicher als primäres Glioblastom befundet, was durch das Fehlen der IDH1 R132H-Mutation bei allen untersuchten Tumorproben untermauert wird.

Zu einem weiteren, prognostisch sehr wichtigen Faktor beim Glioblastom, dem Resektionsausmaß, konnte leider postoperativ anhand der vorliegenden Gewebeproben und Patientenakten nicht zu allen Patienten eine sichere Aussage getroffen werden, sodass sich abschließend nicht sagen lässt, ob nicht das Resektionsausmaß das Überleben maßgeblich mit beeinflusst hat.

Der Umfang der Stichprobe ist im Vergleich zu anderen klinischen Studien sehr gering. Dies begründet sich darin, dass es bislang nur wenige LTS gibt [5, 33, 38, 70, 84]. Die unseres Wissens derzeit größte Studie mit LTS stammt von *Krex et al* [48] und umfasst 55

Patienten mit primärem Glioblastom. Aus diesen Gründen gestaltete sich auch die Auswahl eines geeigneten statistischen Testverfahrens schwierig. Es handelt sich bei unseren Erhebungen um eine univariate Analyse eines eigentlich multifaktoriellen Geschehens mit einer asymmetrischen Verteilungsfunktion. Nichtsdestoweniger zeigte sich für CD 8 und CD 25 auch unter Berücksichtigung von Varianz und Standardabweichung (Daten nicht ausgewiesen) eine hohe statistische Signifikanz.

Bei der Methode der ten high-power fields wurden diese willkürlich vom Untersucher festgelegt und ausgezählt. Es gelang leider in der immunhistochemischen Färbung nicht immer eindeutig, zwischen den einzelnen Subpopulationen der Lymphozyten zu unterscheiden, da einige Antikörper für mehrere Subpopulationen, zum Beispiel B- und T-Zellen, spezifisch sind. Auch ließ sich die Aktivität der sich positiv färbenden Zellen mit der angewandten Methode nicht bestimmen. Wir konnten mit unserer Studie nur belegen, dass diese Zellen vorhanden sind. Inwiefern diese nachgewiesenen Lymphozyten aktiviert oder inaktiviert waren, entzieht sich den Möglichkeiten unserer Methodik. Auch wenn dies anfangs nicht Gegenstand der Studie war, so hätten sich diese Ergebnisse sicher als interessant herausstellen können.

Eine weitere Limitation der Arbeit besteht darin, dass vier Patienten bezüglich der Überlebensdauer zensiert werden mussten, da sie zum Zeitpunkt der Erhebung noch nicht verstorben waren. Aufgrund vieler Hürden wie Wohnort-, Hausarzt- oder Klinikwechsel gestaltete es sich bereits zum Zeitpunkt der Erhebung schwierig, alle Lebensdaten zu gewinnen. Die Cox-Regressionsanalyse, die für relevante Parameter zwar durchgeführt, aber in den Ergebnissen nicht komplett ausgewiesen wurde, erbrachte daher leider nur unbefriedigende Ergebnisse.

Nichtsdestotrotz bilden unsere Ergebnisse eine gute Grundlage, um das immunologische Milieu bei Langzeitüberlebenden mit Glioblastom tiefergehend zu untersuchen.

## 4.11 Ausblick

Welche Konsequenz erwächst aus unseren Resultaten? Bestimmte immunologische Marker scheinen tatsächlich bei Langzeitüberlebenden überhäufig in vitalem Tumorgewebe vorzukommen. Hieraus könnten sich grundlegend neue Erkenntnisse über die immunologischen Abläufe bei Glioblastomen ergeben und zum Begreifen der Pathogenese entscheidend beitragen. Deshalb sollten diese immunologischen Parameter in einer größeren prospektiven Studie an Glioblastompatienten untersucht werden, um die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse zu verifizieren. Möglicherweise können

immunologische Parameter wie CD 8 und CD 25 in Zukunft als Prognosemarker vergleichbar IDH 1 und MGMT herangezogen werden.

Fast wichtiger ist, dass basierend auf unseren sowie anderweitig neu gewonnenen Ergebnissen ein neuer Ansatz für eine Immuntherapie erwachsen könnte. Während die Immuntherapie beim Glioblastom noch weiterentwickelt und etabliert werden muss, findet sie bei anderen Tumoren bereits breite Anwendung. Bei der adoptiven Immuntherapie werden die Effektorzellen, zumeist Lymphozyten, vom Patienten isoliert, an tumorspezifische Moleküle gekoppelt, ex-vivo vermehrt und anschließend reinfundiert. So kann beispielsweise eine Impfung mit autologen dendritischen Zellen erfolgen und eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorantigene ausgelöst werden, ein Verfahren, das zur Zeit mit dem Vakzin DCVax®-L in einer Phase-III-Studie erprobt wird [1, 22, 67, 72, 73, 76, 77]. Auf diesem Ansatz basierend könnte künftig auch erneut versucht werden, CD 8- und CD 25-positive Lymphozyten, nachdem sie aus dem immunkompetenten Patienten isoliert wurden, mit tumorspezifischen Antigenen zu konjugieren, ex-vivo zu vermehren und anschließend zu reinfundieren, sodass eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorantigene ausgelöst würde [1, 72, 94]. Ein ähnlicher Ansatz wird auch bereits mit antiviralen T-Zellen verfolgt, nachdem Virusantigene, wie etwa von CMV, auf Glioblastomzellen nachgewiesen werden konnten [76, 77, 92].

Da wir eine gesteigerte Expression von CD 20 bei den LTS nachweisen konnten, scheint im Falle des Glioblastoms eine Therapie mit dem bei B-Zell-Lymphomen etablierten CD 20-Antikörper Rituximab kontraindiziert zu sein. Sinnvoll dagegen wäre, CD 20-positive B-Lymphozyten in das Tumorgewebe zu rekrutieren, etwa durch ein kostimulatorisches Signal oder die oben aufgeführte Methode der adoptiven Immuntherapie.

Auch im Zusammenhang mit CD 25-positiven B-Lymphozyten scheint es sinnvoll, nach einem kostimulatorischen Protein zu suchen, welches vermehrt B-Lymphozyten aus der Peripherie ins ZNS rekrutiert, um dieses Protein dann so aufzubereiten, dass es in-vivo die Blut-Hirn-Schranke zu passieren vermag.

Den prognostisch günstigen Effekt von CD 95 können wir mit unseren Ergebnissen bestätigen [90]. Bislang herrscht kein wissenschaftlicher Konsens, wie sich das Todessystem FAS/FAS-L auf Lymphozyten und Glioblastomzellen verhält. Eine eindeutige Erklärung findet sich auch in der vorliegenden Arbeit nicht. Sicher ist, beide Zelllinien können in der jeweils anderen Apoptose induzieren [43, 44, 87, 90]. Es müssen Mittel und Wege gefunden werden, diese Abläufe zum Beispiel medikamentös in eine Richtung lenken und steuern zu können.

## 5 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste und zugleich bösartigste primäre, hirneigene Tumor. Mit einem mittleren Überleben von 12-14 Monaten [1, 5, 21, 41, 44, 65, 71, 84, 96] und einer Langzeitüberlebensrate von 3-5% [48, 65, 70, 83], ist die Prognose ausgesprochen schlecht. Dennoch existieren einige wenige Fälle, die bis zu 20 Jahre nach Diagnosestellung überlebten [84]. Vergleichsweise wenige Studien sprechen dem Immunsystem eine entscheidende Rolle beim Langzeitüberleben bei Patienten mit Glioblastom zu [48]. Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen der Expression ausgewählter immunologischer Marker und dem Langzeitüberleben bei primärem Glioblastom.

Hierzu untersuchten wir 14 Patienten mit primärem Glioblastom, die zwischen 1997 und 2008 in Behandlung der Universitätsklinik für Neurochirurgie in Magdeburg waren und die länger als 30 Monate nach Erstdiagnose überlebten. Sie bildeten die Gruppe der Langzeitüberlebenden (LTS). Das längste Überleben dieser Gruppe betrug 107 Monate. Die Kontrolle bildeten 14 Kurzzeitüberlebende (STS) mit einer maximalen Überlebenszeit von 16 Monaten. Alle 28 Patienten wurden nach Alter, Geschlecht, Jahr der Diagnosestellung und Karnofsky-Index gematcht. Das in Paraffin eingebettete Tumorgewebe dieser Patienten wurde immunhistochemisch auf 9 Antigene, namentlich CD 4, CD 8, CD 14, CD 20, CD 25, CD 26, CD 57, CD 95, CD 95-L und HLA DR II untersucht. Alle Schnitte wurden unter dem Mikroskop in 40-facher Vergrößerung auf Antigen-positive Zellen ausgewertet. Zur quantitativen Bestimmung verwandten wir die Methode der ten high-power fields. Als bisher bestens etablierte Prognose-Parameter wurden bei allen Patienten die IDH1 R132H-Mutation sowie die Methylierung des MGMT-Promotors mit untersucht.

Die Gruppe der LTS zeigte ein mittleres Überleben von 44 Monaten. Die Kontrollgruppe überlebte im Mittel weniger als 6 Monate. Im Tumorgewebe der LTS konnten wir im Vergleich zu den STS eine deutlich erhöhte Expression von CD 8- und CD 25-positiven Lymphozyten nachweisen. Diese Differenz war in der statistischen Analyse von hoher Signifikanz. Auch zeigte sich eine gesteigerte Expression CD 20- und CD 95-positiver Zellen bei den LTS mit einer statistischen Signifikanz. Der B-Zell-Marker CD 20 wurde unseren Recherchen zufolge bislang nicht als prognostisch günstiger Faktor betrachtet. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass B-Zellen bei Langzeitüberlebenden mit Glioblastom eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Die Antigene CD 26 und CD 57 waren in allen Proben und beiden Gruppen stark positiv. Wir konnten zeigen, dass alle 28 Patienten IDH1 R132H negativ und damit alle untersuchten Tumoren primäre Glioblastome waren. Bei

54,5% der LTS und 55,5% der STS ließ sich ein methylierter MGMT-Promotor nachweisen. Beide Gruppen unterschieden sich damit nicht hinsichtlich dieses bedeutenden prognostischen Markers.

Für CD 8, CD 25, CD 20 und CD 95 zeigte sich eine so deutliche Korrelation zwischen der Expression dieser immunologischen Parameter und dem Langzeitüberleben, dass diese Parameter zukünftig neben IDH1 und MGMT als Prognosemarker etabliert werden könnten.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Bedeutung immunologischer Vorgänge bei der Tumorbilogie des Glioblastoms. Dies unterstreicht die Forderung zur Entwicklung von neuen immuntherapeutischen Ansätzen für diese Tumorentität.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Adamson C, Kanu OO., Mehta AI., Di C, Lin N, Mattox AK., Bigner DD. (2009) Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 18:1061–1083.
- [2] Alexander BM., Mehta MP. (2011) Role of isocitrate dehydrogenase in glioma. *Expert Rev Neurother* 11:1399–1409.
- [3] Ali S, Curtin JF., Zirger JM., Xiong W, King GD., Barcia C, Liu C, Puntel M, Goverdhan S, Lowenstein PR., Castro MG. (2004) Inflammatory and anti-glioma effects of an adenovirus expressing human soluble Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (hsFlt3L): treatment with hsFlt3L inhibits intracranial glioma progression. *Mol. Ther* 10:1071–1084.
- [4] Alvarado AG., Thiagarajan PS., Mulkearns-Hubert EE., Silver DJ., Hale JS., Alban TJ., Turaga SM., Jarrar A, Reizes O, Longworth MS., Vogelbaum MA., Lathia JD. (2017) Glioblastoma Cancer Stem Cells Evade Innate Immune Suppression of Self-Renewal through Reduced TLR4 Expression. *Cell stem cell* 20:450-461.e4.
- [5] Barbus S, Tews B, Karra D, Hahn M, Radlwimmer B, Delhomme N, Hartmann C, Felsberg J, Krex D, Schackert G, Martinez R, Reifenberger G, Lichter P (2011) Differential retinoic acid signaling in tumors of long- and short-term glioblastoma survivors. *J. Natl. Cancer Inst* 103:598–606.
- [6] Benedetti S, Bruzzone MG., Pollo B, DiMeco F, Magrassi L, Pirola B, Cirenei N, Colombo MP., Finocchiaro G (1999) Eradication of rat malignant gliomas by retroviral-mediated, in vivo delivery of the interleukin 4 gene. *Cancer Res* 59:645–652.
- [7] Bertrand J, Begaud-Grimaud G, Bessette B, Verdier M, Battu S, Jauberteau MO., Bertrand J, Begaud-Grimaud G, Bessette B, Verdier M, Battu S, Jauberteau M-O (2009) Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas- induced apoptosis. *International Journal of Oncology* 34:717–727.
- [8] Bessette B (2012) Decrease in Fas-induced apoptosis by the  $\gamma$ -secretase inhibitor is dependent on p75NTR in a glioblastoma cell line. *Exp Ther Med*.
- [9] Böcker W, Denk H, Heitz PU., Moch H (2008) *Lehrbuch Pathologie*, 4., Aufl. Urban & Fischer in Elsevier, München.
- [10] Boonacker E, Van Noorden, Cornelis J F (2003) The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur. J. Cell Biol.* 82:53–73.
- [11] Boujelben A, Watson M, McDougall S, Yen Y-F, Gerstner ER., Catana C, Deisboeck T, Batchelor TT., Boas D, Rosen B, Kalpathy-Cramer J, Chaplain MA. J. (2016) Multimodality imaging and mathematical modelling of drug delivery to glioblastomas. *Interface focus* 6:20160039.
- [12] Bralten, Linda B C, Kloosterhof NK., Balvers R, Sacchetti A, Lapre L, Lamfers M, Leenstra S, Jonge H de, Kros JM., Jansen, Erwin E W, Struys EA., Jakobs C,

- Salomons GS., Diks SH., Peppelenbosch M, Kremer A, Hoogenraad CC., Smitt, Peter A E Sillevius, French PJ. (2011) IDH1 R132H decreases proliferation of glioma cell lines in vitro and in vivo. *Ann. Neurol.* 69:455–463.
- [13] Burton EC., Lamborn KR., Feuerstein BG., Prados M, Scott J, Forsyth P, Passe S, Jenkins RB., Aldape KD. (2002) Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res* 62:6205–6210.
- [14] Burton EC., Lamborn KR., Forsyth P, Scott J, O'Campo J, Uyehara-Lock J, Prados M, Berger M, Passe S, Uhm J, O'Neill BP., Jenkins RB., Aldape KD. (2002) Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. *Clin. Cancer Res* 8:180–187.
- [15] Calinescu A-A, Kamran N, Baker G, Mineharu Y, Lowenstein PRicardo, Castro MGraciela (2015) Overview of current immunotherapeutic strategies for glioma. *Immunotherapy* 7:1073–1104.
- [16] CD25. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd25.html>. Accessed 27 April 2016.
- [17] Cragg MS., Walshe CA., Ivanov AO., Glennie MJ. (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current directions in autoimmunity* 8:140–174.
- [18] Curran WJ., Scott CB., Horton J, Nelson JS., Weinstein AS., Fischbach AJ., Chang CH., Rotman M, Asbell SO., Krisch RE. (1993) Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:704–710.
- [19] D Y Mason, J L Cordell, P Gaulard, A G D Tse, M H Brown Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence.
- [20] Dabbs DJ. (2010) Diagnostic immunohistochemistry. Theranostic and genomic applications, 3rd ed. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA.
- [21] Das P, Puri T, Jha P, Pathak P, Joshi N, Suri V, Sharma MChand, Sharma BS., Mahapatra AK., Suri A, Sarkar C (2011) A clinicopathological and molecular analysis of glioblastoma multiforme with long-term survival. *J Clin Neurosci* 18:66–70.
- [22] DCVax (Dendritic Cell Vaccine) | Astrocytoma Options. <http://astrocytomaoptions.com/dcvax-dendritic-cell-vaccine/>. Accessed 28 April 2016.
- [23] Dewey RA., Morrissey G, Cowsill CM., Stone D, Bolognani F, Dodd NJ., Southgate TD., Klatzmann D, Lassmann H, Castro MG., Löwenstein PR. (1999) Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat. Med* 5:1256–1263.
- [24] Durando X, Lemaire J-J, Tortochaux J, Van-Praagh I, Kwiatkowski F, Vincent C, Bailly C, Verrelle P, Irthum B, Chazal J, Bay J-O (2003) High-dose BCNU followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in supratentorial high-grade

- malignant gliomas: a retrospective analysis of 114 patients. *Bone Marrow Transplant* 31:559–564.
- [25] Fas-Ligand-Lexikon der Biochemie. <http://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/fas-ligand/2121>. Accessed 27 April 2016.
- [26] Fukushima S, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Takizawa T, Takusagawa Y, Mori M, Ichimura K, Tsuda H, Shibui S (2013) A case of more than 20 years survival with glioblastoma, and development of cavernous angioma as a delayed complication of radiotherapy. *Neuropathology* 33:576–581.
- [27] Gervasoni C, Ridolfo AL., Rocca A, Vago L, d'Arminio Monforte A (1995) Cerebral astrocytoma in HIV-infected patients. *AIDS* 9:403–404.
- [28] Grube S, Dünisch P, Klausnitzer M, Kalff R, Ewald C (2013) Inhibition of Fatty acid synthase (FAS) induces apoptosis in a human glioblastoma cell culture. M0210.
- [29] Guo C, Pirozzi CJ., Lopez GY., Yan H (2011) Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: mechanisms, biomarkers and therapeutic target. *Curr. Opin. Neurol.* 24:648–652.
- [30] Hacke W, Poeck K (2010) *Neurologie. Mit 83 Tabellen. Neurologie.*
- [31] Häcker B (2014) *Immunologie für Dummies. [wir sensibilisieren Sie für das Immunsystem ; auf einen Blick: die Grundlagen des zweiästigen Immunsystems ; Mediatoren und andere wichtige Proteine verstehen ; was welche Zellen machen ; die humoralen Bestandteile des Immunsystems], 1. Aufl. Wiley-VCH-Verl., Weinheim.*
- [32] Hafler DA., Fox DA., Manning ME., Schlossman SF., Reinherz EL., Weiner HL. (1985) In vivo activated T lymphocytes in the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 312:1405–1411.
- [33] Hassler M, Seidl S, Fazenydoerner B, Preusser M, Hainfeller J, Rossler K, Prayer D, Marosi C (2006) Diversity of cytogenetic and pathohistologic profiles in glioblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 166:46–55.
- [34] Herndler-Brandstetter D, Schwaiger S, Veel E, Fehrer C, Cioca DP., Almanzar G, Keller M, Pfister G, Parson W, Würzner R, Schönitzer D, Henson SM., Aspinall R, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstein B (2005) CD25-expressing CD8<sup>+</sup> T cells are potent memory cells in old age. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175:1566–1574.
- [35] Hicks MJ., Chiuchiolo MJ., Ballon D, Dyke JP., Aronowitz E, Funato K, Tabar V, Havlicek D, Fan F, Sondhi D, Kaminsky SM., Crystal RG. (2016) Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Gene Therapy for Glioblastoma. *PloS one* 11:e0162978.
- [36] Ho DMing-Tak, Hsu C-Y, Ting L-T, Chiang H (2003) MIB-1 and DNA topoisomerase II alpha could be helpful for predicting long-term survival of patients with glioblastoma. *Am. J. Clin. Pathol* 119:715–722.

- [37] Horbinski C, Kofler J, Yeane G, Camelo-Piragua S, Venneti S, Louis DN., Perry A, Murdoch G, Nikiforova M (2011) Isocitrate dehydrogenase 1 analysis differentiates gangliogliomas from infiltrative gliomas. *Brain Pathol.* 21:564–574.
- [38] Hottinger AF., Yoon H, DeAngelis LM., Abrey LE. (2009) Neurological outcome of long-term glioblastoma survivors. *J. Neurooncol* 95:301–305.
- [39] Hulshof MC., Koot RW., Schimmel EC., Dekker F, Bosch DA., González González D (2001) Prognostic factors in glioblastoma multiforme. 10 years experience of a single institution. *Strahlenther Onkol* 177:283–290.
- [40] Janeway CA. (2002) *Immunologie*, 5. Aufl. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- [41] Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, Landeghem FK.H., Waldoefner N, Teichgraeber U, Pinkernelle J, Bruhn H, Neumann F, Thiesen B, Deimling A, Felix R (2006) The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol* 78:7–14.
- [42] Kanu OO., Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD., Yan H, Adamson DCory (2009) Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin. Ther. Targets* 13:701–718.
- [43] Kleber S (2006) Gammabestrahlung führt zur CD95-abhängiger Invasivität in apoptoseresistenten Glioblastomzellen. s.n.], [S.l.
- [44] Kleber S, Sancho-Martinez I, Wiestler B, Beisel A, Gieffers C, Hill O, Thiemann M, Mueller W, Sykora J, Kuhn A, Schreglmann N, Letellier E, Zuliani C, Klussmann S, Teodorczyk M, Gröne H-J, Ganten TM., Sültmann H, Tüttenberg J, Deimling A von, Regnier-Vigouroux A, Herold-Mende C, Martin-Villalba A (2008) Yes and PI3K Bind CD95 to Signal Invasion of Glioblastoma. *Cancer Cell* 13:235–248.
- [45] Klöppel G, Kreipe HH., Remmele W, Paulus W, Schröder JMichael (2012) *Pathologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [46] Kraus JA., Glesmann N, Beck M, Krex D, Klockgether T, Schackert G, Schlegel U (2000) Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol* 48:89–94.
- [47] Kraus JA., Wenghoefer M, Glesmann N, Mohr S, Beck M, Schmidt MC., Schröder R, Berweiler U, Roggendorf W, Dietsch S, Dietzmann K, Heuser K, Müller B, Fimmers R, Deimling A von, Schlegel U (2001) TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, Bcl-2, and CD95 (APO-1/Fas) proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol* 52:263–272.
- [48] Krex D, Klink B, Hartmann C, Deimling A von, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP., Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G (2007) Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130:2596–2606.
- [49] Labussiere M, Sanson M, Idhah A, Delattre J-Y (2010) IDH1 gene mutations: a new paradigm in glioma prognosis and therapy? *Oncologist* 15:196–199.

- [50] Lacroix S, Feinstein D, Rivest S (1998) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol.* 8:625–640.
- [51] Leica Microsystems (2007/2008) Novocastra Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD 14 Code: NCL-L-CD14-223. Specification Sheet.
- [52] Leong AS.-Y (1999) *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology.* Greenwich Medical Media, London.
- [53] Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O (2009) IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123:758–762.
- [54] Levidou G, Korkolopoulou P, Agrogiannis G, Paidakakos N, Bouramas D, Patsouris E (2010) Low-grade oligodendroglioma of the pineal gland: a case report and review of the literature. *Diagnostic Pathology* 5:59.
- [55] Louis DN., Perry A, Reifenberger G, Deimling A von, Figarella-Branger D, Cavenee WK., Ohgaki H, Wiestler OD., Kleihues P, Ellison DW. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica* 131:803–820.
- [56] Marko NF., Toms SA., Barnett GH., Weil R (2008) Genomic expression patterns distinguish long-term from short-term glioblastoma survivors: a preliminary feasibility study. *Genomics* 91:395–406.
- [57] Mattle H, Mumenthaler M, Schroth G (op. 2010) *Kurzlehrbuch Neurologie, 3., vollst. überarb. Aufl.* G. Thieme, Stuttgart [etc.].
- [58] Metellus P, Nanni-Metellus I, Delfino C, Colin C, Tchogandjian A, Coulibaly B, Fina F, Loundou A, Barrie M, Chinot O, Ouafik L'h, Figarella-Branger D (2011) Prognostic impact of CD133 mRNA expression in 48 glioblastoma patients treated with concomitant radiochemotherapy: a prospective patient cohort at a single institution. *Stammzellen. Ann. Surg. Oncol* 18:2937–2945.
- [59] Morita M, Rosenblum MK., Bilsky MH., Fraser RA., Rosenfeld MR. (1996) Long-term survivors of glioblastoma multiforme: clinical and molecular characteristics. *J. Neurooncol* 27:259–266.
- [60] Moulignier A, Mikol J, Pialoux G, Eliazewicz M, Thurel C, Thiebaut JB. (1994) Cerebral glial tumors and human immunodeficiency virus-1 infection. More than a coincidental association. *Cancer* 74:686–692.
- [61] Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C (2008) *Janeway's immunobiology, 7th ed.* Garland Science, New York.
- [62] Nafe R, Franz K, Schlote W, Schneider B (2006) The morphology of perinecrotic tumor cell nuclei in glioblastomas shows a significant relationship with survival time. *Oncol. Rep* 16:555–562.
- [63] Nakao H, Eguchi K, Kawakami A, Migita K, Otsubo T, Ueki Y, Shimomura C, Tezuka H, Matsunaga M, Maeda K (1989) Increment of Tal positive cells in

- peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 16:904–910.
- [64] Nano R, Capelli E, Facoetti A, Benericetti E (2009) Immunobiological and Experimental Aspects of Malignant Astrocytoma. <http://ar.iiarjournals.org/content/29/7/2461.full>. Accessed 18 March 2012.
- [65] Naydenov E, Tzekov C, Minkin K, Nachev S, Romansky K, Bussarsky V (2011) Long-term survival with primary glioblastoma multiforme: a clinical study in bulgarian patients. *Case Rep Oncol* 4:1–11.
- [66] Nieder C, Astner ST., Molls M, Grosu AL. Analysis of long-term survivors of glioblastoma multiforme in a single institution with aggressive local retreatment protocol. *Anticancer Res* 27:2993–2996.
- [67] NW Bio Reports Promising Survival Data In 51 GBM Patients Treated With DCVax®-L-Northwest Biotherapeutics. <http://www.nwbio.com/nw-bio-reports-promising-survival-data-51-gbm-patients-treated-dcvax-l/>. Accessed 28 April 2016.
- [68] Paul Dent, Adly Yacoub, Margaret Park, Devanand Sarkar, Khalid Shah, David T. Curiel, Steven Grant Searching for a cure.
- [69] Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R, Wirth J (op. 2007) Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen - Labor - Klinik, 2., volls. überarb. und aktualisierte Aufl. Thieme, Stuttgart, New York.
- [70] Poelen J, Prick MJ. J., Jeuken JW. M., Wesseling P, Bernsen HJ. J. A. (2009) Six year survival after prolonged temozolomide treatment in a 30-year-old patient with glioblastoma. *Acta Neurol Belg* 109:238–242.
- [71] Poli A, Wang J, Domingues O, Planagumà J, Yan T, Rygh CBrekke, Skaftnesmo KOve, Thorsen F, McCormack E, Hentges F, Pedersen PHenning, Zimmer J, Enger PØyvind, Chekenya M (2013) Targeting glioblastoma with NK cells and mAb against NG2/CSPG4 prolongs animal survival. *Oncotarget* 4:1527–1546.
- [72] Polyzoidis S, Ashkan K (2014) DCVax®-L—Developed by Northwest Biotherapeutics. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10:3139–3145.
- [73] Prins RM., Soto H, Konkankit V, Odesa SK., Eskin A, Yong WH., Nelson SF., Liao LM. (2011) Gene Expression Profile Correlates with T-Cell Infiltration and Relative Survival in Glioblastoma Patients Vaccinated with Dendritic Cell Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17:1603–1615.
- [74] Sabin KZ., Winn RJ., Belton RJ., Ottem EN., Rovin RA. Induction of T cell apoptosis by glioblastoma multiforme.
- [75] Salvati M, Cervoni L, Artico M, Caruso R, Gagliardi FM. (1998) Long-term survival in patients with supratentorial glioblastoma. *J. Neurooncol* 36:61–64.
- [76] Sampson JH., Mitchell DA. (2015) Vaccination strategies for neuro-oncology. Table 1. *Neuro Oncol* 17:vii15-vii25.

- [77] Schuessler A, Walker DG., Khanna R (2014) Cytomegalovirus as a Novel Target for Immunotherapy of Glioblastoma Multiforme. *Front. Oncol.* 4:987.
- [78] Scott JN., Rewcastle NB., Brasher PM., Fulton D, MacKinnon JA., Hamilton M, Cairncross JG., Forsyth P (1999) Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. *Ann. Neurol* 46:183–188.
- [79] Sedo A, Malik R, Drbal K, Lisa V, Vlasticova K, Mares V (2001) Dipeptidyl peptidase IV in two human glioma cell lines. *European journal of histochemistry* : EJH 45:57–63.
- [80] Sedo A, Malik R, Krepela E (1998) Dipeptidyl peptidase IV in C6 rat glioma cell line differentiation. *Biological chemistry* 379:39–44.
- [81] Sedo A, Revoltella RP. (1995) Detection of dipeptidyl peptidase IV in glioma C6 and neuroblastoma SK-N-SH cell lines. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 73:113–115.
- [82] Shinojima N, Kochi M, Hamada J-i, Nakamura H, Yano S, Makino K, Tsuiki H, Tada K, Kuratsu J-i, Ishimaru Y, Ushio Y (2004) The influence of sex and the presence of giant cells on postoperative long-term survival in adult patients with supratentorial glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg* 101:219–226.
- [83] Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, Nakazato Y, Inoue T, Kanamori M, Tominaga T (2009) Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 151:1349–1358.
- [84] Sperduto CMaria, Chakravarti A, Aldape K, Burger P, Papermaster GBender, Sperduto P (2009) Twenty-year survival in glioblastoma: a case report and molecular profile. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 75:1162–1165.
- [85] Steiner HHerbert, Bonsanto MMario, Beckhove P, Brysch M, Geletneky K, Ahmadi R, Schuele-Freyer R, Kremer P, Ranaie G, Matejic D, Bauer H, Kiessling M, Kunze S, Schirmacher V, Herold-Mende C (2004) Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J. Clin. Oncol* 22:4272–4281.
- [86] Tran CT., Wolz P, Egensperger R, Kösel S, Imai Y, Bise K, Kohsaka S, Mehraein P, Graeber MB. (1998) Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24:293–301.
- [87] Tuettenberg J, Seiz M, Debatin K-M, Hollburg W, Staden M von, Thiemann M, Hareng B, Fricke H, Kunz C (2012) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of APG101, a CD95-Fc fusion protein, in healthy volunteers and two glioma patients. *International immunopharmacology* 13:93–100.
- [88] Tuononen K, Tynninen O, Sarhadi VKaur, Tyybäkinoja A, Lindlöf M, Antikainen M, Näpänkangas J, Hirvonen A, Mäenpää H, Paetau A, Knuutila S (2012) The hypermethylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter in gliomas--correlation with array comparative genome hybridization results and IDH1 mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 51:20–29.

- [89] Walid MSami (2008) Prognostic factors for long-term survival after glioblastoma. *Perm J* 12:45–48.
- [90] Walker DG, Chuah T, Rist MJ, Pender MP. (2006) T-cell Apoptosis in Human Glioblastoma Multiforme: Implications for Immunotherapy, *J Neuroimmunol.* 2006 Jun;175(1-2):59-68. Epub 2006 May 2. Elsevier BV.
- [91] Williamson SL., Steward M, Milton I, Parr A, Piggott NH., Krajewski AS., Angus B, Horne CH. (1998) New monoclonal antibodies to the T cell antigens CD4 and CD8. Production and characterization in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Am. J. Pathol.* 152:1421–1426.
- [92] Xu LW., Chow KK. H., Lim M, Li G (2014) Current Vaccine Trials in Glioblastoma: A Review. *Journal of Immunology Research* 2014.
- [93] Yan H, Parsons DWilliams, Jin G, McLendon R, Rasheed BAhmed, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ., Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW., Velculescu VE., Vogelstein B, Bigner DD. (2009) IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med* 360:765–773.
- [94] Yang I, Han SJ., Sughrue ME., Tihan T, Parsa AT. (2011) Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: evidence of distinct immunological microenvironments that reflect tumor biology. *J. Neurosurg.* 115:505–511.
- [95] Yang I, Tihan T, Han SJ., Wrensch MR., Wiencke J, Sughrue ME., Parsa AT. (2010) CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *J Clin Neurosci* 17:1381–1385.
- [96] Zhao W, Kridel S, Thorburn A, Kooshki M, Little J, Hebbar S, Robbins M (2006) Fatty acid synthase: a novel target for anti-glioma therapy. *Br J Cancer* 95:869–878.
- [97] Zou JP., Morford LA., Chougnet C, Dix AR., Brooks AG., Torres N, Shuman JD., Coligan JE., Brooks WH., Roszman TL., Shearer GM. (1999) Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J. Immunol.* 162:4882–4892.

# Danksagung

Die Danksagung ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

# Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Immunologische Parameter bei Langzeitüberlebenden mit Glioblastom

in der Klinik für Neurochirurgie, sowie im Institut für Neuropathologie

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 23.04.2018

Unterschrift

# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

# A Anhang

## A.1 Geräte, Reagenzien, Antikörper

Tabelle 16: Geräte

Gerät	Hersteller	Zusatzbezeichnung
Detektionssystem	Dako	Dako Autostainer Plus
Elektrophoresekammer	Pharmacia	
Klingen	Feather	Mikrotomklinge A35
Mikroskop	Olympus	Olympus BX 40
Objektträger Immunfixation	Dako	IHC Microscope Slides, Flex
Photometer	Eppendorf	Bio Photometer 8,5 mm
Schlittenmikrotom	Leica	SM 2000 R
Thermomixer	Eppendorf	Comfort
Thermocycler	Eppendorf	Master Cycler
Vakuumtrockner	Eppendorf	Concentrator 5301
Vortexer	B. Braun Biotech International	Certomat MV
Wärmeschrank	Memmert	
Zentrifuge	Eppendorf	5417
Zymo-Spin™ IC Column	Zymo Research	Methlierungskit
Collection Tubes	Zymo Research	Methlierungskit

Tabelle 17: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Zusatz	Produktcode
Acrylamid	Serva		
Ameisensäure	Roth		
APS	Merck		
BDA-Puffer	BD Biosciences		
Cp- Genome Universal Methylated DNA	Millipore		
Citratpuffer	nach eigener Rezeptur		
CT Conversion Reagenz	Zymo Research	Methlierungskit	
Corbit-Balsam	I. Hecht		
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako		S2022
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution	Dako	HRP	S2023
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako	Detektionssystem	K5007
Dako Wash Buffer 10x	Dako	Spülpuffer	S3006
DMSO	Qiagen	PCR-Kit	
Eosin	Zentralapotheke	1%ig wässrig, gelblich	
Essigsäure	Roth		
EZ DNA Methylation™ Kit	Zymo Research	Methlierungskit	D5001 & D5002
Genomic DNA from tissue	Machery Nagel	DNA- Präparationskit	
Glycerol	Roth		
Harris-Hämatoxylin	Dako	Dako Real Haematoxylin	
HCl Grundlage	Roth	1%ig	

HCl-Alkohol	nach eigener Rezeptur		
HotStarTaq® Plus Master Mix Kit	Qiagen	PCR-Kit	
φX- 174- REDNA, Hae II Digest	Amershan Pharmacia Biotech	Marker	
Lysepuffer B <sub>3</sub>	Machery Nagel	Kits Genomic DNA from tissue	
Lysepuffer T <sub>1</sub>	Machery Nagel	Kits Genomic DNA from tissue	
M-Dilution-Puffer	Zymo Research	Methlierungskit	
M-Binding-Puffer	Zymo Research	Methlierungskit	
M-Wash Puffer	Zymo Research	Methlierungskit	
M-Desulphonation Puffer	Zymo Research	Methlierungskit	
M-Elution Puffer	Zymo Research	Methlierungskit	
Natriumcitrat	Merck		
Natriumcarbonat-formalinlösung	Merck		
Natronlauge	Apotheke		
Nucleotide	Qiagen	PCR-Kit	
PCR-Puffer	Qiagen	PCR-Kit	
PDA	Bio RAD		
Proteinase K	Machery Nagel	Kits Genomic DNA from tissue	
Primer UF2, UR2, MF2, MR2	Biomers.net		
Retrievagen A (pH 6.0)	BD Pharmigen™	BDA-Puffer	550524
Roticlear	Roth		
Salpetersäure	Roth		
Silbernitratlösung	Roth		
Taq- Polymerase	Qiagen	PCR-Kit	
Target Retrieval Solution, pH 9 (10x)	Dako	Targetpuffer	S2367

TEMED	Serva		
Tris-Base	Serva		
Xylol	Zentrale Auffüllstelle		
Waschpuffer B <sub>5</sub>	Machery Nagel	Kits Genomic DNA from tissue	
Waschpuffer BW	Machery Nagel	Kits Genomic DNA from tissue	
Zitronensäure	Merck		

Tabelle 18: Antikörper

Antikörper	Name	Hersteller	Produktcode
CD 4	Monoclonal Mouse Anti-Human CD 4, Clone 4B12	Dako	M7310
CD 8	Monoclonal Mouse Anti-Human CD 8, Clone C8/144B	Dako	M7103
CD 14	Novocastra Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD 14	Leica Microsystems	NCL-L-CD 14-223
CD 20	Monoclonal Mouse Anti-Human B Cell, CD 20cy, Clone L26	Dako	M0755
CD 25	Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Interleukin-2 Receptor	Leica Microsystems	NCL-CD 25-305
CD 26	Rabbit anti- Human CD 26 (N-Terminal)	Zytomed Systems	603-2270
CD 57	Monoclonal Mouse Anti-Human CD 57, Clone TB01	Dako	M7271
CD 95	Rabbit anti-CD 95/FAS	Zytomed Systems	503-2504; 503-2501
CD 95-L	Rabbit anti-human CD 95L (FAS-Ligand)	Zytomed Systems	506-2714; 506-2711
HLA DR Class II	Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody HLA Class II (DR) Antigen	Leica Microsystems	NCL-LN3
IDH1 R132H	Anti-Human IDH 1 R132H, Astrozytoma, Oligodendroglioma Tumor Cell Marker, Mouse Monoclonal Antibody Clone H09	Dianova	DIA-H09

## A.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Position der Substrate im Autostainer .....	28
Abbildung 2: Protokoll Immunhistochemie .....	31
Abbildung 3: Protokoll HE-Färbung .....	32
Abbildung 4: Protokoll PCR-Ansatz .....	34
Abbildung 5: Protokoll Thermocycler .....	35
Abbildung 6: Protokoll Polyacrylamidgel .....	35
Abbildung 7: Protokoll Silberfärbung von Gelen .....	36
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve .....	38
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 8 .....	43
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 20 .....	47
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 25 .....	49
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 26 .....	51
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 57 .....	52
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 95 .....	53
Abbildung 15: Expression der Antigene im Vergleich .....	58
Abbildung 16: Legende Boxplots .....	59
Abbildung 17: Boxplot CD 8 .....	60
Abbildung 18: Boxplot CD 20 .....	60
Abbildung 19: Boxplot CD 25 .....	61
Abbildung 20: Boxplot CD 95/FAS .....	61

## A.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientenbezogene Daten .....	24
Tabelle 2: Antikörpertitrierung .....	29
Tabelle 3: Photometermessung der Reinheit und Konzentration der DNA .....	40
Tabelle 4: Elektrophoresebanden .....	41
Tabelle 5: Ergebnisse für CD 4 .....	42
Tabelle 6: Ergebnisse für CD 8 .....	44
Tabelle 7: CD 4/CD 8-Quotient .....	45
Tabelle 8: Ergebnisse für CD 14 .....	46
Tabelle 9: Ergebnisse für CD 20 .....	48
Tabelle 10: Ergebnisse für CD 25 .....	50
Tabelle 11: Ergebnisse für CD 95/FAS .....	54
Tabelle 12: Ergebnisse für CD 95-L/FAS-L .....	55
Tabelle 13: CD 95/CD 95-L-Quotient .....	56

Tabelle 14: Ergebnisse für HLA DR II .....	57
Tabelle 15: Ergebnisse des U-Test nach Wilcoxon.....	59
Tabelle 16: Geräte.....	93
Tabelle 17: Reagenzien.....	94
Tabelle 18: Antikörper.....	97