



Fakultät für Medizin

CD25 als prognostischer Marker im Rahmen eines radiobiologischen Profilings von Patient*innen mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Hypopharynx

Maximilian Wolfgang Berlet

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Mathias Gehrmann
2. Priv.-Doz. Dr. Benedikt Hofauer

Die Dissertation wurde am 22.06.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.01.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Motivation	6
1.2	Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Hypopharynx	7
1.2.1	Epidemiologie	7
1.2.2	Auslösende Faktoren	8
1.2.3	Klassifikation und Staging	8
1.2.4	Prognose	9
1.2.5	Therapieoptionen	9
1.3	Einteilung und Funktion der T-Lymphozyten	12
1.3.1	Die angeborene und adaptive Immunabwehr	12
1.3.2	Die T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8	12
1.3.3	CD25 - Struktur und Funktion	13
1.3.4	FoxP3 - Ein intrazellulärer Marker	15
1.3.5	T-Helferzellen	17
1.3.6	Zytotoxische T-Zellen	17
1.3.7	Regulatorische T-Zellen	18
1.3.8	Ratios	19
1.4	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Die <i>HNprädBio</i> -Studie	20
2.1.1	Studiendesign	20
2.1.2	Probenbearbeitung am Klinikum rechts der Isar	20
2.1.3	Auswahl der Patient*innen	22
2.1.4	Einhaltung der Analysezeitpunkte	24
2.2	Fluorescence activated cell sorting - <i>FACS™</i>	25
2.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay - <i>ELISA</i>	27
2.4	Statistische Auswertung	28
2.5	Erstellung eines Normalkollektivs	29
2.5.1	Versuchsablauf	29
2.5.2	Gatingstrategie	30
2.6	<i>FACS™</i> -Analyse des Studienkollektivs	32
2.6.1	Untersuchte Marker	32
2.6.2	Gatingstrategien	32
2.7	Veränderungen CD3 ⁺ Zellen über 3 Tage in EDTA-Blut	36

2.7.1	Versuchsbedingungen	36
2.7.2	Gatingstrategie	37
2.8	IL2 in Blutplasma	39
2.9	sIL2-R α in Blutplasma	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Erstellung eines Normalkollektivs	43
3.2	<i>FACS™</i> -Analyse der Gruppen NR und R	44
3.3	Vergleich der CD25-Expression zwischen den Gruppen NR, R und N	55
3.4	Veränderungen CD3 ⁺ Zellen über 3 Tage in EDTA-Blut	64
3.5	IL2 in Blutplasma	65
3.6	sIL2-R α in Blutplasma	67
4	Diskussion	71
5	Schlussfolgerungen	83
6	Literaturverzeichnis	84
7	Abbildungsverzeichnis	94
8	Tabellenverzeichnis	96
9	Anhang	98
9.1	TNM-Klassifikation <i>HNSCC</i>	98
9.2	Protokolle zur Probenbearbeitung im Rahmen der <i>HNprädBio</i> -Studie	100
9.2.1	<i>FACS™</i> -Analyse nach Lyse/Wash-Protokoll	100
9.2.2	Protokoll zur Erstellung eines Normalkollektivs (N-CD25) .	102
9.2.3	Protokoll zur Überprüfung der Veränderungen auf T-Lymphozyten in EDTA-Blut im Zeitverlauf von 75 Stunden (S-CD25) . .	102
9.2.4	Protokoll - IL2- <i>ELISA</i> aus Plasmaproben	104
9.2.5	Protokoll - sIL2-R α - <i>ELISA</i> aus Plasmaproben	107
9.3	Verwendete Reagenzien	108
9.4	Tabellen zu Maßzahlen, Lageparametern und zur Signifikanztestung der Experimente	110

Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

Abschn. Abschnitt

AIC *Akaike Information Criterion* - Kriterium zum Vergleich statistischer Modelle

APC Allophycocyanin

AUC *Area Under the Curve*

AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

Bsp. Beispiel

bzgl. bezüglich

bzw. beziehungsweise

ca. circa

CD3 T-Lymphozyten-Antigen

CD4 Oberflächenantigen auf T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten

CD8 Oberflächenantigen auf T-Lymphozyten

CD19 Oberflächenantigen auf B-Zellen

CD25 α -Untereinheit des IL2-Rezeptors

CD28 Oberflächenantigen auf T-Lymphozyten

CD39 Ektonukleidase (T-Zellen)

CD45 Oberflächenantigen auf allen kernhaltigen Blutzellen

CD45RB Isoform des CD45

CD73 Ektonukleidase (T-Zellen)

CD95 Fas-Rezeptor

COPD Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CTLA-4 *Cytotoxic T lymphocyte-associated Protein 4*

cTNM klinisch erhobene Tumorklassifikation

CTx Chemotherapie

DC Dendritische Zelle

DKTK Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung

ECOG Index zur Lebensqualität der *Eastern Cooperative Oncology Group*

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EG Empfehlungsgrad

EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*

ELISA *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

et al. und andere

f. folgende Seite

FACS™ *Fluorescence Activated Cell Sorting*

Fas Protein, Funktion im Bereich der Apoptose

fcs Dateiformat für FACS™ -Datensätze

FCS *Fetal calf serum*

ff. folgende Seiten

FI *Fluorescence Intensity*

FITC Fluorescein-Isothiocyanat

FoxP3 *Forkhead-Box-Protein P3*

G Gesunder Proband (*ELISA-Versuche*)

gem. gemäß

ggü. gegenüber

GITR *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*

HNSCC *Head and neck squamous cell carcinoma*

HPV Humanes Papilloma-Virus

HR Hazard Ratio

IFN γ Interferon γ

IgG Immunglobulin G

IL2 Interleukin 2

IL2-R α α -Untereinheit des IL2-Rezeptors

IMRT Intensitätsmodulierte Strahlentherapie

IQR Interquartilsabstand

kDa Kilodalton

KI_{95%} 95%-Konfidenzintervall

K_D Gleichgewichtskonstante

MFI *Mean Fluorescence Intensity*

ml Milliliter

μ l Mikroliter

n Anzahl der Proband*innen in einer Gruppe

N gesundes Normalkollektiv

NCT *Clinical Trial Registry Number*

NFAT *Nuclear factor of activated T cells*

NK Natürliche Killerzelle

NKT Natürliche Killer-T-Zelle

nm Nanometer

nM nanomolar

NR Gruppe der Patient*innen ohne Rezidiv

p16 eine Zyklin-abhängige Kinase

p56^{lck} Lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase

PBS *phosphate buffered saline*

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PE Phycoerythrin

PerCP Peridinin-Chlorophyll-Protein

PET-CT Positronenemissionstomographie in Kombination mit einer Computertomographie

pg Pikogramm

pM pikomolar

pSTAT5 *phosphorylated signal transducer and activator of transcription 5*

pTNM pathologisch erhobene Tumorklassifikation

PubMed Metadatenbank für medizinische Artikel

R0 Analysezeitpunkt vor der Therapie

R1 Analysezeitpunkt während der Therapie

R2 Analysezeitpunkt 3 Monate nach Therapieende

R3 Analysezeitpunkt 6 Monate nach Therapieende

R4 Analysezeitpunkt 12 Monate nach Therapieende

R5 Zeitpunkt des Rezidivs

R Gruppe der Patient*innen mit Rezidiv

r Korrelationskoeffizient

RCTx kombinierte Bestrahlungs- und Chemotherapie

RIST *Radio Immunosorbent Test*

RKI Robert Koch Institut

ROC Receiver Operating Characteristic

RT Raumtemperatur

RTx Bestrahlungstherapie

R² Bestimmtheitsmaß für statistische Modelle

S. Seite

S3 Leitlinie höchster Entwicklungsstufe

SD Standardabweichung

Sens. Sensitivität

Spez. Spezifität

sIL2-R α lösliche Form der α -Untereinheit des IL2-Rezeptors

STIKO Ständige Impfkommission des Robert Koch Instituts

Tab. Tabelle

TCR T-Zell-Rezeptor

T_{fH} folliculäre T-Helferzelle

TIL Tumorinfiltrierende Lymphozyten

TNF α Tumornekrosefaktor α

TNFR Tumornekrosefaktor-Rezeptor

T_C zytotoxische T-Zelle

T_{H1} T-Helferzelle Typ 1

T_{H2} T-Helferzelle Typ 2

T_{H9} T-Helferzelle Typ 9

T_{H17} T-Helferzelle Typ 17

T_{H22} T-Helferzelle Typ 22

T_H T-Helferzelle

T_{reg} regulatorische T-Zelle

UICC *Union Internationale Contre Le Cancer*

Youden J Youden-Index (*Sensitivität + Spezifität - 1*)

z.B. zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Motivation

Krebserkrankungen sind auf dem Vormarsch. - Die Zahlen des Statistischen Bundesamtes zeigen für Deutschland eine Zunahme der Todesfälle durch Neoplasien zwischen den frühen 80er Jahren des 20. Jahrhunderts und heute. Waren 1980 mit 192.719 Verstorbenen noch 20,3% aller Todesfälle auf maligne Neubildungen zurückzuführen, so starben 2017 bereits 227.609 Menschen (24,4%) an einer Tumor-erkrankung (Destatis, 2019). Wahrscheinlich tragen, neben anderen Faktoren, ein veränderter Lebensstil und eine höhere Lebenserwartung zu dieser Entwicklung bei. So wurden zahlreiche Krebs-assoziierte Risikofaktoren identifiziert, derer man mittels Präventionskampagnen Herr zu werden versucht. - Während solche primordial- und primärpräventiven Maßnahmen darauf abzielen, die „großen“ weitverbreiteten Krebsarten, wie Lungen-, Darm- und Brustkrebs einzudämmen, dürften andere, weniger häufige Tumorformen noch kaum in das Bewusstsein der breiten Bevölkerung vorgedrungen sein. - In Summe verursachen diese weniger häufigen Entitäten jedoch einen durchaus beträchtlichen Teil krebsbedingter Todesfälle. - Hierzu zählt auch das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Hypopharynx. Da z.B. ähnliche Risikofaktoren, wie die des Lungenkrebses mit diesen Karzinomen in Verbindung stehen, ist damit zu rechnen, dass entsprechende Präventionsprogramme sich auch hier positiv auswirken. Darüber hinaus müssen neue Therapieformen entwickelt und prognostische Marker gefunden werden, die eine Langzeitüberwachung erkrankter und bereits therapierter Patient*innen ermöglichen. - Eine bedeutende Strategie der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Rachens ist die kombinierte Strahlen- und Chemotherapie. Hierbei spielen nicht nur direkte physikalische und chemische Effekte eine Rolle. - Vielmehr muss die Auswirkung auf den erkrankten Organismus und das mögliche Ansprechen des Tumors als vielschichtiger Prozess verstanden werden, an welchem das Immunsystem einen wichtigen Anteil hat. So sind in diesem Zusammenhang immunologische Zellmarker von besonderem Interesse. - CD25, die α -Kette des Interleukin 2-Rezeptors auf T-Lymphozyten, ist ein Vertreter dieser Oberflächenantigene. Die Frage, welche Rolle er in der Überwachung therapierter Patient*innen spielen könnte, soll in der folgenden Dissertationsarbeit erörtert werden.

München im Mai 2022

1.2 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Hypopharynx

1.2.1 Epidemiologie

Dem Zentrum für Krebsregisterdaten am Robert Koch Institut zufolge standen bösartige Neubildungen der Mundhöhle und des Rachens in Deutschland im Jahr 2014 mit 3,7% aller Krebsneuerkrankungen an neunter Stelle der Tumorlokalisationen bei Männern und mit 1,6% an fünfzehnter Stelle bei Frauen. Bezogen auf alle Krebssterbefälle, machte diese Entität bei männlichen Patienten 3,4% und bei weiblichen 1,3% aus. Bei 90% der Tumoren handelte es sich um Plattenepithelkarzinome, während Adenokarzinome lediglich in 5% der Fälle vorkamen. Wie Tabelle 1 zeigt, blieb die Anzahl an Neuerkrankungen und Sterbefällen in den Jahren 2013 und 2014 relativ stabil. Es erkrankten ca. dreimal mehr Männer als Frauen an solchen Tumoren. Außerdem waren Männer im Schnitt 3-4 Jahre früher betroffen als Frauen und verstarben 6-7 Jahre früher. (Kaatsch et al., 2017, S. 24) Im Folgenden wird die in vielen Publikationen verwendete Abkürzung *HNSCC* (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) für das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Hypopharynx benutzt.

Tabelle 1: Epidemiologische Maßzahlen zu Tumoren der Mundhöhle und des Rachens für die Jahre 2013 und 2014 in Deutschland

<i>Geschlecht</i>	<i>Maßzahl</i>	<i>2013</i>	<i>2014</i>
Männer	Neuerkrankungen	9630	9130
	Sterbefälle	4084	4095
	medianes Erkrankungsalter (in Jahren)	62	63
	medianes Sterbealter (in Jahren)	64	65
Frauen	Neuerkrankungen	3740	3700
	Sterbefälle	1389	1353
	medianes Erkrankungsalter (in Jahren)	66	66
	medianes Sterbealter (in Jahren)	71	71

(nach Kaatsch et al., 2017, S. 24, Tabelle 3.2.1)

1.2.2 Auslösende Faktoren

Als bedeutende Risikofaktoren sind Tabak- und Alkoholkonsum zu nennen. Hinzu kommen Infektionen mit den Hochrisiko-Varianten des Humanen Papilloma-Virus (HPV). (Kaatsch et al., 2017, S. 24) Im Juni 2018 empfahl die Ständige Impfkommission am Robert Koch Institut (STIKO) daher erstmals eine Impfung gegen diese Viren auch bei Jungen zwischen 9 und 14 Jahren. Zuvor wurde diese Maßnahme lediglich für Mädchen als Primärprävention des Gebärmutterhalskrebses angeraten. Neben den Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle werden auch das Anal-, Penis-, Vaginal- und Vulvakarzinom mit HPV in Verbindung gebracht. In Ländern mit einer hohen Impfquote konnte bereits eine signifikante Senkung der HPV-bedingten Läsionen im Anogenitalbereich nachgewiesen werden. Jedoch wird die Impfbereitschaft der STIKO zufolge als zu gering eingeschätzt, um in Deutschland eine stabile Herdenimmunität zu erreichen. (STIKO, 2018, S. 233 ff.) Die Auswirkungen dieser Maßnahme auf den HPV-assoziierten Anteil der Plattenepithelkarzinome in Mundhöhle und Rachen bleiben also fraglich.

1.2.3 Klassifikation und Staging

Wie für die meisten anderen Krebsentitäten existiert auch für Oropharynxkarzinome eine TNM-Klassifikation. Diese beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors (T), den Befall von Lymphknoten (N) sowie das Vorhandensein von Metastasen (M). Der Tatsache, dass verschiedene Faktoren zur Genese des *HNSCC* beitragen, wird in der Stadienzuordnung (*Staging*) seit der 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation für Oropharynxkarzinome von 2017 dadurch Rechnung getragen, dass HPV-positive Tumoren anders eingeordnet werden als HPV-negative (Tabelle 15 im Anhang, Abschnitt 9.1). HPV-positive Karzinome sprechen deutlich besser auf eine kombinierte Radiochemotherapie an als Tumoren anderer Genese (Fakhry et al., 2008). - Somit werden auch fortgeschrittene HPV-positive Tumoren einem niedrigeren Stadium zugeordnet als vergleichbar klassifizierte HPV-negative Karzinome (Beltz et al., 2018). Die Festlegung des HPV-Status aus Biopsiematerial erfolgt dabei mittels immunhistochemischen Nachweises der p16-Expression im Primärtumor oder in Lymphknotenmetastasen sowie eventuell einer HPV-in-situ Hybridisierung oder *PCR* (Holmes et al., 2015, Beltz et al., 2018, S. 375). Ist der p16-Status unbekannt, so gilt der Tumor für die TNM-Klassifikation als p16-negativ. Der Anteil HPV-positiver Oropharynxkarzinome beträgt in Nord- und Westeuropa ca. 40%. Bei der Beurteilung p16-positiver Tumoren wird zwischen einer klinischen und einer pathologischen Stadieneinteilung unterschieden (cTNM bzw. pTNM), je nachdem, welche Untersuchungstechniken verwendet werden und welches Biopsiematerial zur

Verfügung steht. (Beltz et al., 2018) Die Zuordnung des prognostisch sehr bedeutsamen N-Status richtet sich sowohl nach der p16-Expression als auch nach der Art der Erhebung (klinisch oder pathologisch) (Denaro et al., 2018, S. 204 ff.). - Eine Auflistung der unterschiedlichen N-Klassifikationen ist der Tabelle 16 im Anhang, Abschnitt 9.1, zu entnehmen.

1.2.4 Prognose

Eine Aussage über die Prognose einer *HNSCC*-Erkrankung ist, wie auch bei anderen multifaktoriell bedingten Krebsarten, schwierig. Mit der 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation konnte die Stadiendiskrimination gegenüber der vorhergehenden Version verbessert werden. In einer großen retrospektiven Studie mit 599 Fällen konnten Wurdemann et al., 2017 die 5-Jahresüberlebensraten nach neuer Klassifikation insbesondere unter Berücksichtigung der Unterscheidung zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren aufzeigen (Tabelle 2). Eine Stratifizierung ergab als negative Einflussfaktoren auf das 5-Jahresüberleben ein Alter > 60 Jahre, einen niedrigen *ECOG*-Status sowie den Konsum von Alkohol und Nikotin. (Wurdemann et al., 2017, S. 6 ff.)

Tabelle 2: 5-Jahresüberlebensrate bei Patient*innen mit *HNSCC* in Abhängigkeit vom HPV-Status

<i>HPV-Status</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
+	95,8	77,5	66,6	16,7
-	58,1	65,9	57,6	35,2

*Angaben in Prozent des Ausgangskollektivs. Der Tabelleninhalt wurde Wurdemann et al., 2017, S. 8, Tabelle 6 entnommen. Bei den HPV-negativen Patient*innen zeigte sich in der zitierten Studie bei den Stadien I-III nach UICC keine statistisch signifikante Diskriminierbarkeit. Das bedeutet, dass sich für dieses Kollektiv keine sichere Aussage über den Unterschied bzgl. der 5-Jahresüberlebensrate zwischen den Stadien I-III treffen lässt.*

1.2.5 Therapieoptionen

Die S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“, die in Zusammenarbeit der Deutschen Krebsgesellschaft, der Deutschen Krebshilfe und der AWMF im Jahr 2012 veröffentlicht wurde, empfiehlt neben einer interdisziplinären Abstimmung im Rahmen von *Tumorboards*, abhängig von Stadium und Allgemein-

zustand, eine individuell angepasste Behandlung (Tabelle 3). So stehen eine alleinige chirurgische Therapie, eine alleinige Strahlentherapie (*RTx*), die Kombination einer Chemotherapie mit Strahlentherapie (*RCTx*) sowie ein Konzept, das alle drei Modalitäten umfasst, zur Auswahl. (K. D. Wolff et al., 2012, S. 33 ff.) - Die zitierte Leitlinie wurde bis zur Drucklegung dieser Arbeit nicht mehr aktualisiert und befindet sich zu diesem Zeitpunkt in Revision. Evidenz bezüglich einer Verbesserung des 5-Jahresüberlebens von Patient*innen mit fortgeschrittenem *HNSCC* (Stadien III und IV) unter kombinierter Radiochemotherapie, brachten nicht zuletzt die Metaanalyse *MACH-NC* und ihre Updates seit dem Jahr 2000. Besonders hochdosierte Cisplatin-haltige Therapieregime zeigten bei dieser Gruppe einen Vorteil gegenüber anderen Therapieformen. Von den *Targeted Therapies* zeigte allein Cetuximab, ein monoklonaler Antikörper gegen *EGFR*, in Kombination mit *RTx* im Vergleich zu alleiniger Radiotherapie einen Vorteil. Gegenüber einer kombinierten Radiochemotherapie konnte bei den fortgeschrittenen *HNSCC* keine Überlegenheit nachgewiesen werden. (Winqvist et al., 2017) Technischer Standard der radiotherapeutischen Komponente einer Kombinationstherapie bei *HNSCC* ist heute die *IMRT* (*Intensity Modulated Radiotherapy*). Mit ihr können besonders gezielt Bestrahlungspläne, unter Schonung empfindlicher Strukturen, praktisch umgesetzt werden. Auch Fortschritte in der Informatik und Bildgebung (z.B. *PET-CT*) brachten umfangreiche Neuerungen in diesem hoch technisierten Zweig der Medizin. (Semrau, 2017)

Tabelle 3: Therapieempfehlungen gemäß S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ von 2012

<i>Therapie</i>	<i>Empfehlung</i>	<i>EG</i>
Chirurgische Resektion	Unter Berücksichtigung der Erreichbarkeit tumorfreier Resektionsränder	A
elektive Neck-dissection	Bei Patient*innen mit klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus, unabhängig von der T-Kategorie	A
modifizierte radikale Neck-dissection	Bei klinischem Verdacht auf Lymphknotenbefall	A
primäre Radiochemotherapie	Bei fortgeschrittenem, nicht operablem und nicht metastasiertem Mundhöhlenkarzinom, besonders in den Altersgruppen bis 70 Jahren einer alleinigen Strahlentherapie vorzuziehen	A
postoperative Radiochemotherapie	Bei fortgeschrittener T-Kategorie (T3/T4) knappen oder positiven Resektionsrändern, perineuraler Invasion, Gefäßinvasion und/oder Lymphknotenbefall	A
palliative Strahlentherapie	Kann bei inkurablem Mundhöhlenkarzinom in Erwägung gezogen werden	0

EG: Empfehlungsgrad, A: Starke Empfehlung (soll), 0: Empfehlung offen (kann) (K. D. Wolff et al., 2012, S. 35 ff.)

1.3 Einteilung und Funktion der T-Lymphozyten

Da sich diese Dissertationsarbeit im Speziellen mit immunologischen Aspekten des *HNSCC* beschäftigt, soll im Folgenden, nach einem groben Überblick über das menschliche Immunsystem, ein detailliertes Bild der verschiedenen untersuchten Marker CD3-positiver Immunzellen des peripheren Blutes gezeichnet werden.

1.3.1 Die angeborene und adaptive Immunabwehr

Das Immunsystem des Menschen besteht im Wesentlichen aus zwei Teilen. - Die angeborene Immunabwehr (*engl. innate immunity*) stellt durch die Ausbildung physischer Barrieren und plasmatischer wie zellulärer Komponenten die „erste Verteidigungslinie“ gegen entartete Zellen und Mikroben dar. Protagonisten dieses eher unspezifischen Konzeptes sind dendritische Zellen (*DC*), Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, Natürliche Killerzellen (*NK*) sowie Natürliche Killer-T-Zellen (*NKT*). Die wesentlich spezifischere adaptive Immunabwehr (*engl. adaptive immunity*) bildet den zweiten Teil des Immunsystems, der ebenfalls über humorale und zelluläre Komponenten verfügt. B-Lymphozyten bilden Immunglobuline aus, welche gelöste und zellständige Antigene binden können. - T-Lymphozyten hingegen erkennen virusinfizierte und entartete Zellen und töten diese ab. Zudem ermöglicht eine breite Palette an Zytokinen die komplexe interzelluläre Kommunikation. (Narendra et al., 2013, S. 823 ff.)

1.3.2 Die T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8

Die Zugehörigkeit eines T-Lymphozyten zu einer Subpopulation leitet sich von der Expression verschiedener zum *Cluster of Differentiation (CD)* gehörender Oberflächenmarker ab. Allen T-Lymphozyten gemeinsam ist der T-Zellrezeptor (*TCR*). Dieser besteht aus einer α - und einer β -Kette. Da diese Ketten zu keiner intrazellulären Signalweitergabe fähig sind, lagert sich der TCR mit weiteren Strukturen an der Zelloberfläche zusammen. Hierzu zählen $CD3\delta\epsilon$, $CD3\gamma\epsilon$ und $\zeta\zeta$, welche gemeinsam eine Signalweitergabe im Sinne einer Aktivierung an das Zellinnere ermöglichen. (Krshnan et al., 2016) An die Module $CD3\delta\epsilon$ und $CD3\gamma\epsilon$ können spezifische Antikörper binden, die beispielsweise im Rahmen einer *FACSTM*-Analyse, mit einem Farbstoff verknüpft, Zellen als T-Lymphozyten identifizieren. Das CD3-Antigen definiert somit die Obergruppe der T-Zellen. Die weitere Unterteilung dieser Population erfolgt über die Expression von CD4 und CD8.

CD4 ist ein 55kDa großes Glykoprotein, das die Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem MHCII-Komplex stabilisiert. Das Protein besteht aus 4 Domänen (D1-

D4) und ist außer auf T-Lymphozyten auch auf Monozyten, Makrophagen, Langerhanszellen, B-Lymphozyten, Dendritischen Zellen, Eosinophilen Granulozyten, Megakaryozyten und Mastzellen zu finden. (Owen et al., 2016, S. 2227)

CD8 ist strukturell als Dimer angelegt. Zwei α -Ketten oder eine α - und eine β -Kette lagern sich zum funktionellen Komplex an der Oberfläche zusammen. Die homodimere $\alpha\alpha$ -Form kann dabei gemeinsam mit der heterodimeren $\alpha\beta$ -Variante auf T-Lymphozyten vorkommen oder ohne die heterodimere Form exklusiv auf NK-Zellen. CD8 werden verschiedene mögliche Funktionen zugeschrieben. - Einerseits wird seine Rolle als Adhäsionsmolekül, andererseits die als Co-Rezeptor des TCR diskutiert. Fest steht, dass CD8, ebenso wie der TCR, an das MHC-I-Molekül bindet, dabei jedoch nicht direkt bei der Antigenerkennung mitwirkt. Eine Signalweitergabe erfolgt über die Interaktion der α -Kette mit p56^{lck}-Kinasen. Am ehesten kommt CD8 damit die Rolle eines Stabilisators der TCR-MHC-I-Interaktion zu. (Cole / Gao, 2004) CD25, das ebenfalls auf der Oberfläche von T-Lymphozyten exprimiert wird und Gegenstand dieser Arbeit ist, wird in Abschnitt 1.3.3 charakterisiert.

1.3.3 CD25 - Struktur und Funktion

Historie

Interleukin 2 (IL2), ein von aktivierten T-Zellen sezerniertes Zytokin, bindet auf der Oberfläche seiner Zielzellen an verschiedene Formen des Interleukin 2-Rezeptors (IL2-R). Die α -Untereinheit dieses Rezeptors (IL2-R α) wird, im Sinne des *Cluster of Differentiation*, auch als CD25 bezeichnet. Untersuchungen dieses Antigens lassen sich in Form von *PubMed*-Einträgen bis zu den späten 80er und frühen 90er Jahren des 20. Jahrhunderts zurückverfolgen. Ein früher *Review* bezüglich der Struktur und Funktion des IL2-Rezeptors von Smith, 1989 diskutiert bereits das Vorhandensein verschiedener Ketten seiner hochaffinen Variante. Damals waren lediglich zwei der drei heute bekannten Untereinheiten entdeckt (55kD und 75kD mit niedriger und intermediärer IL2-Affinität). Mittlerweile hat sich das Konzept eines quartären Komplexes von IL2 mit den drei Untereinheiten seines hochaffinen Rezeptors (α , β und γ_c) durchgesetzt, welche gemeinsam für die maximale Bindungsstärke verantwortlich sind. (X. Wang et al., 2005)

Struktur

Strukturell unterscheidet sich die α -Kette des IL2-Rezeptors (IL2-R α) von typischen Zytokinrezeptoren. Im Gegensatz zu diesen ist IL2-R α aus zwei Domänen (D1 und D2) zusammengesetzt, die eine Miniatur- β -Faltblattstruktur in Sand-

wichform aufweisen. (Rickert et al., 2005) Isoliert wird die α -Untereinheit auch als *low-affinity*-IL2-Rezeptor bezeichnet ($K_D \approx 5 \cdot 10^{-10} - 10^{-9} M$). Sie ist nicht direkt an der Signalübertragung ins Zellinnere beteiligt. (H. M. Wang / Smith, 1987) Erst nach Zusammenlagerung der drei einzelnen Ketten (α , β und γ) wird IL2 von diesem Komplex mit hoher Affinität ($K_D \approx 10 pM$) gebunden und es kommt über die γ -Untereinheit zur Aktivierung einer $p56^{lck}$ -Kinase und somit einer Signalweitergabe ins Zellinnere. Auch eine Kombination lediglich bestehend aus β - und γ -Kette ist zur Signalweitergabe fähig, bindet IL2 jedoch nur mit intermediärer Affinität ($K_D \approx 1 nM$). (Sugamura et al., 1992)

Funktion

Aus der heterotrimeren Struktur des hochaffinen IL2-Rezeptors ergibt sich eine komplexe Interaktion mit seinem Liganden. Zweck der Bindung von IL2 auf Effektorzellen ist dabei die Aktivierung des pSTAT5-Signalweges. Diese Wirkung wird sowohl über den intermediären ($\beta + \gamma$) als auch den hochaffinen ($\alpha + \beta + \gamma$) IL2-Rezeptor vermittelt. Die Expression der α -Kette variiert dabei stark und ist abhängig vom Aktivitätsniveau der Immunzelle. (Waters et al., 2018) Hauptsächlich antigen-aktivierte T-Zellen sezernieren IL2, welches die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben reifer T-, B- und Natürlicher Killerzellen anregt (X. Wang et al., 2005). Ein Modell zur Interaktion CD25⁺ T-Zellpopulationen schlugen Feinerman et al., 2010 vor. - Danach wird die CD25-Expression sowohl auf T-Effektorzellen (T_{eff}) als auch auf regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) bei IL2-Bindung hochreguliert. Während die IL2-Sekretion der T_{eff} im Sinne eines negativen *Feedbacks* inhibiert wird, sezernieren T_{reg} dieses Zytokin generell nicht. Beide Populationen konkurrieren nun um das extrazellulär gelöste IL2, das bei Bindung an den IL2-Rezeptor auf den T_{eff} über die Phosphorylierung von STAT5 ein Überlebenssignal bedeutet. T_{reg} können nun schwach aktivierten T-Effektorzellen durch IL2-Depletion dieses Überlebenssignal entziehen und eine Reduktion der T_{eff} bewirken. Stark aktivierte T-Effektorzellen exprimieren genug IL2-R α (50- bis 100-fache Überexpression im Vergleich zur β - und γ -Kette), um auch gegenüber sehr geringen IL2-Konzentrationen sensibel zu sein. Sie entziehen sich so weitestgehend der Konkurrenz durch die T_{reg} . (Feinerman et al., 2010) Neben dem Mechanismus der IL2-Depletion existieren auch noch andere, die in Abschnitt 1.3.7 vorgestellt werden.

1.3.4 FoxP3 - Ein intrazellulärer Marker

Neben Antigenen der Zelloberfläche, die zur Definition von Lymphozytenpopulationen dienen, existieren auch intrazelluläre Marker. - In dieser Arbeit wurde das Protein FoxP3 (*Forkhead Box Protein P3*) mittels intrazellulärer Färbung markiert, um eine Unterscheidung der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) von anderen $CD25^+$ Zellen zu ermöglichen. FoxP3 wird vor allem in $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Lymphozyten exprimiert und ist spezifischer für T_{reg} als z.B. CD25, CD45RB, CTLA-4 und GITR (Hori et al., 2003, S. 1060). Die Rolle von FoxP3 im Rahmen der T_{reg} -Funktion wurde von Lu et al., 2017 in einem umfassenden Review erläutert: Danach ist das Protein als Transkriptionsfaktor entscheidend für das Genexpressionsmuster der T_{reg} . FoxP3 und seine Bindungspartner formen einen großen Komplex (400-800 kDa), der mehr als 360 weitere Transkriptions- oder chromatinmodifizierende Faktoren umfasst (nach Rudra et al., 2012). Ein wichtiger Vertreter ist der *Nuclear factor of activated T cells (NFAT)*, der an die Promotor-Region von FoxP3-regulierten Genen bindet (nach Wu et al., 2006). Auf diese Weise moduliert FoxP3 Genexpressionsmuster, die durch TCR-gekoppelte epigenetische Programmierung entstanden sind (nach Morikawa / Sakaguchi, 2014). So bewirkt die Interaktion von FoxP3 beispielsweise mit Genen, die für IL2 oder IFN γ kodieren, eine Deacetylierung von Histon H3, was in der Folge deren Genexpression vermindert. Im Gegensatz dazu fördert FoxP3 die Expression von TNF, GITR, CD25 und CTLA-4 durch Histonacetylierung nahe den entsprechenden Gen-Promotoren. (nach C. Chen et al., 2006) Im Gegenzug wird FoxP3 selbst durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. So stabilisieren IL2 und die IL2-Rezeptor-Untereinheit CD25 die FoxP3-Expression und damit die suppressive Funktion der T_{reg} (nach Q. Chen et al., 2011 und Miyara et al., 2009). Auch in anderen CD4-positiven Lymphozyten, die nicht der T_{reg} -Population angehören, wurde FoxP3, insbesondere bei Aktivierung nachgewiesen, wobei dessen Funktion in diesem Zusammenhang bisher nicht geklärt ist (nach Gavin et al., 2006). - Die vorgestellten Marker CD3, CD4, CD8, CD25 und FoxP3 definieren mit ihrer unterschiedlichen Expression durch T-Lymphozyten diverse Subpopulationen, die schematisch in Abbildung 1 gezeigt und in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben werden.

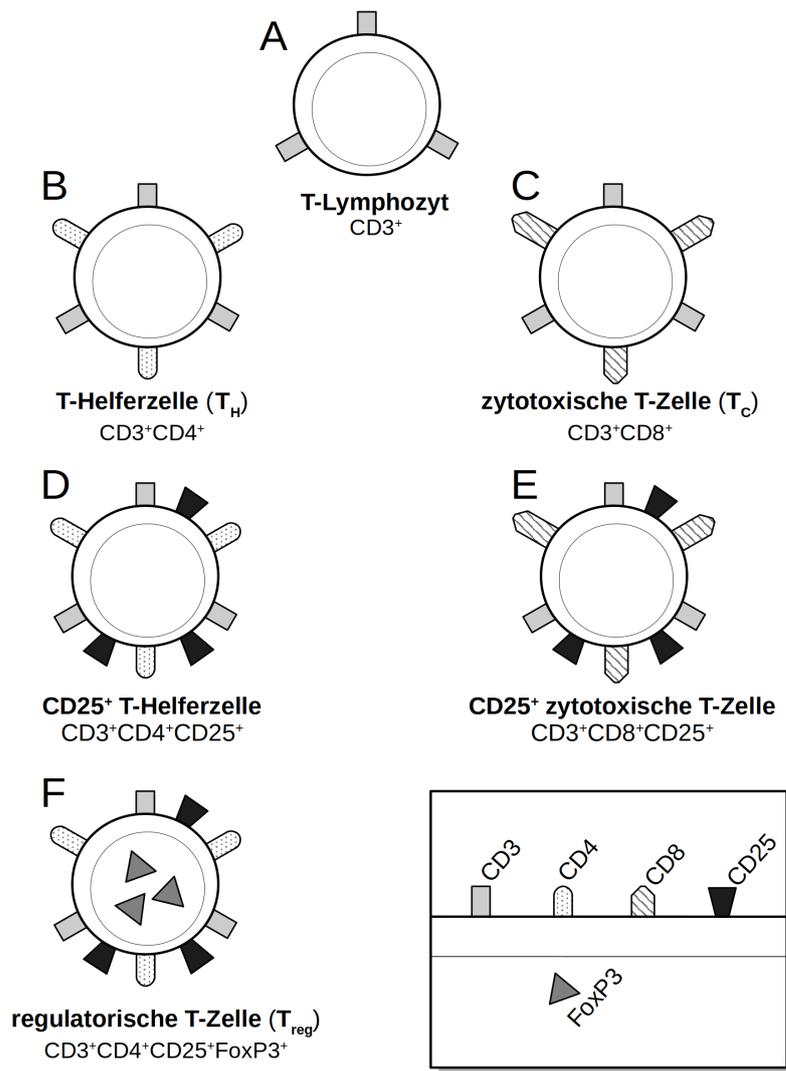


Abbildung 1: Einteilung der T-Lymphozyten nach ihrer Markerexpression

Die Grafik zeigt schematisch die Einteilung der T-Lymphozyten nach ihrer Markerexpression. CD3 findet sich auf allen T-Lymphozyten sowie auf NKT-Zellen (A). Eine zusätzliche Expression von CD4 definiert dabei die Obergruppe der T-Helferzellen (T_H) während CD8 auf den zytotoxischen T-Zellen (T_C) exprimiert wird (B,C). Beide Zellgruppen können darüber hinaus in unterschiedlichem Ausmaß CD25 an ihrer Oberfläche präsentieren (D,E). Die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) stellen eine spezielle Untergruppe der $CD4^+$ T-Lymphozyten dar, indem sie neben dem intrazellulären Protein FoxP3 zusätzlich konstitutiv CD25 exprimieren (F). Eigene Abbildung.

1.3.5 T-Helferzellen

CD4⁺ T-Zellen lassen sich in Effektor- und regulatorische T-Zellen (T_H und T_{reg}) unterteilen. Die T_H spielen insofern eine zentrale Rolle in der Funktion des adaptiven Immunsystems, als dass sie B-Lymphozyten dabei unterstützen, Antikörper zu produzieren und die Funktion der T_C und Makrophagen koordinieren. Abhängig von der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Zytokine werden die T_H in weitere Subgruppen unterteilt. Hierzu gehören T_H1-, T_H2-, T_H17-, T_H22-, T_H9- und T_{FH}-Zellen. (Cosmi et al., 2014, S. 36) T_H1 produzieren IFN- γ , IL2 und TNF- β und beeinflussen sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunabwehr (Romagnani, 1994). Demgegenüber ermöglichen T_H2 über die Sekretion von IL4, IL5, IL9 und IL13 eine Rekrutierung aktivierter Makrophagen und Granulozyten. Sie ermöglichen einerseits die Abwehr von Parasiten wie Helminthen, sind andererseits aber auch an der Entstehung allergischer Erkrankungen beteiligt. (Pulendran / Artis, 2012) T_H17-Zellen tragen durch die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten zur Immunabwehr bei (Pelletier et al., 2010). Die übrigen Untergruppen der T_H üben verschiedenste Funktionen, die teilweise noch nicht vollständig aufgeklärt sind, aus. So kommen T_H22 gemeinsam mit T_H17 vermehrt in der Kolonschleimhaut gesunder Menschen vor (M. J. Wolff et al., 2012) und T_{FH} sind für die Formierung von Keimzentren in sekundären lymphatischen Organen notwendig (Ma et al., 2012). Als definierende Marker für die Population der T_H wurden in dieser Arbeit CD3 und CD4 verwendet. Zur Unterscheidung von den T_{reg} erfolgte eine intrazelluläre Anfärbung von FoxP3, sodass sich für die T_H-Effektorzellen eine Markerkombination von CD3⁺CD4⁺FoxP3⁻ ergibt.

1.3.6 Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Lymphozyten (T_C) überwachen sämtliche Körperzellen und töten jene ab, die durch eine Virusinfektion oder spontane maligne Entartung die Integrität des Organismus bedrohen. Dabei erkennen sie körperfremde Antigene, die durch MHC-I als Fragmente intrazellulär degradierte Proteine an der Zelloberfläche präsentiert werden. Hierbei helfen zahlreiche Kofaktoren wie z.B. CD8 (Abschn. 1.3.2). Durch verschiedene Mechanismen wird dann der programmierte Tod der infizierten oder entarteten Zelle eingeleitet. So wird z.B. über den direkten Kontakt des auf T_C exprimierten Fas-Liganden mit seinem Rezeptor (CD95) auf der Zielzelle die Caspase-Kaskade aktiviert und die Apoptose eingeleitet. Eine andere Möglichkeit der direkten Zell-Zell-Interaktion ist die Sekretion der zytotoxischen Proteine *Perforin* und *Granzym* in den interzellulären Raum. Auch die Sekretion von Zytokinen wie TNF- α und IFN- γ bewirkt über Rezeptorbindung eine Lyse der betreffenden

Zelle. (Andersen et al., 2006, S. 33 ff.) Als Marker für die T_C dienen im Rahmen dieser Arbeit CD3 und CD8.

1.3.7 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind $CD4^+$ T-Lymphozyten, die FoxP3 und in großem Ausmaß auch konstitutiv die α -Kette des IL2-Rezeptors (CD25) exprimieren (Plitas / Rudensky, 2016, S. 1). Die Suppression durch T_{reg} ist essentiell für die Vermeidung autoimmuner Entzündungsreaktionen. Einer Reihe von Genprodukten wird diese Wirkung zugeschrieben, so z.B. CD39 und CD73, die als Ectoenzyme die Konversion von extrazellulärem ATP zu Adenosin katalysieren und so direkt die Proliferation von Effektor-T-, dendritischen und myeloiden Zellen inhibieren. Hinzu kommt das Konzept eines „Tauziehens“ (*tug-of-war*) um extrazelluläres IL2 mit den T-Effektorzellen, wie es Feinerman et al., 2010 bezeichnen (Abschnitt 1.3.3). Da T_{reg} vielfältige Strategien zur Suppression anwenden, kann kein einzelner Mechanismus den vollen Funktionsumfang dieser Zellen abdecken. T-Zell- und IL2-Rezeptorsignal sind jedoch sicher erforderlich. (Chinen et al., 2016) Im peripheren Blut von Patient*innen mit *HNSCC* ist der Anteil dieser Zellpopulation gegenüber gesunden Kontrollen erhöht (Aggarwal et al., 2017 und Schuler et al., 2013). Seit der Entdeckung von Sakaguchi et al., 1995, dass die Depletion von $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten bei Mäusen eine Reihe von Autoimmunkrankheiten hervorruft, wird diese Zellgruppe intensiv bzgl. ihrer Funktionalität und Bedeutung für benigne wie maligne Erkrankungen erforscht. Über die Jahre wurde mittels weiterer Marker wie z.B. FoxP3 die für die beobachtete Immunsuppression verantwortliche Untergruppe immer genauer definiert. In einigen, vor allem frühen Arbeiten, wird, in Anlehnung an Sakaguchi et al., die gesamte $CD4^+CD25^+$ Zellpopulation als *regulatorische T-Zellen* bezeichnet. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wird die Population der T_{reg} jedoch aufgrund der für die suppressive Funktion notwendigen FoxP3-Expression als $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ definiert. (Plitas / Rudensky, 2016; Williams / Rudensky, 2007, S. 1)

1.3.8 Ratios

Bei der Untersuchung von Lymphozytenpopulationen in wissenschaftlichen Studien wird meist, neben absoluten Zellzahlen, auch der prozentuale Anteil einer Population an der übergeordneten Zellgruppe angegeben. Auch das Verhältnis von Zellgruppen, die nicht einer subsidiären Ordnung folgen, wird häufig bestimmt und, an das Englische angelehnt, als *Ratio* bezeichnet. Ein Beispiel im Zusammenhang mit Patient*innen, die eine Radiochemotherapie erhalten haben, stellt die CD4/CD8-*Ratio* dar. So zeigten Tao et al., 2016, dass *HNSCC*-Patient*innen mit einer höheren CD4/CD8-*Ratio* ($\geq 1,77$), abhängig vom N-Status, ein höheres metastasenfrees 5-Jahresüberleben aufweisen, als Patient*innen mit einem niedrigeren Wert. Auch die Analyse anderer nicht subsidiärer Zellpopulationen wie die von zytotoxischen T-Zellen und T_{reg} in Form einer CD8/ T_{reg} -*Ratio* wurde bereits angestellt (Schuler et al., 2013, S. 14).

1.4 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Dissertationsarbeit soll nun das Potential des Oberflächenantigens CD25 als prognostischer Marker für Patient*innen mit Mundhöhlen- und Hypopharynxkarzinomen im Verlauf einer kombinierten Radiochemotherapie (RCTx) untersucht werden. Das besondere Augenmerk liegt dabei auf den T-Lymphozyten im peripheren Blut der Patient*innen. Dieses leicht und zu beliebiger Zeit zu gewinnende Medium würde sich exzellent für ein niederschwelliges Monitoring eignen. Würde sich CD25 hier als prognostisch bedeutsamer Marker herausstellen, so wäre unter Umständen ein klinischer Test hiervon abzuleiten. Im Folgenden soll über eine einfache Nutzenanalyse hinausgegangen und die Rolle des CD25 im Zusammenspiel der verschiedenen Lymphozytenpopulationen herausgearbeitet werden. Zu diesem Zweck werden in erster Linie die numerischen Verhältnisse lymphozytärer Subpopulationen dargestellt und analysiert. Darüber hinaus werden praktische Erwägungen, wie beispielsweise zur Haltbarkeit der Markerexpression bei Lagerung und Versand des Probenmaterials, angestellt, um hier eine Vergleichbarkeit mit früheren und künftigen Arbeiten zu ermöglichen. Des Weiteren sollen die beiden löslichen Marker IL2 und sIL2-R α als Akteure in der Systematik des CD25 analysiert werden. Insgesamt ist diese Arbeit als Teil der Vorauswertungen der *HNprädBio*-Studie des DKTK anzusehen, welche sich neben CD25 mit der Expression zahlreicher anderer Oberflächenmarker befasst und wichtige Erkenntnisse im Bezug auf das Monitoring von *HNSCC*-Patient*innen liefern wird.

2 Material und Methoden

2.1 Die *HNprädBio*-Studie

2.1.1 Studiendesign

Die *HNprädBio*-Studie (NCT-Nummer: NCT02059668) des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) ist eine prospektive multizentrische Beobachtungsstudie mit Standorten in Berlin, Dresden, Essen, Frankfurt am Main, Freiburg, Heidelberg, München und Tübingen. Es sollen prognostische Faktoren bezüglich des lokalrezidivfreien Überlebens, des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens von Patient*innen mit lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Oropharynx oder des Hypopharynx im Verlauf von 2 Jahren validiert werden. Das Studiendesign umfasst 2 Kohorten: Die erste Kohorte setzt sich aus Patient*innen zusammen, die eine *primäre Radiochemotherapie (RCTx)* erhalten haben. Die zweite Kohorte besteht aus Patient*innen, bei denen nach erfolgter chirurgischer Resektion eine *adjuvante Radiochemotherapie* durchgeführt wurde. Beginn der Rekrutierung war der 01.07.2014. Für die vorliegende Dissertationsarbeit wurden ausschließlich Proben von Patient*innen untersucht, die eine *primäre Radiochemotherapie* erhalten haben. Die Ein- und Ausschlusskriterien für diese Gruppe zeigt Tabelle 4. Es wurden Erkrankte aller Geschlechter ab einem Alter von 18 Jahren in die Studie eingeschlossen. (Krause et al., 2014) Sowohl eine zentrale Ethikkommission am Hauptstandort der Studie in Dresden als auch die Ethikkommissionen an den anderen Standorten gaben zum gewählten Studiendesign und den Aufklärungsunterlagen im Vorfeld ein positives Votum ab. Die Patient*innen wurden dementsprechend nach umfassender Aufklärung und schriftlichem Einverständnis eingeschlossen. Leiterin der Prüfung war Frau Prof. Dr. Mechthild Krause am zentralen Standort Dresden. In dieser Arbeit ist von *Patient*innen* und *Proband*innen* die Rede, wobei stets alle Geschlechter und Geschlechtsidentitäten berücksichtigt werden.

2.1.2 Probenbearbeitung am Klinikum rechts der Isar

Am Klinikum rechts der Isar in München wurden im Rahmen der Studie Plasma- und Serumproben von Patient*innen aller teilnehmenden Zentren gesammelt, bearbeitet und schließlich auf unterschiedlichste Fragestellungen hin untersucht. Vor allem aber wurden Leukozyten in frischem EDTA-Blut derselben Patient*innen mittels verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper gefärbt und per *FACS™* analysiert. Die Probenbearbeitung in München erfolgte über die Dauer der Studie durch

verschiedene Personen. Hierzu zählten Laborfachkräfte und Doktorand*innen der Medizin. Der Autor dieser Arbeit war über einen Zeitraum von 6 Monaten (März bis September 2017) mit der Probenbearbeitung und Verwaltung betraut. Die Proben wurden den Patient*innen, dem jeweiligen Analysezeitpunkt entsprechend, am Klinikum rechts der Isar bzw. an einem der sieben anderen DKTK-Standorte entnommen und per Expressversand über Nacht nach München geschickt. So war gewährleistet, dass die Untersuchung mittels *FACS™* und das Einfrieren der Plasma- und Serumproben bei -80°C maximal 24 Stunden nach der Entnahme erfolgte. Fehlerhafte Proben wurden dabei indiziert oder sofort verworfen. Das in dieser Arbeit analysierte Material wurde teilweise durch den Autor selbst und teilweise durch andere Mitarbeiter, die vor März 2017 für die Studie verantwortlich waren, bearbeitet. Auch nachfolgenden Doktorand*innen stand nach diesem Prinzip eine stetig wachsende Probensammlung zur Verfügung.

Für die Blutentnahmen wurden durch das Studienprotokoll 6 verschiedene Zeitpunkte definiert. Der erste Zeitpunkt *R0* markierte gleichsam den Einschluss in die Studie. Die Probe wurde hier entnommen, bevor irgendeine Art der Therapie durchgeführt worden war. Die nächste Analyse erfolgte dann während der laufenden Therapie (*RCTx*) nach Abschluss der Hälfte der dafür geplanten Zeitdauer (*R1*). Die weiteren Blutentnahmen dienten der Nachuntersuchung und waren 3 Monate (*R2*), 6 Monate (*R3*) und 12 Monate (*R4*) nach dem Ende der kombinierten Radiochemotherapie terminiert. Darüber hinaus wurde ein zusätzlicher Analysezeitpunkt *R5* festgelegt, zu dem die Blutentnahme unmittelbar bei Diagnose eines Rezidivs erfolgte. Abbildung 2 in Abschnitt 2.1.4 gibt einen Überblick über die Einhaltung der Analysezeitpunkte für die in dieser Dissertationsarbeit untersuchten Kollektive.

Tabelle 4: Ein- und Ausschlusskriterien der *HNprädBio*-Studie für Patient*innen mit primärer Radiochemotherapie

<i>Einschlusskriterien</i>	<i>Ausschlusskriterien</i>
lokal fortgeschrittenes Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, des Oro- oder des Hypopharynx	weitere Tumorerkrankung, die aktuell oder wahrscheinlich innerhalb der nächsten 2 Jahre einer Therapie bedarf oder wahrscheinlich die Prognose des/der Patient*in beeinflusst
Stadium III oder IV ohne Fernmetastasen	Fernmetastasierung
Patient*in ist in der Lage an regelmäßigen Tumornachsorgen teilzunehmen, Allgemeinzustand nach WHO 0-2	Tumor-unabhängige Erkrankung oder Zustände, welche die Überlebenswahrscheinlichkeit des/der Patient*in auf < 2 Jahre reduzieren oder eine Nachsorge über 2 Jahre beeinträchtigen
geplante Bestrahlungsdosis 69-72 Gy	geplante Gesamtdosis < 69 und > 72 Gy
geplante Gesamtbehandlungszeit 38-54 Tage	geplante Gesamtbehandlungszeit < 38 Tage oder > 54 Tage
schriftliche Einwilligung des/der Patient*in	Patient*in nicht einwilligungsfähig oder fehlende schriftliche Einwilligung
geplante simultane Chemotherapie mit Cisplatin (kumulative geplante Gesamtdosis mind. 180 mg/m ² Körperoberfläche, aufgeteilt auf mehrere Einzelgaben)	Kontraindikation gegen eine Cisplatin-basierte Chemotherapie oder erfolgte Induktionschemotherapie
	vorangegangene Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich, wenn eine Gefahr der Überschneidung der Bestrahlungsvolumina besteht
	Schwangerschaft oder Laktation

*Die Tabelle wurde nach den Ein- und Ausschlusskriterien für Patient*innen mit primärer Radiochemotherapie aus dem Trial record der *HNprädBio*-Studie auf der Website <https://clinicaltrials.gov/> (Krause et al., 2014) erstellt. Die Informationen wurden am 22.09.2019 abgerufen. Dabei wurden in den einzelnen Zeilen gegensätzliche Kriterien einander gegenüber gestellt.*

2.1.3 Auswahl der Patient*innen

Für diese Arbeit wurden aus dem Kollektiv primär mit Radiochemotherapie behandelter Patient*innen der *HNprädBio*-Studie zwei Gruppen gebildet. Die Gruppe **NR** (*No Relapse*) umfasste Teilnehmer*innen, bei denen bis zum Zeitpunkt *R4* kein Rezidiv aufgetreten war. Demgegenüber steht die Gruppe **R** (*Relapse*) mit Patient*innen, bei denen im gleichen Beobachtungszeitraum ein Rezidiv diagnostiziert wurde. Da zum Zeitpunkt der Datenanalyse zu dieser Dissertationsarbeit,

aus Gründen des Studiendesigns, keine Baseline-Charakteristik der Patient*innen zur Verfügung stand, mussten Entscheidungskriterien zur Auswahl der verwendeten Proben festgelegt werden. Bei Fehlen einer Probe konnte nämlich zunächst nicht festgestellt werden, welches Ereignis hierfür ursächlich war (z.B. *Lost to follow-up* oder Tod). Es musste jedoch gewährleistet sein, dass die Proband*innen die ersten 12 Monate der Beobachtung sicher an der Studie teilgenommen und überlebt hatten. Dies konnte nur über das Vorhandensein des planmäßig letzten Entnahmezeitpunktes *R4* gewährleistet werden. Es wurde schließlich festgelegt, für die Gruppe der Patient*innen ohne Rezidiv (**NR**), nur solche Teilnehmer*innen einzuschließen, die zum Stichtag 31.05.2017 den Zeitpunkt *R4* erreicht hatten. Für die Gruppe der Patient*innen mit Rezidiv (**R**) wurde aufgrund der geringeren Anzahl der Proben jeder/jede Proband*in eingeschlossen, bei dem/der ein Zeitpunkt *R5* (Auftreten eines Rezidivs) bis zum 02.02.2018 vorlag. So umfasste die Gruppe **NR** schlussendlich 66 und die Gruppe **R** 20 Patient*innen.

Tabelle 5: Anzahl der EDTA-Blutproben, aufgeschlüsselt nach Gruppe und Analysezeitpunkt

	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>	Σ
NR	63	47	57	54	66	–	287
R	18	16	14	14	–	20	82
							369
NR/R	3,5	2,9	4,1	3,9	–	–	

NR Gruppe der Patient*innen ohne Rezidiv, *R* Gruppe der Patient*innen bei denen im Verlauf ein Rezidiv auftrat, *NR/R* Verhältnis der Anzahl der Proben in der Gruppe **NR** zu denen der Gruppe **R**, *R0-R5*: Analysezeitpunkte

2.1.4 Einhaltung der Analysezeitpunkte

Nicht zuletzt im Sinne einer Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten, muss die Einhaltung der korrekten Analysezeitpunkte kontrolliert werden. Abbildung 2 stellt dies für beide Kollektive (**NR**, **R**) dar.

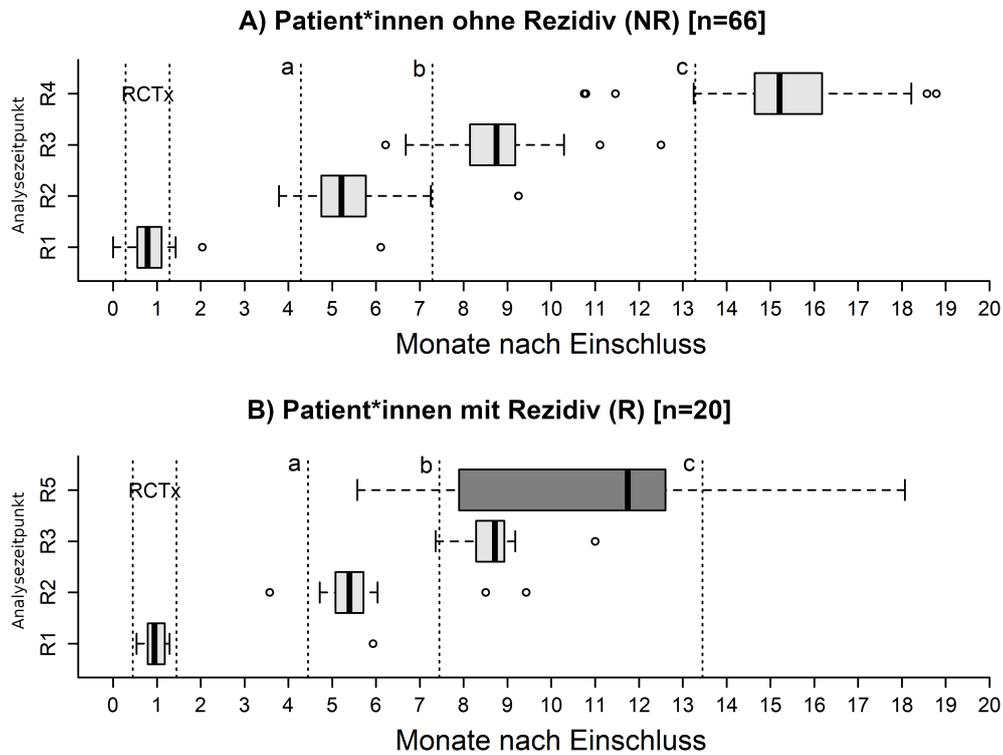


Abbildung 2: Einhaltung der Analysezeitpunkte

RCTx: kombinierte Radio- und Chemotherapie, R1: nach der Hälfte der RCTx, R2: 3 Monate nach Ende der RCTx, R3: 6 Monate nach Ende der RCTx, R4: 12 Monate nach Ende der RCTx, R5: bei Auftreten eines Rezidivs nach Ende der Therapie, a: avisierter Zeitpunkt R2, b: avisierter Zeitpunkt R3, c: avisierter Zeitpunkt R4 - Eigene Abbildung.

Die Analysezeitpunkte *R2*, *R3*, *R4* und *R5* werden jeweils auf das Ende der *RCTx* bezogen angegeben. Es fällt auf, dass die Blutentnahmen größtenteils später erfolgten, als geplant. Der variable Zeitpunkt *R5* (Rezidiv) lag median bei 10,5 Monaten nach Ende der *RCTx* (Tabelle 6). Lediglich zwei Patient*innen der Gruppe **R** entwickelten ein Rezidiv, nachdem sie bereits den Analysezeitpunkt *R4* erreicht hatten. Daher wurde *R4* beim Vergleich mit der Gruppe **NR**, aufgrund einer zu geringen Anzahl an Proben, nicht einbezogen (Abschnitt 3.3).

Tabelle 6: Tatsächliche Zeitpunkte der Nachuntersuchungen in Monaten nach Ende der RCTx

<i>Gruppe</i>	<i>Zeitpunkt</i>	<i>avisiert</i>	<i>tatsächlich (Median [IQR])</i>
NR	R2	3	3,82 [0,95]
	R3	6	7,5 [1,09]
	R4	12	13,79 [1,57]
R	R2	3	3,82 [0,61]
	R3	6	7,25 [0,64]
	R5	–	10,5 [5,38]

*NR: Patient*innen ohne Rezidiv, R: Patient*innen mit Rezidiv, RCTx: kombinierte Radio-Chemotherapie, IQR: Interquartilsabstand, R5: Zeitpunkt der Feststellung eines Rezidivs, Zahlenwerte in Monaten*

2.2 Fluorescence activated cell sorting - **FACSTM**

Die maschinelle Analyse großer Zellzahlen ist aus der modernen immunologischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Neben der Durchführung großer Studien ist darüber hinaus eine individuelle Diagnostik auf molekularer Ebene im klinischen Alltag möglich. Mit dem Verfahren des *flow cytometry cell sorting* oder auch *fluorescence activated cell sorting (FACSTM)*, wobei es sich bei Letzterem um einen eingetragenen Markennamen der Firma Becton Dickinson (BD) handelt, können sowohl Zielstrukturen auf der Zelloberfläche, als auch solche, die sich im Zellinneren befinden, untersucht werden. Hierzu werden zunächst Zellen, im konkreten Fall Immunzellen, per Blutentnahme gewonnen und mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen die gewünschte Zielstruktur versetzt. Dabei können je nach Konfiguration des *Zytometers* mehrere Farbstoffe, die an verschiedene Antikörper gekoppelt sind (in dieser Arbeit *PerCP*, *APC*, *PE* und *FITC*), mit der Probe vermischt und anschließend in einem Analysegang untersucht werden. Die markierten Zellen werden in wässriger Lösung gehalten und schließlich in speziellen Küvetten (*FACSTM-Tubes*) durch das Zytometriegerät angesaugt. Die Probenlösung wird durch die Leitungsarchitektur zu einem dünnen Strahl geformt, der von einem zellfreien Flüssigkeitsstrom ummantelt ist (*Sheath flow*). Auf diese Weise wird erreicht, dass die in der Probenlösung befindlichen Zellen, im besten Falle einzeln, am Laser vorbeiströmen. Mit zunehmender Geschwindigkeit der Flüssig-

keitsströme steigt zwar der Durchsatz, die Messgenauigkeit verringert sich aber. Der nachgeschaltete Laser regt nun den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff der an die Zellantigene gebundenen Antikörper in der entsprechenden Wellenlänge an. Photomultiplier wandeln das resultierende Fluoreszenzereignis in ein elektrisches Signal um. Durch unterschiedliche Wellenlängen ist bei Verwendung mehrerer Laser eine Addressierung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und damit die Auswertung multipler Zellantigene möglich. (Cossarizza et al., 2017, S. 1600 ff.) Auch ohne Berücksichtigung von Fluoreszenzereignissen ist durch das Streuverhalten des auf die Zelle treffenden Laser-Strahls eine Aussage über deren Eigenschaften möglich. Hier unterscheidet man anhand unterschiedlicher Streuungscharakteristika den *Forward Scatter (FSC)*, der mit dem Volumen der Zelle korreliert und den *Side Scatter (SSC)*, der Aussagen über die innere Struktur der Zelle ermöglicht. (Cossarizza et al., 2017, S. 1756) Über dieses grundlegende Prinzip hinaus existieren unterschiedliche Abwandlungen und Erweiterungen des Verfahrens. Ein mittels (*FACS™*) registriertes Fluoreszenz-Ereignis bezeichnet man im Englischen auch als *Event*. Die Werte jedes einzelnen registrierten *Events* werden in einer Datentabelle, meist im *fcs*-Format, abgespeichert. Auf Grundlage dieser Tabelle können nun im Nachhinein mittels Auswahl und Gruppierung anhand ähnlicher Wertebereiche Populationen definiert werden. Die Auswertung erfolgte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durch den Autor, für die einzelnen Proben manuell, mit dem Programm *CellQuest Pro®*. Dabei wurde für jede Fragestellung ein individuelles sequenzielles bivariates *Gating*-Verfahren verwendet. Das heißt, dass die *Events* zunächst in einem *Scatterplot*, welches *FSC* gegen *SSC* aufträgt, dargestellt und hier die für Lymphozyten typische Kombination aus Volumen und Granularität im linken unteren Bereich mittels einer polygonalen Umrandung (*Gate*) selektiert wurden. Die so ausgewählten Zellen wurden dann, der Fragestellung entsprechend, unter Verwendung weiterer Parameter wieder in zweidimensionalen Diagrammen angezeigt und mittels neuerlichem *Gating* weiter in Subpopulationen gegliedert. Diese 2D-Diagramme lassen sich im Allgemeinen gemäß der Markerexpression der *Events* unterteilen. Im unteren linken Bereich (*Lower Left*) liegen die für beide Parameter negativen, im rechten unteren (*Lower Right*) und im linken oberen Bereich (*Upper Left*) die für jeweils einen Parameter positiven und im rechten oberen Bereich (*Upper Right*) die für beide Parameter positiven Populationen. Die *CD25⁺ Events* verschiedener Subpopulationen wurden am Ende des sequenziellen *Gatings* in einem Histogramm ausgegeben, welches die Verteilung der Fluoreszenzintensität (engl. *Fluorescence Intensity*) der *Events* in logarithmierter Form darstellt. Hier konnte nun, durch Festlegung eines unteren Grenzwertes im Bezug zur Ne-

gativprobe (Isotypenkontrolle) die Anzahl der positiven Events ermittelt werden. (Cossarizza et al., 2017, S. 1653 f.) Events in der Isotypenkontrolle, die über diesen unteren Grenzwert hinausgingen, wurden von den positiven Events der Probe abgezogen. Für die *FACS™*-Analysen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde das *FACSCalibur™flow cytometer* der Firma Becton Dickinson verwendet.

2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay - *ELISA*

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* stellt eine Weiterentwicklung des 1966 von Wide und Porath vorgestellten *RIST (Radioimmunosorbent Techniques)* dar. Wurden die identifizierenden Antikörper bei Letzterem noch radioaktiv markiert, zeigt beim *ELISA* die Intensität des Farbumschlags durch eine enzymatische Reaktion die Konzentration des interessierenden Antigens an. Perlmann und Engval führten das Verfahren 1971 ein und setzten damit Maßstäbe. (Perlmann / Engval, 1971) Neben der wissenschaftlichen Forschung ist der *ELISA* auch aus der modernen klinischen Medizin, z.B. im Zusammenhang mit virologischen Untersuchungen, nicht mehr wegzudenken. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde für zwei Experimente das Prinzip des *Sandwich-ELISA* angewandt. Dabei wird der Boden der Reaktionsgefäße mit einem Antikörper gegen das interessierende lösliche Antigen beschichtet. Das Antigen bindet nun bei Zugabe an diesen Antikörper und wird damit am Boden des Gefäßes fixiert. Nun wird ein weiterer, ebenfalls an das Antigen bindender Antikörper, der vorher mit einem Enzym gekoppelt wurde, in das Reaktionsgefäß gegeben. Aus der jetzt bestehenden Bindung des Antigens von zwei Seiten ergibt sich die Bezeichnung *Sandwich-ELISA*. Wird nun das Substrat des gekoppelten Enzyms hinzugegeben, kommt es zu einem Farbumschlag, dessen Intensität mit der Menge an gebundenem Antigen am Boden des Reaktionsgefäßes korreliert. Nach Zugabe eines reaktionsbeendenden Agens, z.B. Schwefelsäure, kann die Extinktion der Lösung in einem *ELISA-Reader*, bei entsprechenden Wellenlängen, bestimmt und damit auf die Konzentration des Antigens in der Ursprungslösung geschlossen werden. Hierzu ist der Vergleich mit verschiedenen Standardkonzentrationen nötig, deren Extinktionen bei jedem Versuchsdurchlauf individuell mitbestimmt werden müssen. (Gan / Patel, 2013) Das jeweilige Protokoll zu den verwendeten Assays für IL2 und sIL2-R α findet sich im Anhang in den Abschnitten 9.2.4 und 9.2.5.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der Statistik-Software *R* in den Versionen 3.4 bis 3.6.1 (R-Core-Team, 2019) unter dem Betriebssystem Linux. Dazu wurden in erster Linie Funktionen des Basisumfangs von *R*, wie *mean()*, *sd()*, *median()*, *IQR()*, *t.test()*, *wilcox.test()*, *aov()*, *kruskal.test()*, *lm()*, *nls()*, *AIC()*, *cor()*, *cor.test()*, *lm()*, *plot()* und *boxplot()*, um Modifikationen durch den Autor ergänzt, genutzt. Außerdem wurden verschiedene Erweiterungspakete eingebunden. Mit der Funktion *Ski.Mack()* aus dem Paket *Skillings.Mack* in der Version 1.10 wurde der Skillings-Mack-Test als nicht-parametrischer Signifikanztest bei der Verlaufsbeurteilung verschiedener Zellpopulationen über den Behandlungszeitraum verwendet (Srisuradetchai, 2015). Zudem wurde zur Überprüfung der Varianzgleichheit von Datensätzen die Funktion *leveneTest()* aus dem Paket *car* in der Version 3.0-3 benutzt (Fox / Weisberg, 2019). Die Standardkurven zu den IL2- und sIL2-R α -ELISAs (Abschnitt 2.8 und 2.9) wurden mittels polynomischer Regression erstellt. In sämtlichen Ergebnistabellen sind jeweils *Mittelwert* und *Standardabweichung* sowie *Median* und *Interquartilsabstand (IQR)* angegeben. Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 zugrunde gelegt. Bei multipler (z.B. wiederholter Testung) erfolgte eine p-Wert-Adjustierung mittels *Bonferroni-Korrektur*. Eine besondere Herausforderung bei der Auswertung stellte die Datenstruktur dar. Wie in Tabelle 5 im Abschnitt 2.1.3 gezeigt, variierte die Anzahl der vorhandenen Proben innerhalb der Gruppen **NR** und **R**. Darüber hinaus zeigten viele der untersuchten Parameter eine deutliche Schiefe oder andersartige Abweichung von der Normalverteilung, die ja für zahlreiche parametrische Signifikanztests als Voraussetzung gilt. Schlussendlich wurde für die Verlaufsbeobachtung innerhalb der Gruppen der *Skillings-Mack-Test* (Chatfield / Mander, 2009) als Verallgemeinerung des *Friedmantests* bei fehlenden Beobachtungen, in Kombination mit dem *Wilcoxon-Rangwert* oder gepaarten *T-Test* unter *Bonferroni-Adjustierung* (Armstrong, 2014) als Post-hoc-Analyse, verwendet. Für den vollständigen Datensatz der Überprüfung von Veränderungen CD3⁺ Zellen in EDTA-Blut, wurde je nach vorliegender Voraussetzung die *ANOVA* für wiederholte Messungen (Park et al., 2009) oder bei Verletzung der Varianzgleichheit, der *Friedmantest* (Friedman, 1937) verwendet. Für den Vergleich der einzelnen Zellpopulationen zwischen den Patient*innen mit und ohne Rezidiv zu verschiedenen Zeitpunkten, wurde je nach Vorliegen einer Normalverteilung in den Gruppen entweder der *Wilcoxon-Rangwert* oder der *T-Test* für unverbundene Stichproben, wieder unter p-Wert-Adjustierung, verwendet. Der Vergleich von Normalkollektiv und Tumorpatient*innen erfolgte mittels *Kruskal-Wallis-Test* (Ostertagova et al., 2014) und anschließender Post-

hoc-Analyse. Für die Korrelation verschiedener Parameter wurden stets, neben dem *linearen Modell*, auch andere Regressionsmodelle, wie das *Polynomische* oder *Logarithmische* im Sinne eines *Best fit* getestet. Ergänzend wurden ROC-Analysen zu den untersuchten Daten mit dem R-Paket pROC erstellt (Metz, 1978; Robin et al., 2011).

2.5 Erstellung eines Normalkollektivs

2.5.1 Versuchsablauf

Zur Bildung der Referenzgruppe **N** (*Normal*) wurde 9 gesunden Proband*innen im Alter zwischen 25 und 58 Jahren Blut entnommen und analog zu den Proben der Studie bearbeitet. Zuvor wurden die Teilnehmer*innen umfassend aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Es wurden 4 Oberflächen-Marker (CD3, CD4, CD8 und CD25) unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Antikörper gefärbt und schließlich mittels *FACS™* analysiert. Dabei wurde bewusst eine zeitliche Verzögerung zwischen Entnahme und Verarbeitung der Proben in den Ablauf integriert, um die Vergleichbarkeit mit den Gruppen **NR** und **R** zu gewährleisten (Siehe Abschnitt 2.7). Als Probenmaterial dienten je 100 μ l EDTA-Vollblut für die Isotypen-Kontrolle und die tatsächliche Analyse. Die Proben wurden mittels *Lyse-Wash*-Protokoll (Abschnitt 9.2.2 im Anhang) prozessiert, mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und schließlich im *FACS™* -Gerät analysiert.

Tabelle 7: Antikörper zur Erstellung eines gesunden Normalkollektivs (N)

<i>Tube</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Farbstoff</i>	<i>Volumen (μl)</i>
Isotypen	Maus-IgG1	FITC	5
	Maus-IgG1	PE	5
	Maus-IgG1	PerCP	5
	Maus-IgG1	APC	1
Analyse	Anti-CD4	FITC	20
	Anti-CD8	PE	20
	Anti-CD3	PerCP	10
	Anti-CD25	APC	5

FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, PE: Phycoerythrin, PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein, APC: Allophycocyanin / Die angegebenen Volumina wurden unverdünnt den Antikörperpräparaten entnommen.

2.5.2 Gatingstrategie

Im Programm *CellQuest Pro*[®] erfolgte nach Abarbeitung des Protokolls die Auswertung mittels der in Abbildung 3 gezeigten Gating-Strategie. Zunächst wurden die Lymphozyten nach Größe (*FSC*) und Granularität (*SSC*) selektiert. Auf Grundlage dieser *Region 1* konnten dann alle weiteren Untergruppen definiert werden. So ergibt die serielle Kopplung von *Gate 1* und *Gate 2* den Besitz der T-Helferzellen mit CD25 während *Gate 1* und *Gate 13* in Kombination die Expression von CD25 auf den zytotoxischen T-Zellen darstellen (Abb. 3).

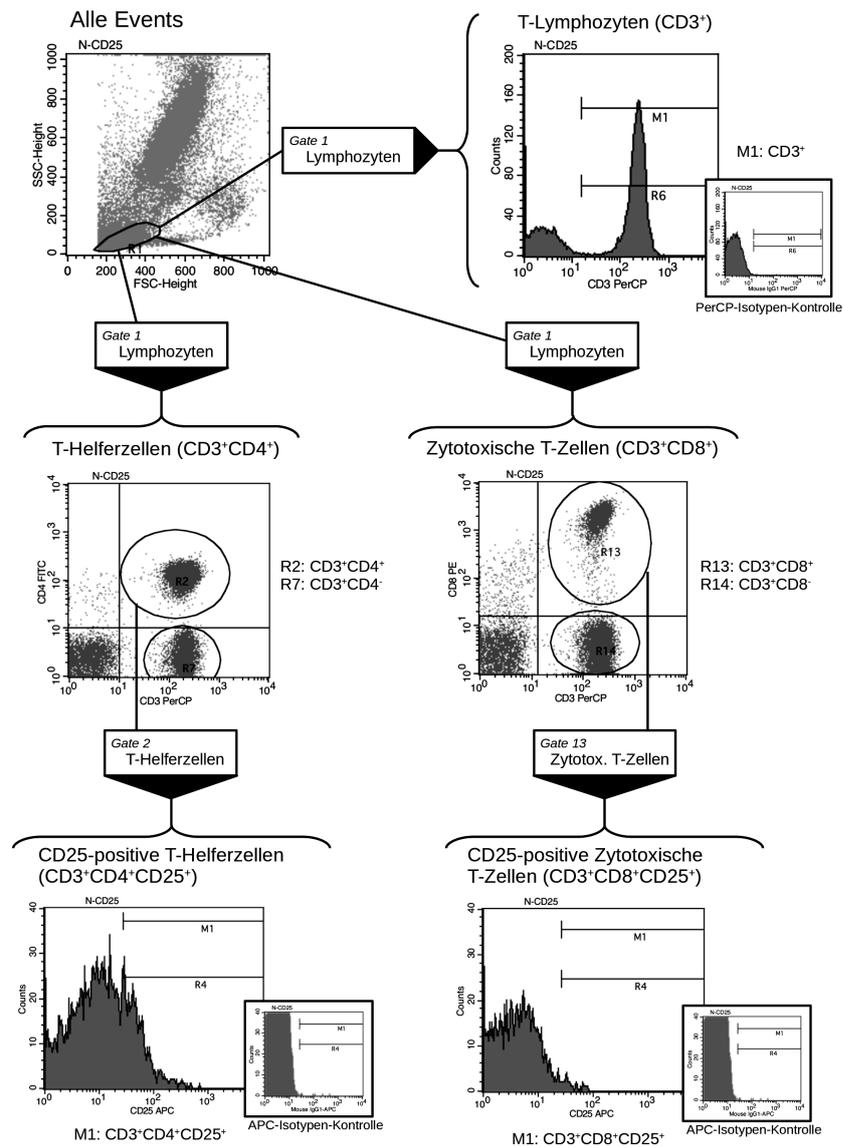


Abbildung 3: FACS™ -Gatingstrategie bei Erstellung des Normalkollektivs

Insgesamt wurden pro Tube 50000 Events registriert. Jedes Gate ist als Box mit schwarzem Dreieck dargestellt. Bei der seriellen Verwendung verschiedener Gates werden ausschließlich Events des vorhergehenden Gates einbezogen. (Bsp.: Gate 1: Alle Lymphozyten - Gate 1 und Gate 2: Alle Lymphozyten, die CD4⁺ sind) Bei Histogrammen ist in einem kleinen Kästchen jeweils die Isotypenkontrolle des entsprechenden Farbstoffes dargestellt. Eigene Abbildung.

2.6 FACS™ -Analyse des Studienkollektivs

2.6.1 Untersuchte Marker

In der *HNprädBio*-Studie wurden 14 verschiedene Marker der Zelloberfläche und des Intrazellulärraumes mittels entsprechender Fluoreszenz-markierter Antikörper untersucht. Da die Analyse aller dieser Antigene den Rahmen einer einzigen Dissertationsarbeit sprengen würde, wurden einzelne Marker für die folgenden Untersuchungen herausgegriffen. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die in der Studie verwendeten und die für diese Arbeit ausgewählten Antikörperkonstellationen.

Tabelle 8: Antikörper in den einzelnen FACS™ -Tubes

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CD94-FITC		o						o	o	o				
CD56-FITC			x	o	o	o	o							
CD4-FITC											o		x	
CD8-FITC														x
CD56-PE		o												
CD19-PE			x											
CD16-PE				o										
NKG2D-PE					o			o						
NKp30-PE						o			o					
NKp46-PE							o			o				
CD8-PE											o			
FoxP3-PE													x	x
CD3-PerCP		o	x	o	o	o	o	o	o	o	o		x	x
CD45-APC		o	x	o							o			
CD69-APC					o	o	o							
CD56-APC								o	o	o				
CD25-APC													x	x
Maus-IgG1-FITC	x											x		
Maus-IgG1-PE	x											x		
Maus-IgG1-PerCP	x											x		
Maus-IgG1-APC	x											x		

X: in dieser Arbeit analysiert, **O:** in dieser Arbeit nicht analysiert, *Pro Tube* konnten aus technischen Gründen vier verschiedene Antikörper verwendet werden. - So kommen einzelne Antikörper redundant an verschiedene Farbstoffe gebunden vor, um bei der Definition von Populationen möglichst viele Kombinationen zu ermöglichen. Für eine Probe wurden insgesamt 14 FACS™-Tubes mit jeweils 4 Antikörpern verwendet.

2.6.2 Gatingstrategien

Das erste Level der Lymphozytendifferenzierung stellt die Unterteilung in T-, B- und NK-Zellen dar. Diese Zellpopulationen werden durch 4 verschiedene Oberflächenmarker identifiziert. - CD45 kommt als Protein mit der höchsten Expressionsdichte auf sämtlichen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen vor. (Hermiston et al., 2003) Eine zusätzliche Expression von CD3 definiert die Population der T-Zellen (Abschnitt 1.3.2), während CD19 die Gruppe der B-Zellen ausweist. Dieses Antigen

hat z.B. im Zusammenhang mit der *Targeted Therapy* maligner Lymphome Bedeutung (K. Wang et al., 2012). Eine weitere Population, die sich bezogen auf *FSC* und *SSC* in der gleichen Region wie B- und T-Zellen findet, sind die Natürlichen Killerzellen (NK). Dabei handelt es sich um relativ große granulierte Lymphozyten, die in der Lage sind, infizierte und entartete Zellen zu erkennen und abzutöten. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche in unterschiedlichem Ausmaß *CD56*. Im Rahmen einer *FACS™* -Analyse können diese Zellen durch zusätzlichen Ausschluss der Expression von *CD3* und *CD19* von anderen Lymphozyten unterschieden werden. (Freud et al., 2017) Eine weitere Zellgruppe stellen die NKT-Zellen dar, die *CD56* und *CD3* in Kombination exprimieren (Mendes et al., 2000). Die *CD56⁺* Populationen werden im Detail in weiteren Dissertationsarbeiten zur *HNprädBio*-Studie auf ihren prognostischen Nutzen bzgl. *HNSCC* untersucht. Hier wird lediglich deren Expression im Verlauf der *RCTx* beschrieben, um bei der Untersuchung der *CD25*-Expression ein möglichst umfassendes Bild der Lymphozyten darstellen zu können.

Zunächst wurden die Zellen, ihrer Größe und Granularität gemäß, in einem *Scatterplot* angezeigt und die Lymphozyten in *Region 1* selektiert. Dann wurden im nächsten Schritt die *CD45⁺* Events ausgewählt und durch das Auftragen von *CD3* gegen *CD19* in T- und B-Zellen differenziert. Darüber hinaus wurden für die *CD45⁺* Events *CD3* und *CD56* gegeneinander aufgetragen und so die NK- und die NKT-Zellen selektiert. (Abb. 4)

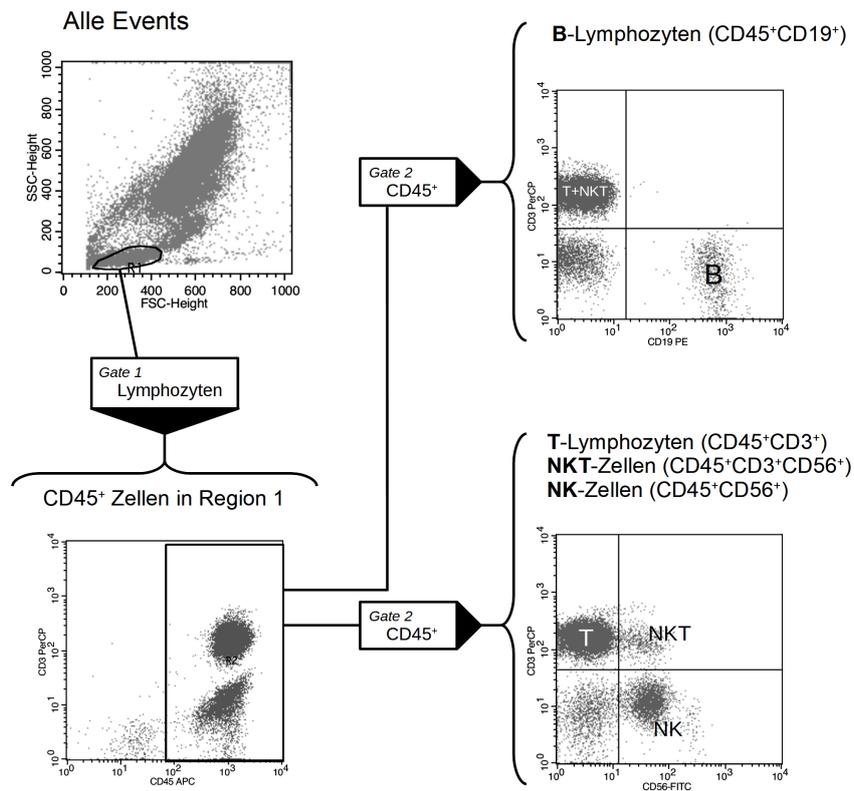


Abbildung 4: Gatingstrategie zur Analyse der T- und B-Lymphozyten sowie der NKT- und NK-Zellen

Insgesamt wurden pro Tube 50000 Events registriert. Jedes Gate ist als Box mit schwarzem Dreieck dargestellt. B: B-Lymphozyten, T: T-Lymphozyten, NK: Natürliche Killerzellen, NKT: Natürliche Killer-T-Zellen - Eigene Abbildung.

Analog erfolgte die Analyse der CD3⁺ Untergruppen. Hier wurden die 5 bereits vorgestellten Marker CD3, CD4, CD8, CD25 und FoxP3 ausgewählt um 6 verschiedene Subpopulationen, gemäß Abbildung 1 in Abschnitt 1.3.4, zu definieren. Die vollständige Aufschlüsselung der Gatingstrategie für T-Zellen, T_H, CD25⁺ T_H, T_C, CD25⁺ T_C und T_{reg} zeigt Abbildung 5.

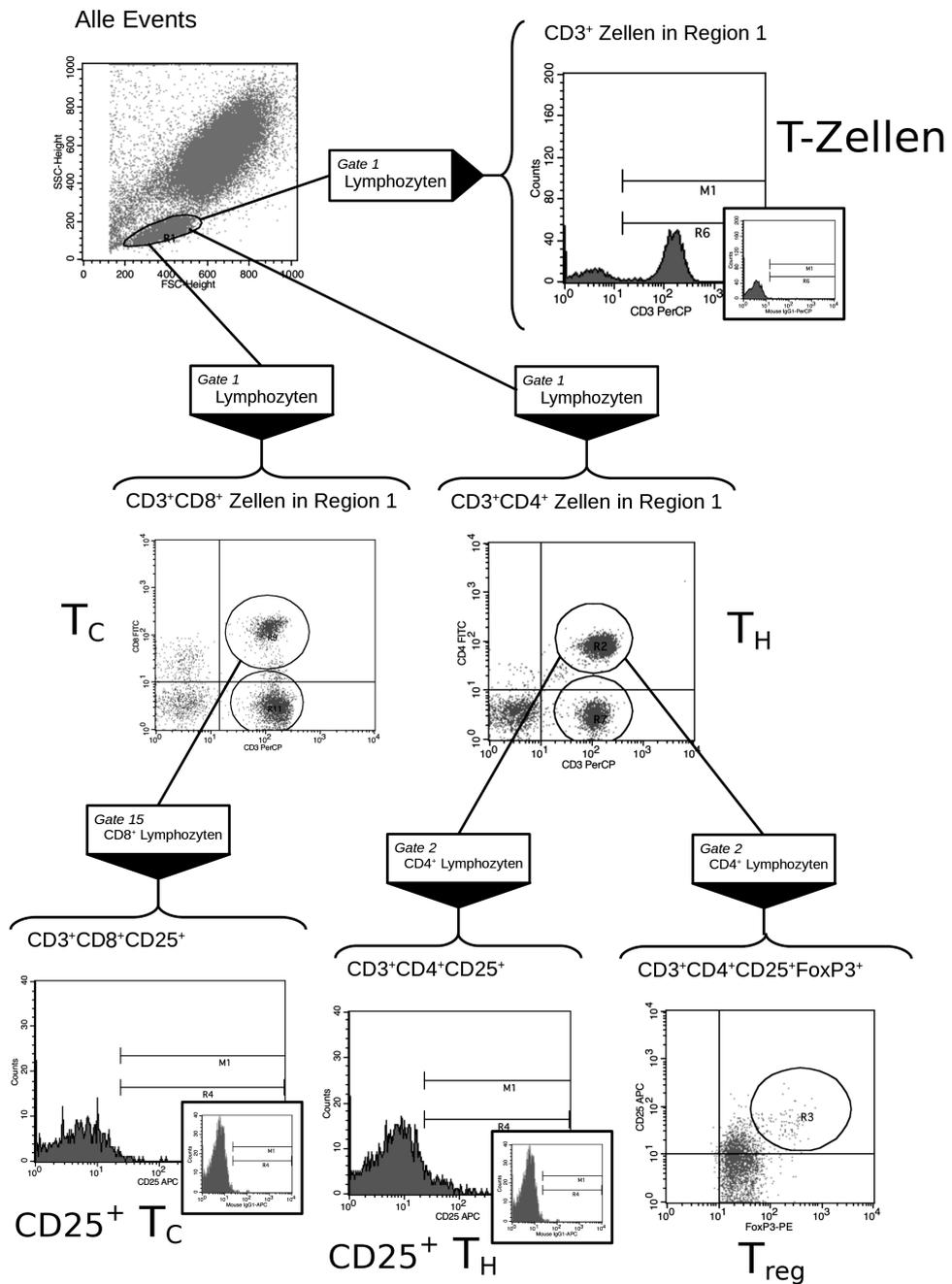


Abbildung 5: Gatingstrategie zur Analyse der CD3⁺ Lymphozytenpopulationen

Insgesamt wurden pro Tube 50000 Events registriert. Jedes Gate ist als Box mit schwarzem Dreieck dargestellt. Eigene Abbildung.

2.7 Veränderungen CD3⁺ Zellen über 3 Tage in EDTA-Blut

2.7.1 Versuchsbedingungen

Vier gesunden Proband*innen wurde, nach eingehender Aufklärung und schriftlicher Zustimmung, Blut abgenommen und in EDTA-Probenröhrchen der Firma *Sarstedt* für 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für die Lagerung wurden die gleichen lichtundurchlässigen Schachteln verwendet wie für den Versand der Originalproben. Kurz nach der Entnahme sowie nach weiteren 24 und 72 Stunden sollten die enthaltenen Lymphozyten mittels *FACS™* -Analyse auf die prozentualen Anteile der T-Zellen (CD3⁺), der T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺), der CD25-exprimierenden T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺CD25⁺) sowie der regulatorischen T-Zellen (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) überprüft werden. Dabei wurden die gleichen Antikörper und Reagenzien wie im Protokoll der *HNprädBio*-Studie verwendet. Die Menge der Reagenzien und Proben wurde, bezogen auf die in der Studie verwendeten Volumina, je auf 1/10 reduziert. Das vollständige Protokoll zum Versuch ist Abschnitt 9.2.3 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 9: Veränderung CD3⁺ Zellpopulationen in EDTA-Blut über 3 Tage - Verwendete *FACS™* -Antikörper

<i>Tube</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Farbstoff</i>	<i>Volumen (μl)</i>
Isotypen	Maus-IgG1	FITC	0,5
	Maus-IgG1	PerCP	0,5
	Maus-IgG1	APC	0,1
	Maus-IgG1	PE	0,5
Analyse	Anti-CD4	FITC	2
	Anti-CD3	PerCP	1
	Anti-CD25	APC	0,5
	Anti-FoxP3	PE	2

FITC: Fluorescein-Isothiocyant, PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein, APC: Allophycocyanin, die verwendeten Reagenzien wurden, bezogen auf die in der HNprädBio-Studie verwendeten Volumina, auf 1/10 reduziert.

Aus organisatorischen Gründen wurde die erste Analyse nicht direkt nach der Blutentnahme sondern durchschnittlich 3 Stunden später durchgeführt. Die 2. und 3. Analyse folgte im Mittel 27 und 75 Stunden nach der Blutentnahme.

2.7.2 Gatingstrategie

Im *Scatterplot* für alle Events wurden zunächst in der *Region 1* die Lymphozyten ausgewählt. Anschließend erfolgte hieraus die Selektion der T-Zellen ($CD3^+$) und der T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$) durch das *Gate 1*. Darüber hinaus wurden die T-Helferzellen durch *Gate 2* auf ihre Expression von CD25 und FoxP3 untersucht. Hieraus ergaben sich die Populationen der $CD25^+$ T-Helferzellen und der regulatorischen T-Zellen als deren Untergruppe. (Abb. 6)

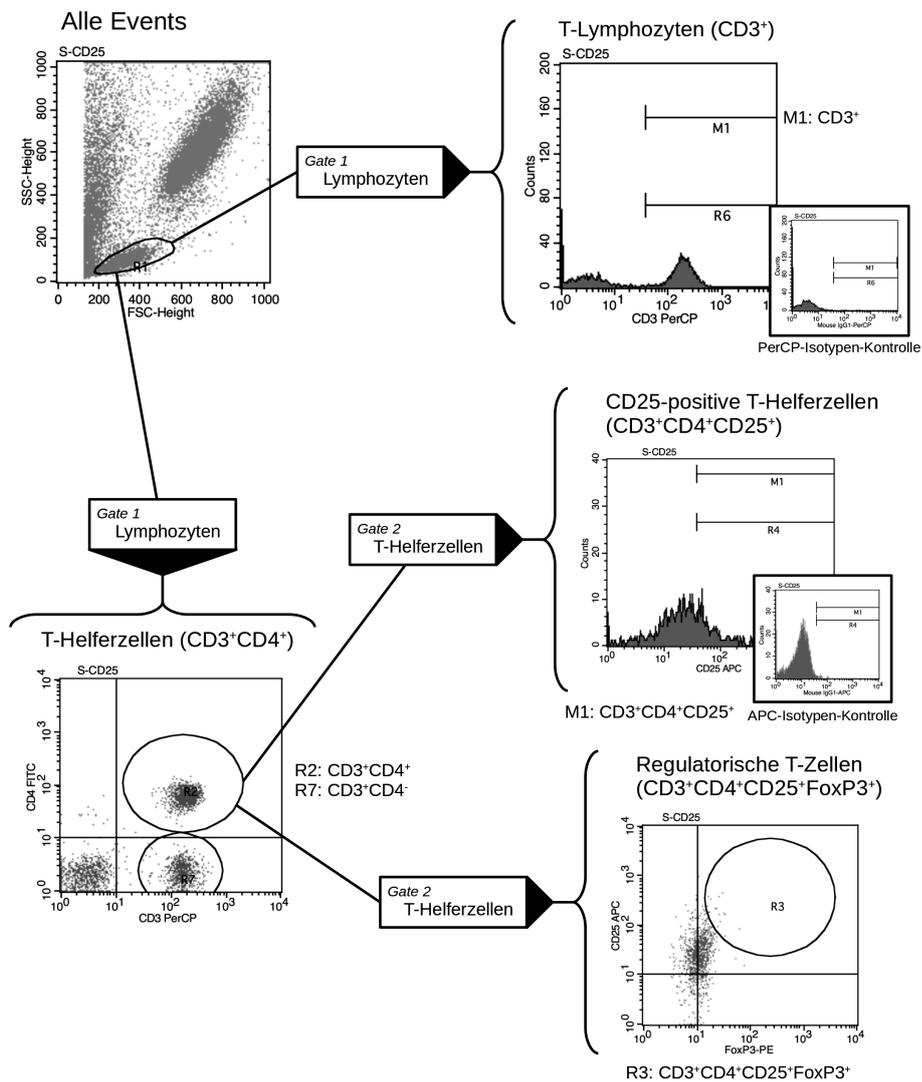


Abbildung 6: Gating-Strategie bei Überprüfung der Veränderung CD3⁺ Zellpopulationen in EDTA-Blut über 3 Tage
Pro Tube wurden im Mittel 20000 Events registriert. Jedes Gate ist als Box mit schwarzem Dreieck dargestellt. Eigene Abbildung.

2.8 IL2 in Blutplasma

Für die Bestimmung der Konzentration des IL2 im Plasma wurde der Assay *ELISA OptEIA™ Human IL-2* der Firma *BD* verwendet. Hier wird mittels Antikörpermarkierung und enzymatischer Reaktion ein Farbumschlag hervorgerufen (Abschn. 2.3). Über die Höhe der Extinktion, d.h. der Absorption des durch die Lösung strahlenden Lichtes einer Wellenlänge von 450 und 570nm, kann auf die Konzentration des IL2 in der Probe geschlossen werden. Aufgrund der begrenzten Anzahl von 96 Reaktionsgefäßen (*Wells*) pro Platte und des begrenzten Probenmaterials war es nötig, einzelne Proben aus den beiden Kollektiven **NR** und **R** für den Versuch auszuwählen. Dabei sollte möglichst der gesamte Beobachtungszeitraum erfasst werden. So wurden vier Proband*innen aus der Gruppe **R** ausgewählt und vier Proband*innen der Gruppe **NR** im Sinne eines *Matchings* zugeordnet. Maßgabe war, dass möglichst Proben aller Analysezeitpunkte vorhanden waren und der Anteil der T-Zellen eines Probenpaares zum Zeitpunkt *R0* übereinstimmte. So konnte ausgeschlossen werden, dass eine möglicherweise erhöhte Konzentration von IL2 lediglich auf eine erhöhte Anzahl an IL2-sezernierenden Zellen zurückzuführen wäre und nicht auf eine verstärkte Sekretion. Tabelle 10 gibt das *Matching* der Proben wieder.

Tabelle 10: Matching IL2-ELISA

<i>Match</i>	<i>CD3⁺ zum Zeitpunkt R0</i>	<i>R / NR</i>
R IL2-001-R	5588	
NR IL2-001-NR	5475	1,02
R IL2-002-R	2920	
NR IL2-002-NR	3197	0,91
R IL2-003-R	10776	
NR IL2-003-NR	11224	0,96
R IL2-004-R	4432	
NR IL2-004-NR	4189	1,06

*R: Proband*in aus der Gruppe der Patient*innen mit Rezidiv, NR: Proband*in aus der Gruppe der Patient*innen ohne Rezidiv, Es wurden je 50000 Events pro Probe analysiert. Das Verhältnis R / NR gibt die Übereinstimmung der einander zugeordneten Proben bzgl. der absoluten Anzahl der CD3⁺ Lymphozyten an. 1,0 würde einen exakt gleichen Anteil CD3-positiver Events bedeuten. Für die ELISA-Experimente wurden den Patient*innen, der Übersichtlichkeit halber, neue IDs (z.B. IL2-001-NR) zugeteilt.*

Die Proben wurden schließlich aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen, weiter auf Eis gekühlt und unmittelbar verarbeitet. Das Protokoll des *ELISA* erstreckt sich über 2 Versuchstage, da zunächst eine Vorbereitung der 96-Wellplatte mit *Coating Buffer* und *Capture Antibody* notwendig ist. Nach diesem Schritt wurde die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Standardreihe mit rekombinantem humanen IL2 erstellt. Die Verdünnung erfolgte ausgehend von einem Stock mit 500 pg/ml mittels *Assay diluent* (500ml *PBS* + 50ml *FCS*). So ergab sich eine Verdünnungsreihe mit 500 - 250 - 125 - 62,5 - 31,3 - 15,6 und 7,8 pg/ml. Reiner *Assay diluent* ohne IL2 wurde als Leerprobe (*Blank*) verwendet. Neben den Proben der Gruppen **NR** und **R** wurde auch Plasma eines gesunden Probanden, nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis, als Referenz ausgewertet (**G**). Nach einem Waschschrift mit *Wash-Buffer* wurde jedes Well entsprechend Abbildung 29 **A** im Anhang, Abschnitt 9.2.4, mit Standard oder Probe befüllt. Die Platte wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und nach weiteren Waschschriften mit *Working Detector* versehen. Schließlich erfolgten

7 Waschschritte und die Zugabe von *Substrate Solution* in jedes Well mit nachfolgender Inkubation im Dunkeln. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mittels *Stop Solution* beendet und die Platte im *ELISA Reader* bei 450 und 570 nm Wellenlänge eingelesen. Die Auswertung erfolgte mittels der Statistiksoftware *R*. Das vollständige Versuchsprotokoll ist dem Abschnitt 9.2.4 im Anhang zu entnehmen. Bei der Auswertung fiel auf, dass die Konzentration des IL2 für fast alle Proben unter der Detektionsschwelle des Assays lag. Die Verdünnung von Plasma in *Assay diluent* wurde daraufhin von 1/4 auf 1/2 verringert und das Experiment wiederholt. Im zweiten Durchlauf wurde zudem in zwei Wells zu dem Plasma des gesunden Probanden (G) 1:1 Standard der Konzentration 500 pg/ml gegeben, so dass sich rechnerisch eine Konzentration von 250 pg/ml ergibt. (29 B im Anhang, Abschnitt 9.2.4) Der weitere Ablauf erfolgte wie beim ersten Versuch. Die Standardkurven für den Bereich zwischen 0 und 125 pg/ml für beide Versuche zeigt Abbildung 7.

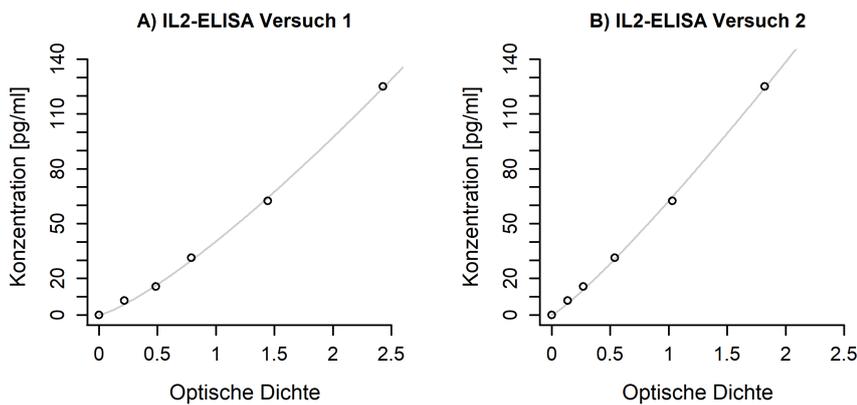


Abbildung 7: Standardkurven IL2-ELISA

A) Erster Versuchsdurchlauf, $R^2=0,99$ / **B)** Zweiter Versuchsdurchlauf, $R^2=0,99$; Für beide Versuchsdurchläufe stellte sich eine polynomische Regression als am besten passendes Modell heraus. Eigene Abbildung.

2.9 sIL2-R α in Blutplasma

Es wurde das Plattenschema des ersten Durchlaufs des IL2-ELISAs (Abb. 29 A, Abschnitt 9.2.4 im Anhang) beibehalten. Entsprechend wurden Plasmaproben derselben Patient*innen verwendet, um eine direkte Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Abbildung 8 zeigt die Standardkurve des IL2-R α -ELISAs für die Konzentrationen bis 1250 pg/ml. Das vollständige Versuchsprotokoll ist dem Abschnitt 9.2.5 im Anhang zu entnehmen.

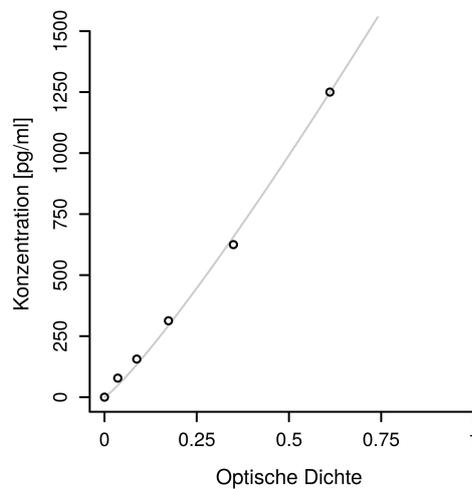


Abbildung 8: Standardkurve Interleukin sIL2-R α -ELISA

$R^2=0,99$ / Für den Kurvenverlauf stellte sich eine polynomische Regression als am besten passendes Modell heraus. Eigene Abbildung.

3 Ergebnisse

3.1 Erstellung eines Normalkollektivs

Für eine sinnvolle Einordnung der in *FACSTM*-Analysen von *HNSCC*-Patient*innen (NR, R) erhobenen Daten ist ein Vergleich mit den Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut gesunder Proband*innen nötig. Die ausschließliche Verwendung von Referenzwerttabellen oder den Daten der Kontrollgruppen anderer Publikationen verbietet sich hier angesichts vieler denkbarer Fehlerquellen bei Färbung und Lyse sowie Unterschieden in den Bearbeitungsprotokollen.

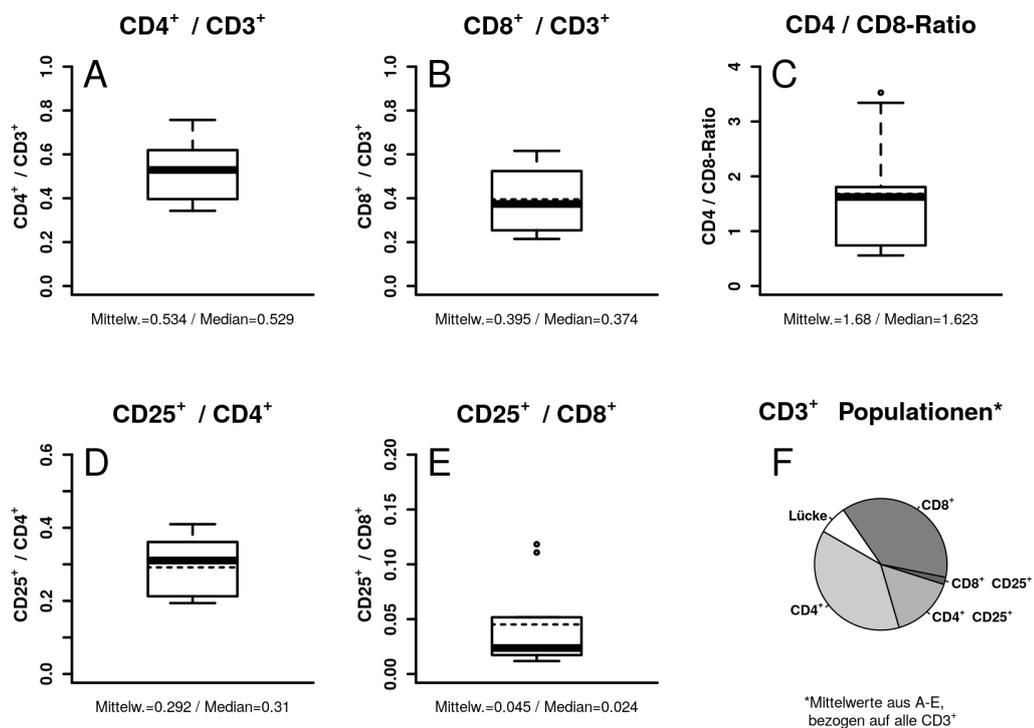


Abbildung 9: $CD3^+$ Zellpopulationen eines gesunden Normalkollektivs (N)

A) Anteil der T_H an allen T-Zellen, **B)** Anteil der zytotoxischen T-Zellen an allen T-Zellen, **D)** Anteil der $CD25^+$ Zellen an allen T_H , **E)** Anteil der $CD25^+$ Zellen an allen zytotoxischen T-Zellen, **C)** $CD4/CD8$ -Ratio, die dicke horizontale Linie in einer Box stellt den Median, die dünne gestrichelte Linie, den Mittelwert dar, **F)** Mittelwerte aus **A-E** bezogen auf alle $CD3^+$, die Lücke ergibt sich durch den Bezug auf 100%. ($n=9$) Eigene Abbildung.

Die Ergebnisse für das Normalkollektiv sind in Tabelle 11 aufgeführt. Im Folgenden wird jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung in eckigen Klammern angegeben. Der Anteil der $CD4$ -positiven Zellen an den T-Zellen lag bei durch-

schnittlich 53,4% [15,9%]. Von diesen CD4⁺ Lymphozyten exprimierten im Mittel 29,2% [8,3%] CD25. Die CD8⁺ Zellen machten durchschnittlich 39,5% [14,9%] aller T-Zellen aus, wobei lediglich 4,5% [4,1%] zusätzlich CD25 auf ihrer Oberfläche präsentierten. Das mittlere Verhältnis der CD4⁺ zu den CD8⁺ T-Lymphozyten (*CD4/CD8-Ratio*) lag bei 1,68 [1,09]. Bis auf die CD25⁺CD8⁺ Population und deren *Mean Fluorescence Intensity* (MFI_{CD25}) kann für alle Werte eine Normalverteilung angenommen werden ($p > 0,05$ im *Shapiro-Wilk-Test*). Der Anteil CD25⁺CD4⁺ Lymphozyten korrelierte positiv mit deren *Mean Fluorescence Intensity* von APC-markiertem CD25 ($r = 0,83$ mit $KI_{95\%}[0,372; 0,963]$), während diese Beziehung zwischen dem Anteil der CD25⁺CD8⁺ Zellen und deren MFI_{CD25} nicht statistisch signifikant war ($r = 0,48$ mit $KI_{95\%}[-0,265; 0,869]$).

Tabelle 11: CD3⁺ Zellpopulationen eines gesunden Normalkollektivs (N)

<i>Population</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabw.</i>	<i>Median</i>	<i>IQR</i>	<i>NV</i>
CD4 ⁺ /CD3 ⁺	0,534	0,159	0,529	0,223	0,213
CD25 ⁺ /CD4 ⁺	0,292	0,083	0,310	0,149	0,199
MFI_{CD25} auf CD4 ⁺	19,0	4,87	18,9	5,27	0,723
CD8 ⁺ /CD3 ⁺	0,395	0,149	0,374	0,270	0,460
CD25 ⁺ /CD8 ⁺	0,045	0,041	0,024	0,035	0,008
MFI_{CD25} auf CD8 ⁺	1,47	1,67	0,80	1,05	0,010
CD4/CD8-Ratio	1,68	1,09	1,62	1,06	0,086

IQR: Interquartilsabstand, NV: p-Wert des Shapiro-Wilk-Tests zu dem jeweiligen Parameter, bei einem Wert $> 0,05$ ist die Nullhypothese einer Normalverteilung beizubehalten, CD4⁺/CD3⁺: Anteil der T-Helferzellen an den T-Zellen, CD25⁺/CD4⁺: Anteil CD25⁺ Zellen an den T-Helferzellen, CD8⁺/CD3⁺: Anteil der zytotoxischen T-Zellen an den T-Zellen, CD25⁺/CD8⁺: Anteil CD25⁺ Zellen an den zytotoxischen T-Zellen, MFI_{CD25} : Mean fluorescence intensity von CD25 auf den Zellen der entsprechenden Population

3.2 **FACS™ -Analyse der Gruppen NR und R**

Analog zum Normalkollektiv werden im Folgenden die Ergebnisse der **FACS™** -Analysen zu den beiden Studienkollektiven **NR** und **R** wiedergegeben. Die Veränderungen in verzweigten Zellpopulationen, wie in denen der T-Zellen, sind er-

wartungsgemäß komplex. In den Abbildungen 10-14 wird in Form von Boxplots zunächst ein Überblick über die Alterationen im Verlauf der RCTx in Form von *Boxplots* gegeben, bevor tieferegehende Analysen der zugrundeliegenden Mechanismen dargestellt werden. Es wird immer der Anteil einer Zellgruppe an der jeweils übergeordneten Population angegeben. Links finden sich in den Abbildungen die Ergebnisse der Gruppe NR, rechts die der Gruppe R. Weiterhin werden, falls nicht anders ausgezeichnet, Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen in eckigen Klammern angegeben.

T-Lymphozyten (CD45⁺CD3⁺)

(Abb. 10 A) Bei den Patient*innen ohne Rezidiv nahm der Anteil der T-Lymphozyten an den CD45⁺ Zellen in *Region 1* nach Abschluss der RCTx von durchschnittlich 74,1% [12,5%] auf 68,2% [13,4%] ab ($p < 0,001$). Bei den Rezidivpatient*innen war die gleiche Tendenz erkennbar (72% [11,2%] auf 63,5% [13,6%]). Statistisch signifikant war die Reduktion der CD3⁺ Zellen hier jedoch erst zum Zeitpunkt R5 (57,9% [14,5%] gegenüber 72% [11,2%]) zum Zeitpunkt R0 ($p < 0,01$).

Natürliche Killerzellen (CD45⁺CD3⁻CD56⁺)

(Abb. 10 B) Zwischen den Zeitpunkten R0 und R3 nahm der durchschnittliche Anteil der NK an den CD45⁺ Zellen in *Region 1* bei den Patient*innen ohne Rezidiv signifikant von 11% [8,2%] auf 17,4% [9,7%] zu ($p < 0,05$). In der Gruppe R war im Verlauf der RCTx ebenfalls die Tendenz einer Zunahme zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch lediglich zwischen R0 mit 11,4% [7%] und R5 mit 20,5% [10%].

Auch in der Gruppe R war im Verlauf der RCTx eine Zunahme zu erkennen. Diese war hier bereits zwischen R0 (11,4% [7%]) und R2 (17,3% [10,2%]) signifikant ($p < 0,05$).

B-Lymphozyten (CD45⁺CD19⁺)

(Abb. 10 C) In beiden Gruppen nahm der Mittelwert des Anteils der B-Lymphozyten an den CD45⁺ Events in *Region 1* zwischen R0 und R1 ab. Bei den Patient*innen ohne Rezidiv war diese Veränderung signifikant (8,8% [4,9%] auf 4,1% [3,2%], $p < 0,001$), während bei der Gruppe R lediglich eine Tendenz erkennbar wurde (12% [8,5%] auf 9,6% [15,3%]). Nach der RCTx nahm der Anteil der B-Lymphozyten dann in beiden Gruppen bis zum Zeitpunkt R4 bzw. R5 wieder zu ($p < 0,01$).

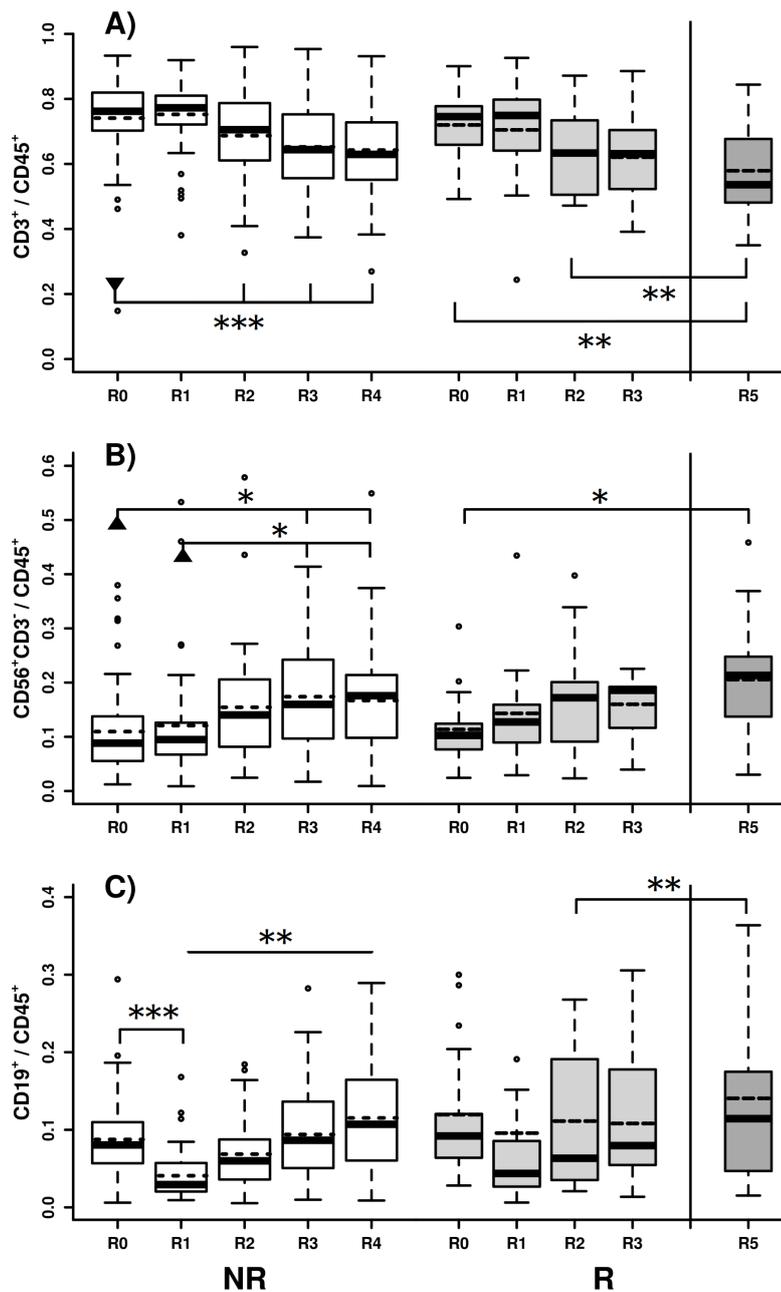


Abbildung 10: CD45⁺ Populationen in Region 1

A) Anteil der T-Lymphozyten an allen CD45⁺ Events in Region 1, **B)** Anteil der Natürlichen Killerzellen an allen CD45⁺ Events in Region 1, **C)** Anteil der B-Lymphozyten an allen CD45⁺ Events in Region 1, **NR:** Patient*innen ohne Rezidiv, **R:** Patient*innen mit Rezidiv / * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ - Eigene Abbildung.

CD4⁺ T-Lymphozyten (CD3⁺CD4⁺)

(Abb. 11 A) Sowohl in der Gruppe NR als auch in R kam es zwischen den Zeitpunkten R0 und R2 im Verlauf der RCTx zu einer signifikanten Abnahme des Anteils CD4⁺ Zellen (T-Helferzellen) an den CD3⁺ Zellen (NR: 59,4% [16,3%] → 40,2% [15,2%], $p < 0,001$ / R: 61,6% [19,1%] → 42,6% [20,1%], $p < 0,05$).

CD25⁺ T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺CD25⁺)

(Abb. 11 B) Bei den Patient*innen ohne Rezidiv zeigte sich im Verlauf des *Follow-up* zwischen R1 und R4 eine Zunahme der CD25⁺ T_H (16,1% [9,7%] → 26,8% [17,0%], $p < 0,05$). Bei den Rezidivpatient*innen hingegen war diese Tendenz nicht zu erkennen. Hier blieb der Anteil der CD25⁺ T_H im Vergleich zu den Patient*innen ohne Rezidiv nach der RCTx auf einem relativ hohen Niveau stabil (Schwankung des Mittelwertes zwischen 29,9% [25,7%] und 39,0% [16,7%] zwischen R1 und R5). Der Vergleich zwischen NR und R bzgl. der CD25-Expression auf T_H wird in Abschnitt 3.3 angestellt.

Regulatorische T-Zellen (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)

(Abb. 11 C) Der Anteil der T_{reg} an den CD4⁺ T-Lymphozyten nahm zwischen den Zeitpunkten R1 und R2 bei den Patient*innen ohne Rezidiv signifikant von 5,7% [2,7%] auf 8,7% [3,8%] zu ($p < 0,001$). Bei den Rezidivpatient*innen war diese Tendenz nicht zu erkennen. Auch der Vergleich zwischen NR und R bzgl. dieser Population findet sich in Abschnitt 3.3.

CD8⁺ T-Lymphozyten (CD3⁺CD8⁺)

(Abb. 12 A) Bei den Patient*innen ohne Rezidiv kam es im Verlauf der RCTx (R0 → R2) zu einem Anstieg des Anteils der CD8⁺ Zellen an den T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) von durchschnittlich 27,1% [14,2%] auf 37,4% [18,3%] ($p < 0,01$). Auch bei den Rezidivpatient*innen stieg diese Zellpopulation signifikant von 20,9% [12,9%] auf 34,3% [17,8%] an (R0 → R2, $p < 0,05$).

CD25⁺ zytotoxische T-Zellen (CD3⁺CD8⁺CD25⁺)

(Abb. 12 B) Weder bei den Patient*innen mit noch bei den Patient*innen ohne Rezidiv waren für den Anteil der CD25⁺ zytotoxischen T-Zellen signifikante Veränderungen im Verlauf der Behandlung und des *Follow-up* zu erkennen. Zu den meisten Zeitpunkten unterlag die Verteilung der Werte einer deutlichen Schiefe mit teilweise massiven Differenzen von Mittelwert und Median. Abschnitt 3.3 beinhaltet wieder einen Vergleich zwischen NR und R.

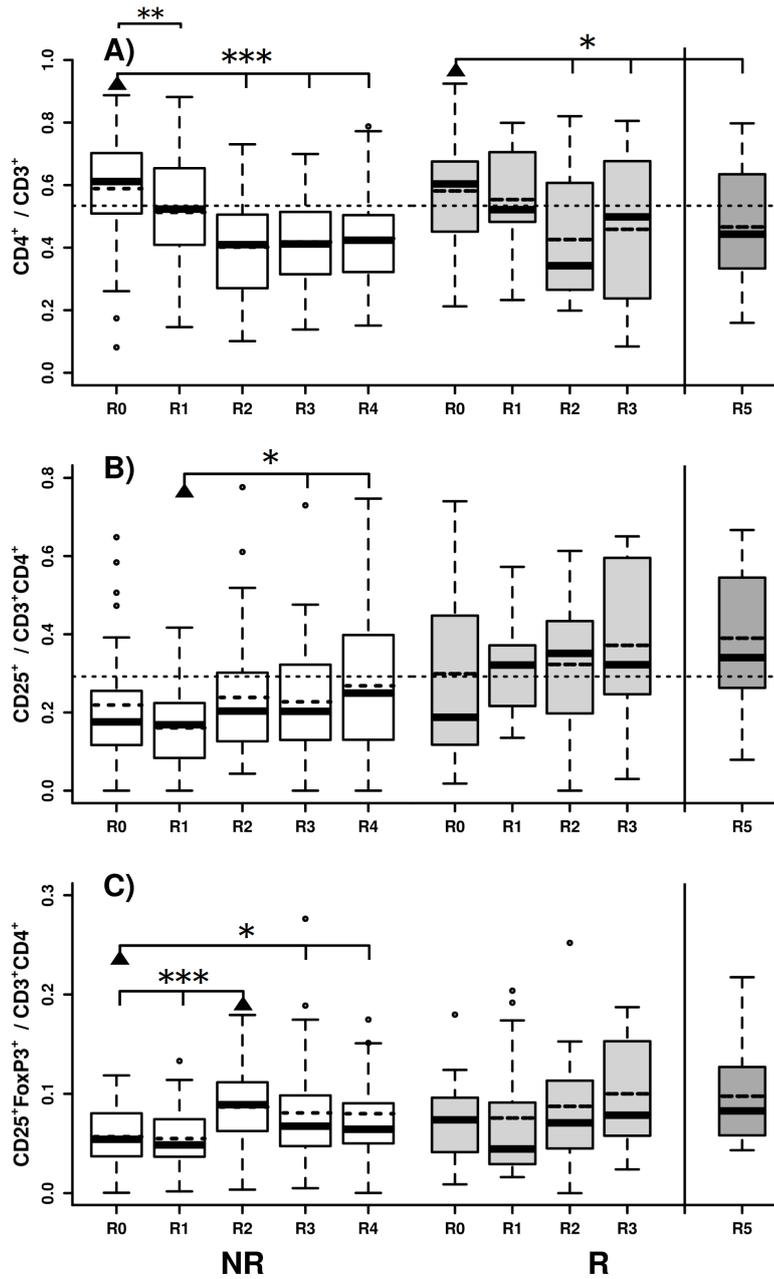


Abbildung 11: CD3⁺ Populationen in Region 1 - Teil 1

A) Anteil der T_H an den T-Zellen, **B)** Anteil der $CD25^+$ Zellen an den T_H , **C)** Anteil der T_{reg} an den T_H , **NR:** Patient*innen ohne Rezidiv, **R:** Patient*innen mit Rezidiv, die gestrichelte horizontale Linie markiert jeweils den Mittelwert des Normalkollektivs (N) / * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ - Eigene Abbildung.

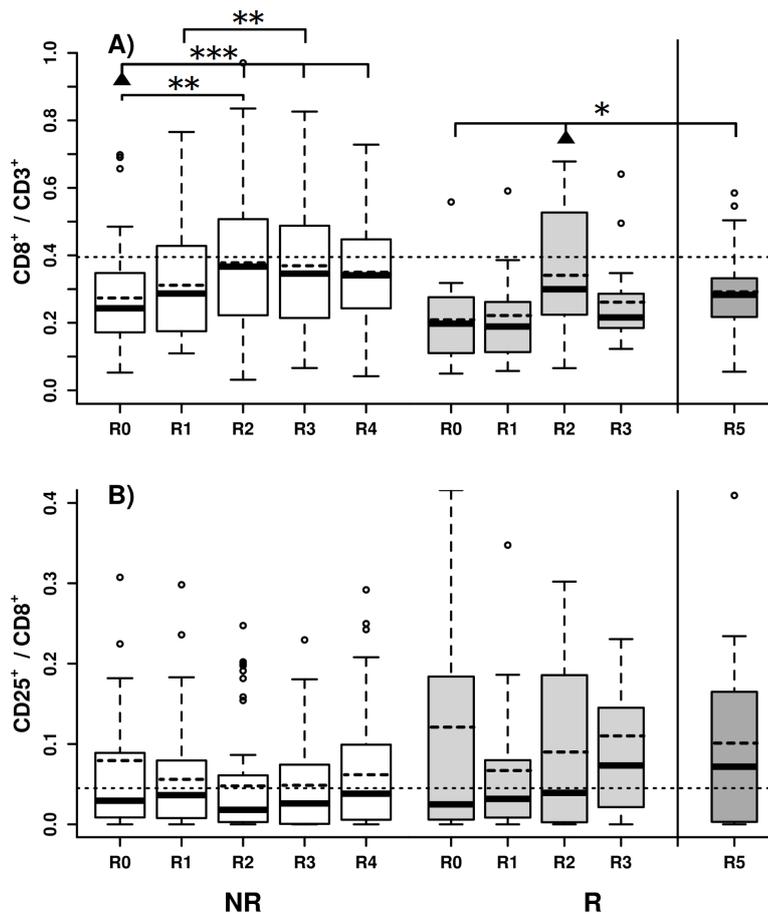


Abbildung 12: CD3⁺ Populationen in Region 1 - Teil 2

A) Anteil der T_C an den T-Zellen, **B)** Anteil der CD25⁺ Zellen an den T_C, **NR:** Patient*innen ohne Rezidiv, **R:** Patient*innen mit Rezidiv / * p < 0,05 / ** p < 0,01 / *** p < 0,001 - Eigene Abbildung.

CD4/CD8-Ratio

(Abb. 13) Das durchschnittliche Verhältnis der CD4⁺ zu den CD8⁺ T-Lymphozyten (*CD4/CD8-Ratio*) nahm in beiden Gruppen im Verlauf der RCTx signifikant ab. (NR: R0 → R3 von 2,95 [1,99] auf 1,52 [1,12] / R: R0 → R2 von 4,26 [3,27] auf 2,2 [3,15])

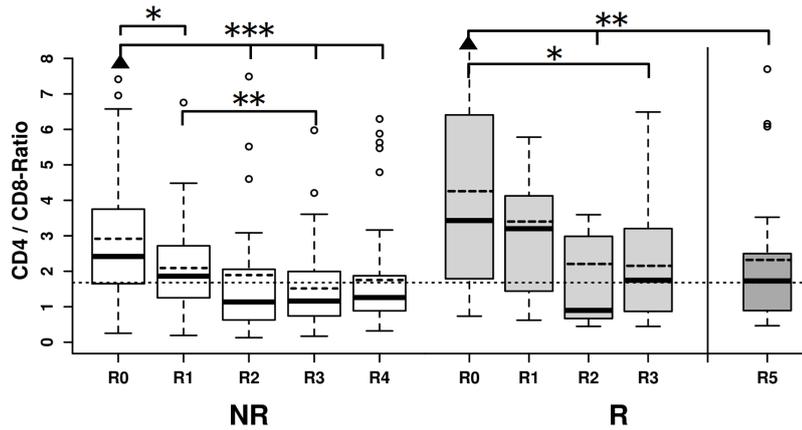


Abbildung 13: CD4/CD8-Ratio

*CD4/CD8-Ratio, die dünne gestrichelte Linie markiert den Mittelwert des Normalkollektivs, NR: Patient*innen ohne Rezidiv, R: Patient*innen mit Rezidiv / * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ - Eigene Abbildung.*

NKT-Zellen (CD45⁺CD3⁺CD56⁺)

(Abb. 14) Da die Verteilung der NKT-Zellen eine deutliche Schiefe aufwies, wird im Folgenden statt Mittelwert und Standardabweichung, Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Die übrigen Lage- und Streuungsparameter sind der Tabelle 22 im Abschnitt 9.4 des Anhangs zu entnehmen. Der Anteil der NKT-Zellen an den CD45⁺CD3⁺ Zellen stieg bei den Patient*innen ohne Rezidiv zwischen R0 und den folgenden Analysezeitpunkten an (R0 5% [6,7%] → R1 7,5% [8,9%], $p < 0,01$). Bei den Rezidivpatient*innen war diese Tendenz mit einem Anstieg von median 3,7% [3,7%] auf 7,4% [7,9%] ebenfalls zu erkennen, jedoch nicht statistisch signifikant.

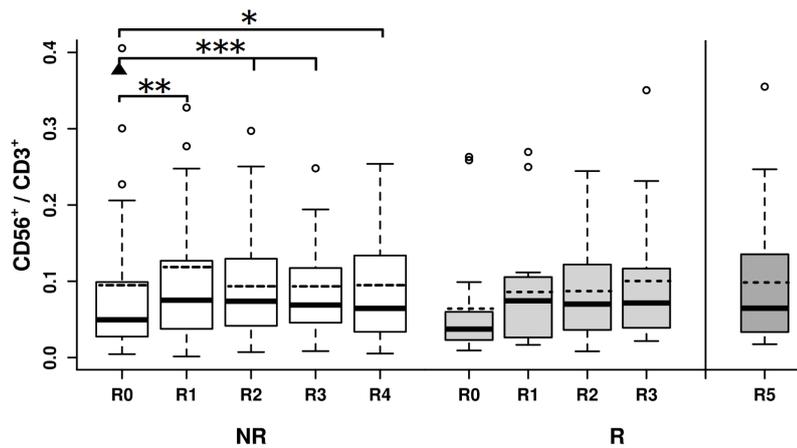


Abbildung 14: NKT-Zellen

Anteil der NKT-Zellen an den $CD3^+$ Zellen in Region 1, **NR**: Patient*innen ohne Rezidiv, **R**: Patient*innen mit Rezidiv / * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ - Eigene Abbildung.

Korrelationsanalysen CD25-positiver Lymphozytenpopulationen

Das von Feinerman et al., 2010 vorgeschlagene Modell zur Interaktion $CD25^+$ T-Lymphozyten legt eine tiefere Betrachtung der entsprechenden Subpopulationen in den Kollektiven **NR** und **R** nahe. In der folgenden Analyse werden die regulatorischen T-Zellen als Untergruppe der $CD25^+CD4^+$ T-Lymphozyten aufgefasst und auf diese Population bezogen angegeben. Zum besseren Verständnis der weiteren Ausführungen gibt Abbildung 15 die in Abschnitt 1.3 vorgestellten T-Zelluntergruppen als Mengendiagramm wieder. Der Anteil der $CD25^+$ Zellen sowohl an T_H als auch an T_C wird für beide Gruppen in Abbildung 16 mit dem Anteil der T_{reg} an den $CD25$ -exprimierenden $CD4^+$ Zellen korreliert. Bezogen auf das Flächendiagramm bedeutet dies, dass die Korrelation des Verhältnisses der Flächen $F:D$ mit dem Verhältnis der Flächen $D:B$ und $E:C$ untersucht wird. Dabei gilt für die Gruppe **R**, dass der Anteil der T_{reg} an den $CD25^+CD4^+$ T-Zellen ($F:D$) mittelstark bis schwach negativ ($-0,67 \leq r \leq -0,42$) mit dem von $CD25^+CD4^+$ Zellen zu allen T-Helferzellen ($D:B$) korreliert. Für den Anteil der T_{reg} an den $CD25^+CD4^+$ T-Lymphozyten, korreliert mit dem Anteil der $CD25^+$ zytotoxischen T-Zellen ($F:D \sim E:C$), ergab sich bei den Patient*innen ohne Rezidiv für alle Zeitpunkte ein schwach negativer Zusammenhang ($-0,47 \leq r \leq -0,39$).

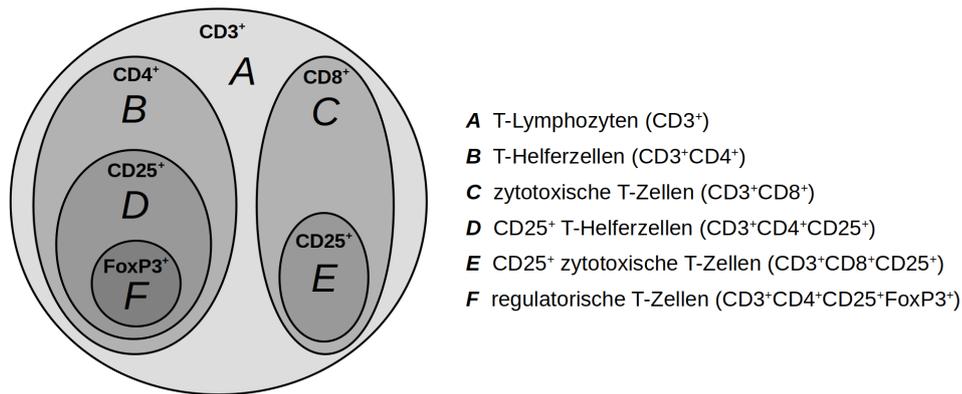


Abbildung 15: Darstellung CD3⁺ Zellpopulationen als Mengendiagramm

Jede Fläche (von außen nach innen dunkler werdende Grautöne) steht für eine Subpopulation **A-F**, die durch die Expression des entsprechenden Markers definiert wird. Die Marker kumulieren von außen nach innen, so dass z.B. Population **D** die Marker CD3, CD4 und CD25, nicht jedoch FoxP3 exprimiert. FoxP3 wird zusätzlich zu CD3, CD4 und CD25 erst von der Subpopulation **F** exprimiert. Es gilt $F \subseteq D \subseteq B \subseteq A$ und $E \subseteq C \subseteq A$ - Eigene Abbildung.

Das 95%-Konfidenzintervall überspannte dabei für keinen Korrelationskoeffizienten in der Gruppe **NR** den Wert 0. In der Gruppe der Patient*innen mit Rezidiv zeigte sich für die genannten Verhältnisse eine ähnliche Korrelation. Zu den Zeitpunkten *R0* und *R1* beinhaltete das 95%-Konfidenzintervall jedoch den Wert 0, so dass diese Korrelation, womöglich aufgrund der zu geringen Stichprobengröße, nicht als signifikant angesehen werden kann. Ab Zeitpunkt *R2* war die negative Korrelation analog zur Gruppe **NR** dann auch für die Rezidivpatient*innen signifikant. Das logarithmische und das lineare Modell entsprachen am besten dem Zusammenhang zwischen den T_{reg} und den anderen CD25⁺ Populationen (Höchste R^2 bzw. niedrigste *AIC*). Insgesamt ist festzustellen, dass ein größerer Anteil an T_{reg} mit einem geringeren Anteil an sonstigen CD25⁺ Populationen einhergeht und umgekehrt. Abbildung 17 stellt diesen Zusammenhang noch einmal für jeden/jede einzelnen/einzelne Patient*in repräsentativ zum Zeitpunkt *R2* dar. Die Patient*innen sind dabei vertikal nach dem Verhältnis der T_{reg} zu den CD25⁺ T-Helferzellen (**F:D** in Abb. 15) sortiert. Mit fallendem Anteil der T_{reg} steigt tendenziell die Expression von CD25 sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Lymphozyten. Das gilt sowohl für Patient*innen mit als auch für Patient*innen ohne Rezidiv. Die schwache bis mittelstarke Korrelation zeigt, dass der Grad der CD25-Expression auf den T-Zellen nur teilweise durch die T_{reg} erklärt werden kann.

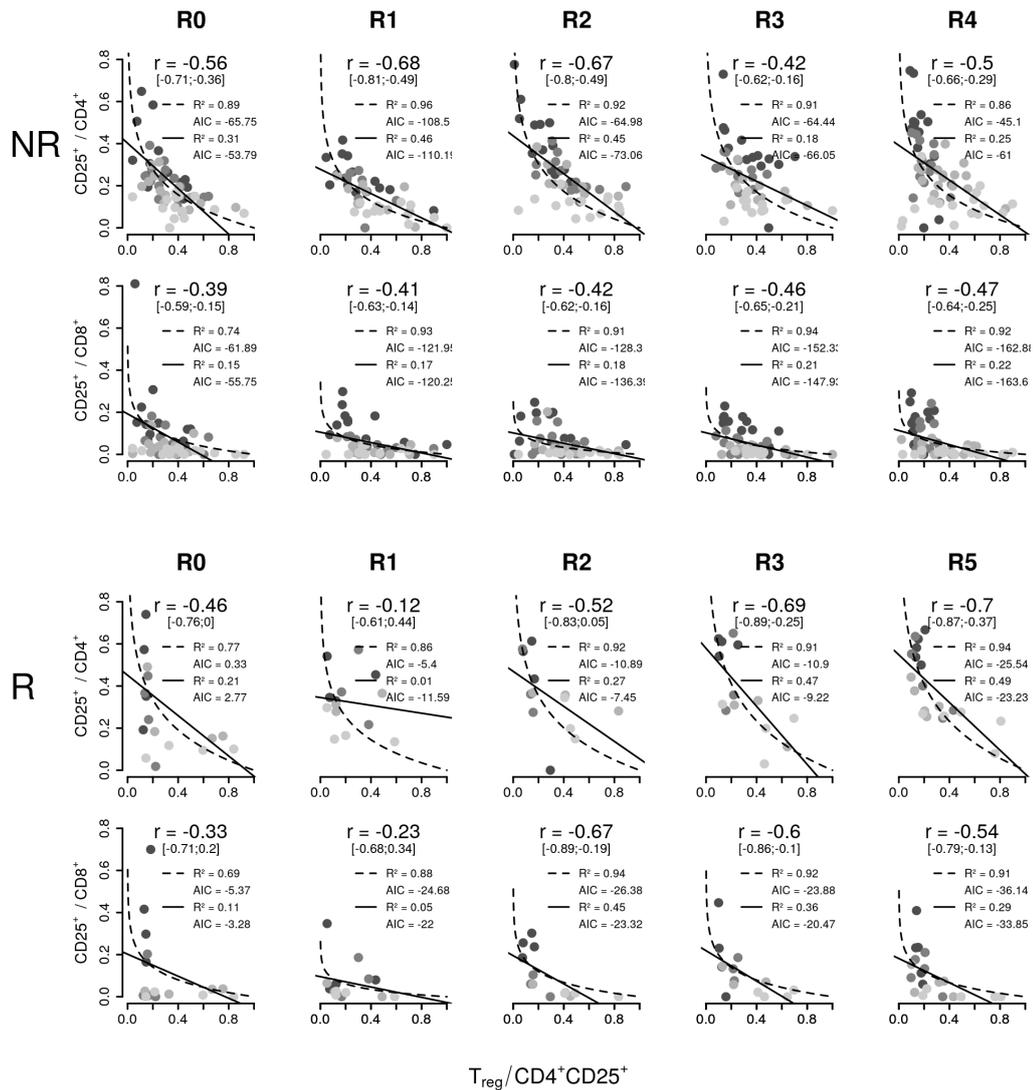


Abbildung 16: Korrelation zwischen T_{reg} und $CD25^+$ T-Effektorzellen
NR Patient*innen ohne Rezidiv, **R** Patient*innen mit Rezidiv, auf der x-Achse ist jeweils der Anteil der T_{reg} an allen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aufgetragen, auf der y-Achse der Anteil $CD25^+$ Zellen an den $CD4^+$ oder $CD8^+$ Lymphozyten, dabei besteht eine negative Korrelation zwischen dem Anteil der T_{reg} und den $CD25^+$ T-Effektorzellen, dies deckt sich mit den Beobachtungen von Feinerman et al., 2010, je größer die MFI desto dunkler der Punkt. Es fällt auf, dass eine hohe MFI tendenziell mit einem geringeren Anteil an T_{reg} einhergeht und umgekehrt. Als Regressionskurven sind die des linearen (durchgezogen) und des logarithmischen Modells (gestrichelt) eingezeichnet. Eigene Abbildung.

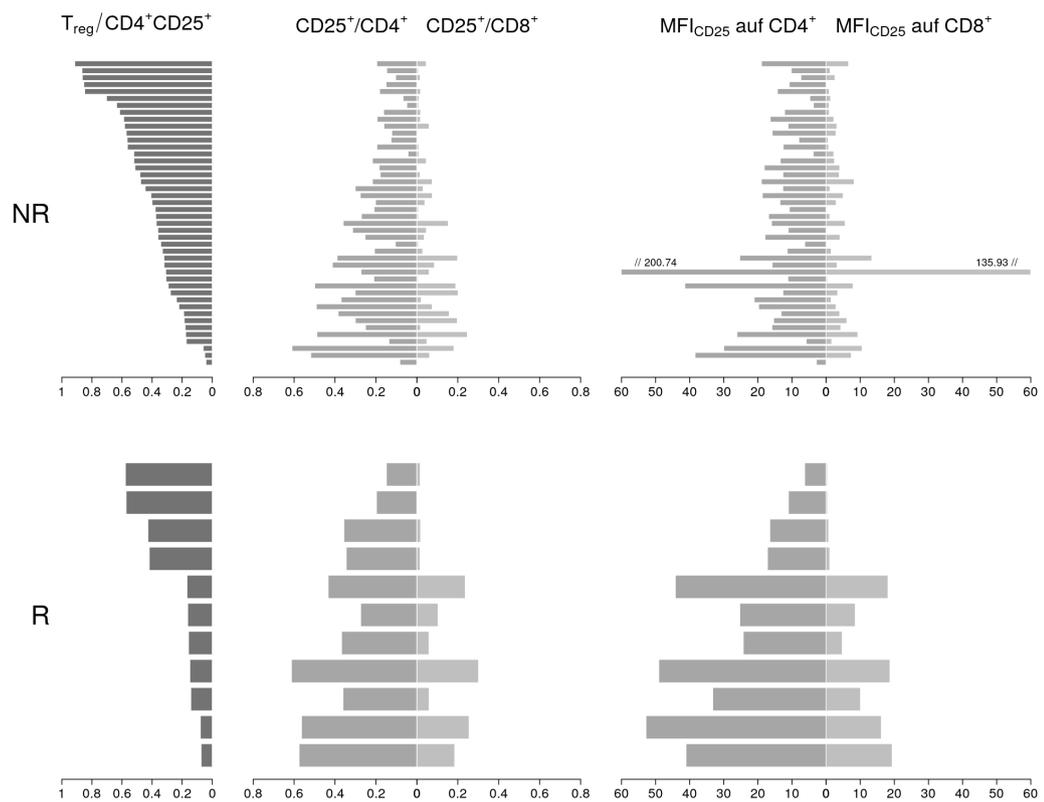


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen T_{reg} , T-Effektorzellen und deren *Mean Fluorescence Intensity* zum Zeitpunkt R2

*NR Patient*innen ohne Rezidiv, R Patient*innen mit Rezidiv; Balken auf der gleichen Höhe gehören zum gleichen Fall. Die Fälle sind nach dem jeweiligen Verhältnis der T_{reg} zu allen $CD4^+ CD25^+$ T-Lymphozyten sortiert. Es fällt auf, dass mit einer Zunahme der T_{reg} die Expression von CD25 auf den T-Effektorzellen tendenziell abnimmt. Eigene Abbildung.*

3.3 Vergleich der CD25-Expression zwischen den Gruppen NR, R und N

Die Expression von CD25 wurde auf zwei Arten untersucht. Auf der einen Seite erfolgte eine Zählung der Zellen, die mittels eines individuell ermittelten unteren Grenzwertes der *Fluorescence Intensity (FI)* als CD25⁺ eingeordnet wurden. Auf der anderen Seite wurde für jede Probe die *Mean Fluorescence Intensity (MFI)* der mittels APC-markierten und an CD25 gebundenen Antikörper auf der Zelloberfläche bestimmt (Abb. 5, Abschn. 2.6.2). Die *MFI* stellt dabei den Mittelwert der *Fluorescence Intensity (FI)* eines bestimmten Fluoreszenz-markierten Antikörpers auf allen in einem *Gate* registrierten Events dar. Beide Varianten haben ihre Vor- und Nachteile. So ist die Festlegung des unteren Grenzwertes zur Bestimmung der Anzahl CD25⁺ Events mittels Isotypenkontrolle relativ untersucherabhängig, da diese im Programm *CellQuest Pro*[®] manuell durch Verschiebung der Intervallgrenzen in Bezug zur Nullprobe erfolgt. (Cossarizza et al., 2017, S. 1653 f.) Kleine Abweichungen nach links oder rechts können hier schon ein Plus oder Minus von mehreren hundert Events bedeuten. (Abb. 18) Vorteil dieser Methode ist, dass sich im Rahmen der oben beschriebenen Schwankungsbreite eine Aussage darüber treffen lässt, wie viele Zellen einer bestimmten Population CD25 exprimieren. Es lassen sich also Verhältnisse bilden. - Die *MFI* wiederum unterliegt bereits Schwankungen auf molekularer Ebene. So können bereits die ungleichen Bindungsaffinitäten verschiedener Antikörper-Chargen, unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften von Farbstoffen oder Schwankungen aufgrund abweichender technischer Konfiguration diverser *FACS*[™] -Geräte potentielle Fehlerquellen darstellen. Dafür bedarf die Bestimmung der *MFI* im Nachhinein keiner manuellen Anpassung von Intervallgrenzen mehr. Im Folgenden werden jeweils die Ergebnisse beider Messungen dargestellt.

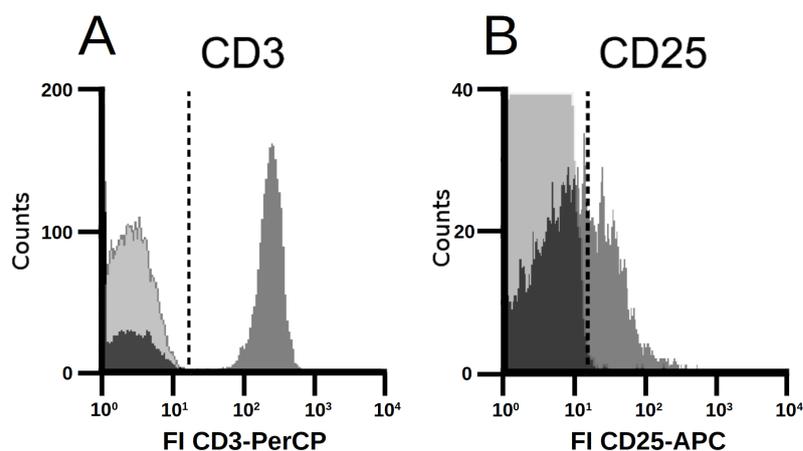


Abbildung 18: Problematik bei der objektiven Bestimmung der CD25-Expression

A) CD3 an welches ein PerCP-markierter Antikörper gebunden ist, definiert im Histogramm, das die Fluorescence Intensity (FI) gegen die Anzahl der Events aufträgt, einen eng umschriebenen Bereich. Die Populationsgröße lässt sich somit gut, durch Setzen des unteren Grenzwertes (gestrichelte Linie), von der Isotypenkontrolle abgrenzen. - **B)** Die Verteilung der Fluorescence Intensity eines APC-markierten Antikörpers, der an CD25 gebunden hat, wird hingegen deutlich von jener in der Isotypenkontrolle (transparentes Histogramm) überlagert. Daher muss der untere Grenzwert der registrierten Events manuell mitten in das Histogramm gesetzt werden. Eine Verschiebung um einen Zähler nach links oder rechts kann dabei bereits ein Plus oder Minus von mehreren hundert Events bedeuten. Dieses Problem wird auch von Cossarizza et al., 2017 beschrieben. Objektiver, jedoch Proben- und Reagenzien-abhängig störanfälliger ist die Bestimmung der Mean Fluorescence Intensity, wobei die FI aller Events gemittelt wird. (Die Abbildung wurde durch Überlagerung mehrerer, mit CellQuest Pro[®] generierter Histogramme einer Person aus dem Studienkollektiv erstellt.)

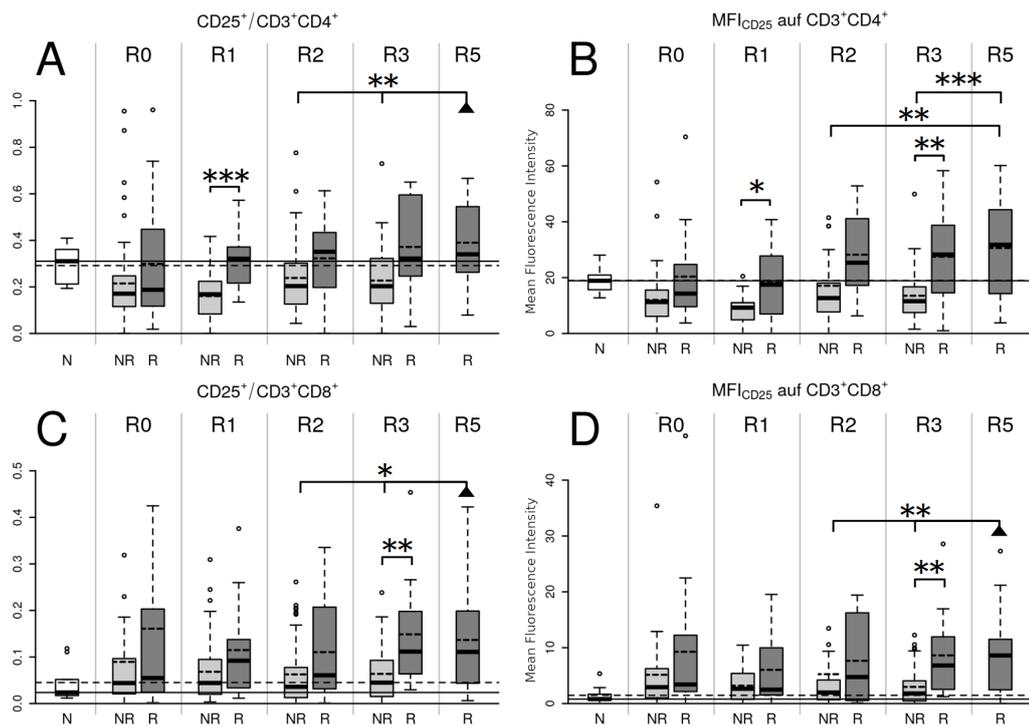


Abbildung 19: Vergleich der CD25-Expression auf CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten von Patient*innen mit und ohne Rezidiv

N gesundes Normalkollektiv, *NR* Patient*innen ohne Rezidiv, *R* Patient*innen mit Rezidiv; je nach Verteilung erfolgte der Signifikanztest unter Bonferroni-Korrektur mittels Wilcoxon-Rangwert-Test oder T-Test. **A)** Anteil der CD25⁺ Zellen an den CD4⁺ T-Lymphozyten, **B)** Korrespondierende Mean Fluorescence Intensity (MFI_{CD25}) **C)** Anteil der CD25⁺ Zellen an den CD8⁺ T-Lymphozyten **D)** Korrespondierende MFI_{CD25} / * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ - Eigene Abbildung.

Abb. 19 **A:** Bereits zum Analysezeitpunkt *R1* findet sich bei den Patient*innen, die später ein Rezidiv entwickelten ein signifikant höherer Anteil der CD25⁺ Zellen an den CD4⁺ T-Lymphozyten ($p < 0,001$). Bei *R2* und *R3* ist ebenfalls eine solche Tendenz erkennbar, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Der Vergleich von Zeitpunkt *R5* der Gruppe *R* mit den am ehesten korrespondierenden Zeitpunkten der Patient*innen ohne Rezidiv, *R2* und *R3*, ergab ebenfalls eine statistisch signifikante Erhöhung. Abb. 19 **B:** Die entsprechende *MFI* war zum Zeitpunkt *R3* bei den Patient*innen mit Rezidiv gegenüber den Patient*innen des *NR*-Kollektivs erhöht. Auffällig ist, dass die Verteilung der *MFI* für die Patient*innen ohne Rezidiv größtenteils unterhalb des Mittelwertes der gesunden Proband*innen (*N*) liegt. Da bei der Erstellung des Normalkollektivs jedoch im Gegensatz zu den Studienpatient*innen keine Intrazellulärfärbung und damit weniger Waschschr

Permeabilisierung der Zellmembran durchgeführt wurde, ist hier eine direkte Vergleichbarkeit der *MFI* fraglich. Abb. 19 C: Auch bei den zytotoxischen T-Zellen war in der Gruppe **R** eine Erhöhung des Anteils $CD25^+$ Zellen gegenüber **NR**, noch vor Entdeckung des Rezidivs, festzustellen ($R3$: $p < 0,01$). Abb. 19 D: Die *MFI* war analog erhöht ($R3$: $p < 0,01$). Insgesamt war die Expression von $CD25$ auf den T_C , wie schon bei der Analyse des zeitlichen Verlaufs innerhalb der Gruppe festzustellen war, wesentlich geringer, als bei den $CD4^+$ T-Lymphozyten.

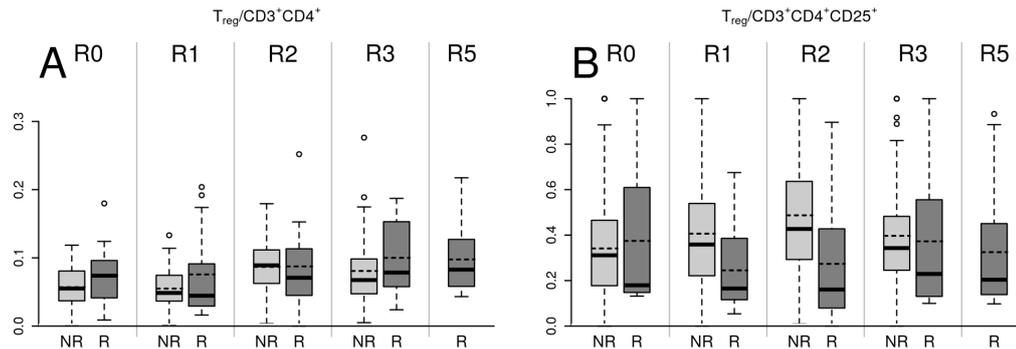


Abbildung 20: Vergleich des Anteils der regulatorischen T-Zellen an den $CD4^+$ Populationen von Patient*innen mit und ohne Rezidiv
NR Patient*innen ohne Rezidiv, **R** Patient*innen mit Rezidiv; je nach Verteilung erfolgte der Signifikanztest unter Bonferroni-Korrektur mittels Wilcoxon-Rangwert-Test oder T-Test. **A)** Anteil der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) an allen $CD4^+$ T-Lymphozyten **B)** Anteil der T_{reg} an den $CD25$ -exprimierenden $CD4^+$ T-Lymphozyten; es waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zwischen **NR** und **R** feststellbar. Eigene Abbildung.

(Abb. 20) Auch die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) wurden mit ihrer konstitutiven $CD25$ -Expression auf Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven überprüft. Dazu wurde zunächst der Anteil an allen $CD4^+$ T-Lymphozyten untersucht, wobei sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigten und auch keine Tendenz erkennbar war (Abb. 20 A). Außerdem wurde auch der Anteil der T_{reg} an den $CD25$ -exprimierenden $CD4^+$ T-Lymphozyten betrachtet und eine, wenn auch nicht signifikante, Tendenz zu niedrigeren Werten bei den Rezidivpatient*innen gefunden (Abb. 20 B).

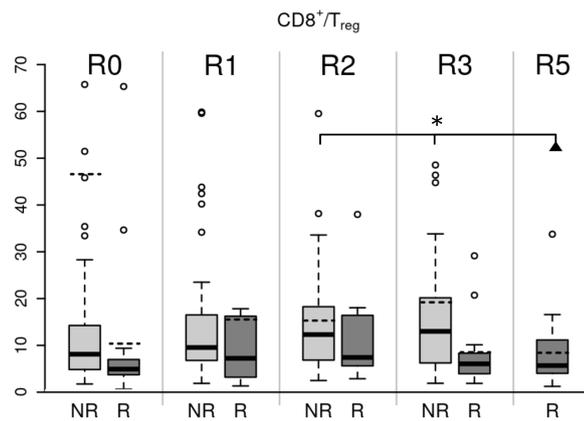


Abbildung 21: Vergleich der CD8/T_{reg}-Ratio zwischen Patient*innen mit und ohne Rezidiv

*NR Patient*innen ohne Rezidiv, R Patient*innen mit Rezidiv; aufgrund der zu allen Zeitpunkten schiefen Lage der Werte erfolgte die Überprüfung der Signifikanz unter Bonferroni-Korrektur mittels Wilcoxon-Rangwert-Test. / * $p < 0,05$ - Eigene Abbildung.*

Die Größe der T_{reg}-Population steht darüber hinaus auch im Nenner der in Abschnitt 1.3.8 erwähnten und von Schuler et al., 2013 beschriebenen CD8/T_{reg}-Ratio. Aufgrund der Beteiligung CD25⁺ Zellen, sollte es auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patient*innen ausgewertet werden. - Bei der Berechnung der Ratio für beide Gruppen **NR** und **R** zeigte sich eine schiefe Verteilung mit vielen Ausreißern (Abb. 21). Insgesamt war das Verhältnis bei Patient*innen, die ein Rezidiv entwickelten tendenziell erniedrigt. Beim Vergleich der Zeitpunkte *R2* und *R3* von **NR** mit *R5* der Gruppe **R**, zeigte sich dann eine statistische Signifikanz der verminderten Ratio beim Vorliegen eines Rezidivs ($p < 0,05$).

Nach dem Vergleich der Patient*innen mit und ohne Rezidiv erfolgte noch eine Auswertung der Unterschiede zwischen den gesunden Proband*innen (**N**) und den Patient*innen der Gruppen **NR** und **R** bzgl. der CD25-Expression und des Verhältnisses der T-Lymphozytengruppen zueinander (Abb. 22). Diese sollte Aufschluss über die entsprechenden Ausgangswerte in den einzelnen Kollektiven geben und gegebenenfalls den diagnostischen Wert der einzelnen Zellgruppen im peripheren Blut herausarbeiten.

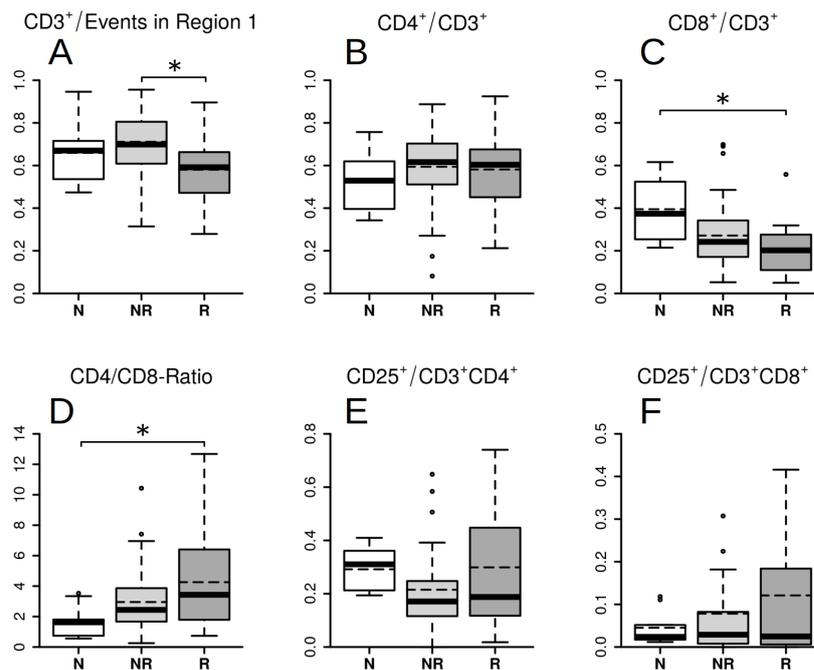


Abbildung 22: Vergleich der T-Zellpopulationen zwischen den Gruppen N, NR und R zum Analysezeitpunkt R0

N gesundes Kollektiv, *NR* Patient*innen ohne Rezidiv, *R* Patient*innen mit Rezidiv / * $p < 0,05$ - Eigene Abbildung.

Der Anteil der CD3⁺ Zellen in *Region 1* war bei den Patient*innen der Gruppe **R** gegenüber den Patient*innen ohne Rezidiv zum Zeitpunkt *R0* signifikant niedriger (Abb. 22 **A**). Bei den CD4⁺ T-Lymphozyten waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Abb. 22 **B**). Der Anteil der zytotoxischen T-Zellen war bei den Patient*innen der Gruppe **R** signifikant gegenüber dem Normalkollektiv erniedrigt, was zu einer ebenfalls signifikant höheren CD4/CD8-Ratio führte (Abb. 22 **C,D**). Bei der Gruppe **NR** konnte für die CD8⁺ T-Zellen ebenfalls ein durchschnittlich niedrigerer Anteil und eine erhöhte CD4/CD8-Ratio beobachtet werden, was jedoch nicht statistisch signifikant war. Beim Vergleich der CD25-Expression konnten zum Zeitpunkt *R0* zwischen den drei Gruppen keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 22 **E,F**). Der mediane Anteil der CD25⁺ T-Helferzellen lag jedoch in **NR** und **R**, wenn auch nicht signifikant, deutlich unter dem des Normalkollektivs.

Receiver Operating Characteristics (ROC) der CD25-Expression zur Unterscheidung von Patient*innen mit und ohne Rezidiv

Sollte sich die Expression von CD25 auf T-Lymphozyten des peripheren Blutes von

HNSCC-Patient*innen als prognostisch entscheidendes Oberflächenantigen herausstellen, wäre die nächste drängende Frage die wie hoch die Güte dieses Markers ist. Wenn auch die tatsächliche Sensitivität und Spezifität prospektiv an neuen Kollektiven untersucht werden müsste, so kann diese mittels der hier erhobenen Daten zumindest abgeschätzt werden. Die folgenden *Receiver Operating Characteristics (ROC)* geben die für die untersuchten Kollektive **NR** und **R** auf Basis der erhobenen Daten anzunehmenden Gütekriterien wieder. (Abbildungen 23 und 24) Eine vollständige Aufstellung der ermittelten Werte ist den beiden Tabellen 28 und 29 im Anhang Abschn. 9.4 zu entnehmen.

Zum Analysezeitpunkt *R0* ist noch keine der Zellpopulationen geeignet, um zwischen Patient*innen mit zukünftigem Rezidiv und solchen ohne Rezidiv zu unterscheiden (*AUC*: 0,49-0,571 in Abb. 23 **A**). Im weiteren Verlauf (Abb. 23 **B-D**) zeigen sich dann höhere *AUC* für die einzelnen Populationen. Besonders die CD25⁺ T-Helferzellen erscheinen zum Zeitpunkt *R1* mit einer *AUC* von 0,839 (95% KI 0,718-0,96) (*fair-good*), einer Sensitivität von 0,714 und einer Spezifität von 0,915 zur Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen zu geeignet. Auch der Vergleich des Zeitpunktes *R5* der Gruppe **R** mit den Zeitpunkten *R2* und *R5* der Gruppe **NR** suggeriert eine gewisse Bedeutung dieser Populationen mit *AUC* von 0,775 (95% KI 0,658-0,892) und 0,768 (95% KI 0,645-0,892) (*poor-good*). Ein ähnliches Bild vermitteln die ROC zu den *Mean fluorescence intensities* des CD25 auf den CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Auch hier sticht die CD25-Expression auf den T-Helferzellen mit *AUC* von 0,799 (95% KI 0,634-0,965) bis 0,8 (95% KI 0,659-0,942) (*poor-fair*) zu den Zeitpunkten *R1-R3* hervor. Beim Vergleich des Rezidiv-Kollektivs zum Zeitpunkt *R5* mit den Patient*innen ohne Rezidiv bei *R2* und *R3* zeigen sich ähnliche *AUC*.

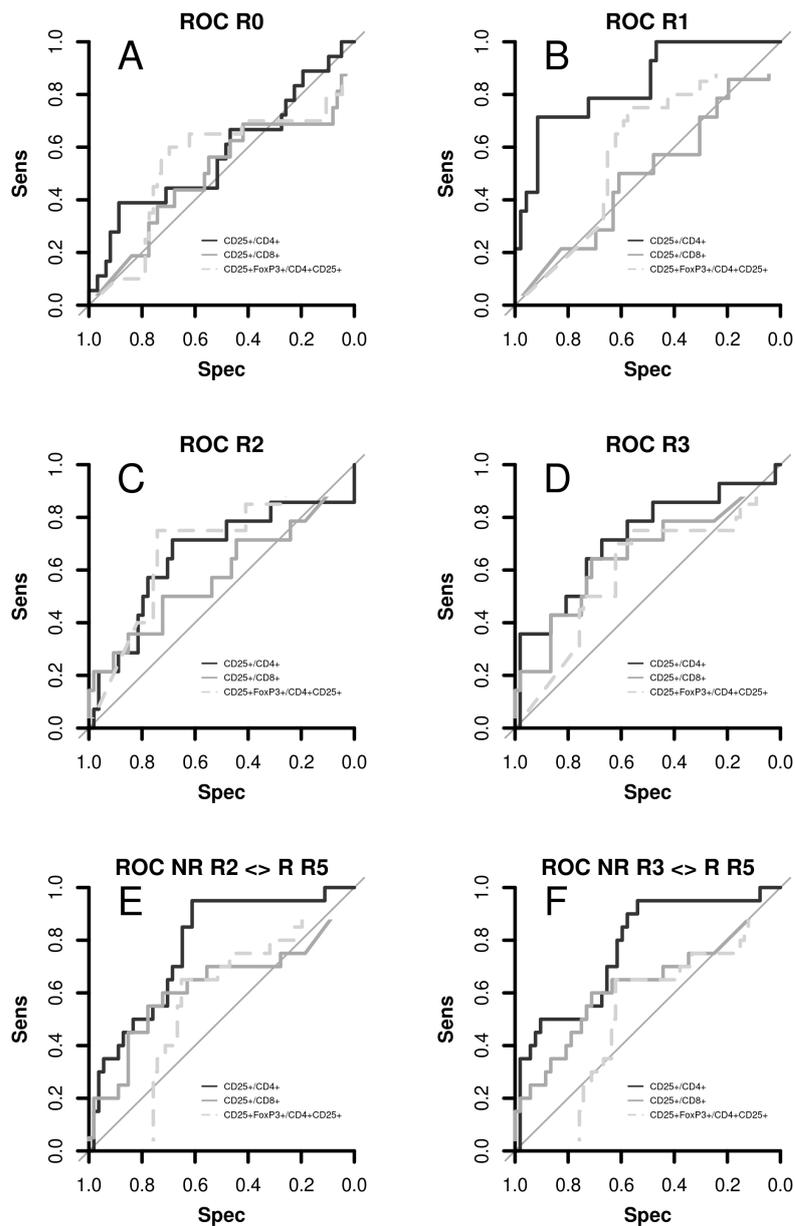


Abbildung 23: Receiver Operating Characteristics (ROC) zur Detektion von Rezidivpatient*innen - CD25⁺ Zellpopulationen

AUC: Area Under the Curve, in den Diagrammen A-B werden jeweils gleichnamige Zeitpunkte der Gruppen NR und R verglichen. In E und F wird jeweils der Zeitpunkt R5 der Gruppe R den Zeitpunkten R2 und R3 der Gruppe NR gegenübergestellt. Die Grafiken wurden mit dem R-Paket pROC erstellt. (Robin et al., 2011)

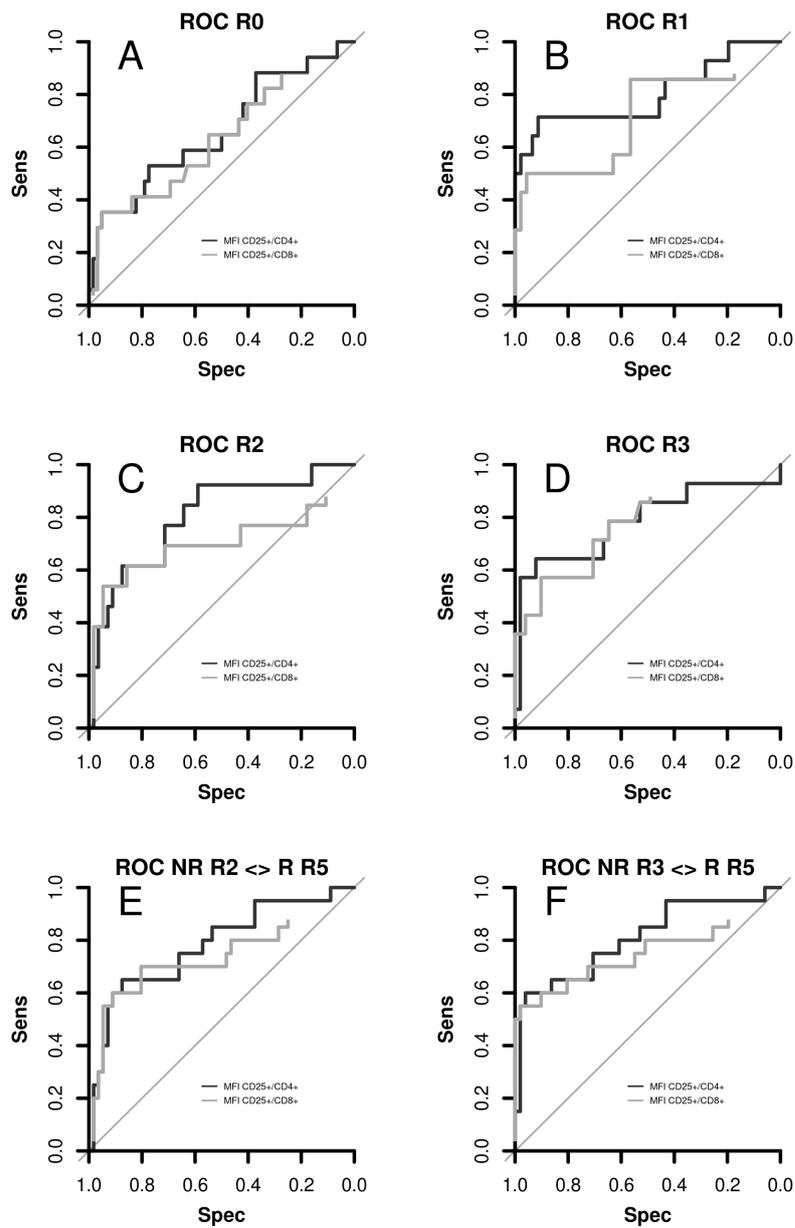


Abbildung 24: Receiver Operating Characteristics (ROC) zur Detektion von Rezidivpatient*innen - Mean Fluorescence Intensity (MFI)

AUC: Area Under the Curve, in den Diagrammen A-B werden jeweils gleichnamige Zeitpunkte der Gruppen NR und R verglichen. In E und F wird jeweils der Zeitpunkt R5 der Gruppe R den Zeitpunkten R2 und R3 der Gruppe NR gegenübergestellt. Die Grafiken wurden mit dem R-Paket pROC erstellt. (Robin et al., 2011)

3.4 Veränderungen CD3⁺ Zellen über 3 Tage in EDTA-Blut

In der *HNprädBio*-Studie wurden als Probengefäße EDTA-Blutröhrchen verwendet. Um eine Beeinflussung der untersuchten Marker durch die zwischen Entnahme und Analyse verstrichenen Stunden und etwaige Umwelteinflüsse berücksichtigen zu können, ist eine genauere Untersuchung ihrer Stabilität über einen definierten Zeitraum nötig.

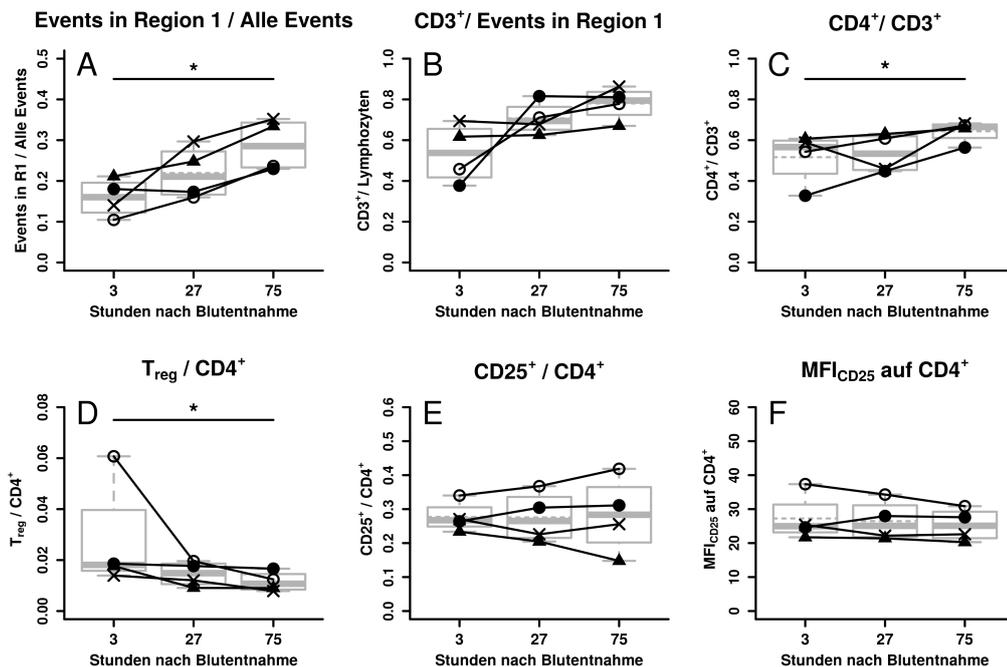


Abbildung 25: Veränderungen CD3⁺ Lymphozytenpopulationen im Verlauf von 75 Stunden nach Blutentnahme

A und C * $p < 0,05$ in der ANOVA für verbundene Stichproben, *D* * $p < 0,05$ im Friedman-Test / Die dicke durchgezogene Linie in jeder Box zeigt den Median, die dünne gestrichelte Linie den Mittelwert. Jedes der vier verschiedenen Symbole steht für einen/eine Proband*in. Eigene Abbildung.

Es zeigte sich im Verlauf von 75 Stunden eine signifikante Zunahme der Events in *Region 1* bezogen auf alle anderen Events von im Mittel 15,9% [4,7%] auf 28,8% [6,4%] (Abb. 25 **A**). Relativ zu den T-Lymphozyten stiegen die CD4⁺ Zellen im gleichen Zeitraum von 51,7% [12,9%] auf 64,4% [5,4%] (Abb. 25 **C**). Der Anteil der T_{reg} an den CD4⁺ Lymphozyten verringerte sich von im Mittel 2,8% [2,2%] auf 1,1% [0,4%]. Die übrigen untersuchten Populationen zeigten keine signifikanten Veränderungen, wobei jedoch eine zunehmende Tendenz beim Anteil der T-Lymphozyten an den Events in *Region 1* zu erkennen war (Abb. 25 **B,E**).

Die *Mean Fluorescence Intensity* des APC-markierten CD25 auf den CD4⁺ Lymphozyten blieb über den gesamten Zeitraum relativ stabil um ca. 28% (Abb. 25 F). Die einzelnen Maßzahlen, Lageparameter und Ergebnisse der Signifikanztests sind den Tabellen 30 und 31 im Anhang zu entnehmen.

3.5 IL2 in Blutplasma

Die Analyse der Expression des zellständigen IL2-Rezeptors legt nahe, auch seinen Liganden, das IL2 selbst näher zu betrachten. Als Matrix für die Konzentrationsbestimmung wurde tiefgefrorenes Plasma von Studienteilnehmern verwendet, die den Gruppen **NR** und **R** angehören. Anschließend sollte die IL2-Konzentration mit der Expression des CD25 auf den T-Lymphozyten der jeweiligen Patient*innen korreliert werden.

Bei der Auswertung des ersten Versuchs des IL2-*ELISAs* ergaben sich nur vereinzelt messbare Konzentrationen von Interleukin 2 im peripheren Blutplasma der Proband*innen. Diese lagen alle unter der niedrigsten Konzentration der Standardkurve von 7,8 pg/ml. (Tabelle 12) Um auszuschließen, dass eine zu starke Verdünnung (1:4) des Probenmaterials ursächlich für dieses Ergebnis war, wurde der Versuch, wie in Abschn. 2.8 erläutert, mit einer geringeren Verdünnung wiederholt (1:2).

Tabelle 12: IL2-Konzentration in Blutplasma, Ergebnisse nach dem ersten Versuch (Verdünnung 1:4)

<i>Proband*in</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>
NR IL2-001-NR	0	0	0	0,07	0	–
NR IL2-002-NR	0	0	0	–	0	–
NR IL2-003-NR	0,65	0,1	0	0	0	–
NR IL2-004-NR	0	0	0	0	0	–
R IL2-001-R	0	0	0	0	–	0
R IL2-002-R	2,08	0,12	0	–	–	0
R IL2-003-R	0	0	0	0	–	0
R IL2-004-R	0	0	–	0	–	0
G	0	–	–	–	–	–

Konzentrationen in pg/ml - Nur bei einem geringen Anteil der Proben sind minimale Konzentrationen von IL2 detektiert worden. Dabei liegen sämtliche Werte unterhalb der niedrigsten Konzentration der Standardkurve von 7,8 pg/ml.

Auch beim zweiten Versuchsdurchlauf ergaben sich ausschließlich Konzentrationen, die unterhalb des Wertes von 7,8 pg/ml lagen. Insgesamt konnte jedoch in mehr Proben als vorher IL2 nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass bei dem gesunden Probanden (**G**), dessen Plasma 1:1 mit IL2-Standard der Konzentration 250pg/ml gemischt wurde, nach der Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor, lediglich eine Konzentration von 40 pg/ml gemessen wurde, obwohl hier mindestens 250 pg/ml zu erwarten gewesen wären. (Tabelle 13)

Tabelle 13: IL2-Konzentration in Blutplasma, Ergebnisse nach dem zweiten Versuch mit geringerer Verdünnung (1:2)

<i>Proband*in</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>
NR IL2-001-NR	0	2,02	0	1,98	0	–
NR IL2-002-NR	0	0	0	–	2,71	–
NR IL2-003-NR	0,61	0,27	0	0	0	–
NR IL2-004-NR	0,53	0	0	0	0	–
R IL2-001-R	0	0	0	5,79	–	0,23
R IL2-002-R	5,84	7,21	0	–	–	0
R IL2-003-R	0	4,05	0,75	0	–	1,25
R IL2-004-R	0	0	–	0	–	0
G	0	–	–	–	–	–
G + 250 pg/ml IL2	40	–	–	–	–	–

Konzentrationen in pg/ml - Wie beim ersten Versuchsdurchlauf liegen die detektierten Werte unterhalb der niedrigsten Konzentration der Standardkurve von 7,8 pg/ml. Bemerkenswert ist die gemessene Konzentration des IL2 im Plasma des gesunden Probanden (G), welches im Verhältnis 1:1 mit Standard der Konzentration 250 pg/ml versetzt wurde (G + 250 pg/ml IL2). - Hier wurde lediglich eine Konzentration von 40 pg/ml durch den Assay detektiert.

3.6 sIL2-R α in Blutplasma

Neben dem auf T-Lymphozyten exprimierten zellständigen CD25 existiert auch eine im Plasma gelöste Form, die als sIL2-R α bezeichnet wird (Lindqvist et al., 2010). Analog zur Bestimmung der Konzentration seines Liganden IL2 sollte auch die des gelösten CD25 mittels *ELISA* bestimmt und mit den bereits erhobenen Daten korreliert werden. Auch für diesen Versuch wurde ein handelsüblicher Assay, der *Quantikine[®] ELISA Human CD25/IL-2 R α* der Firma R&D systems[®], verwendet.

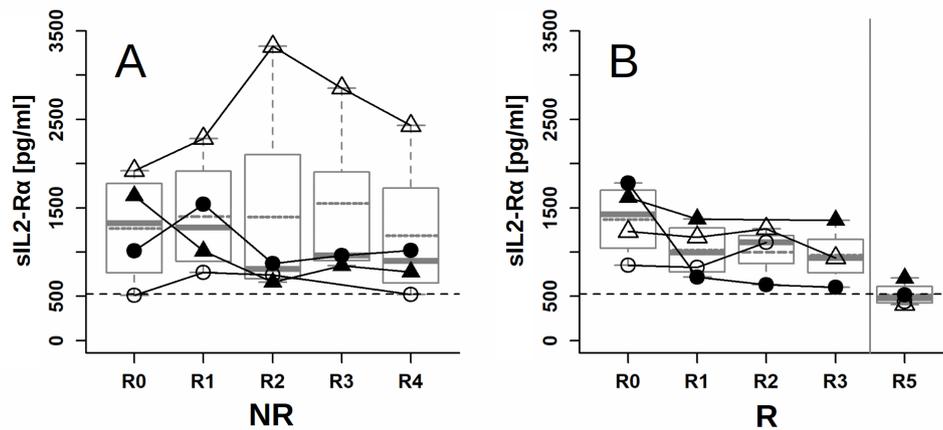


Abbildung 26: Konzentration von sIL2-R α in Blutplasma

Gleiche Symbole in den beiden Grafiken **A** und **B** stehen für einander beim Matching zugeordnete Patient*innen aus den Gruppen **NR** und **R**, die horizontale gestrichelte Linie markiert die sIL2-R α -Plasmakonzentration des gesunden Probanden **G** von 582 pg/ml - Eigene Abbildung.

(Abb. 26 **A**) Bei den 4 Patient*innen ohne Rezidiv (**NR**) zeigten sich sehr individuelle Verläufe der sIL2-R α -Konzentration im Plasma über die Analysezeitpunkte. Es waren sowohl Anstiege als auch Abfälle im Verlauf der *RCTx* zu beobachten. Drei der vier Proband*innen stabilisierten ihre sIL2-R α -Konzentration ab dem Zeitpunkt *R2* bei Werten um 900 pg/ml. Eine Person (leeres Dreieck) zeigte von Anfang an höhere Konzentrationen als die anderen wobei der sIL2-R α -Spiegel bis zum Zeitpunkt *R2* anstieg, um dann bis *R4* wieder abzufallen.

(Abb. 26 **B**) Im Kollektiv der vier ausgewählten Patient*innen aus der Gruppe **R** zeigte sich ein einheitlicherer Verlauf mit einer höheren medianen Konzentration vor Therapiebeginn und einer Stabilisierung bei ca. 1000 pg/ml. Bemerkenswert ist der Abfall der absoluten sIL2-R α -Konzentration zum Zeitpunkt *R5*. Hier lag die mediane Konzentration nahe bei der des gesunden Probanden **G**. Da sich die bei allen anderen Zeitpunkten vorliegende Streuung der Werte plötzlich massiv verringert und die Proben für *R5* alle in die selbe Reihe der 96-Well-Platte pipettiert wurden (Abb. 29 in Abschnitt 9.2.4 des Anhangs), ist auch ein möglicher Fehler in der Durchführung zu berücksichtigen. Tabelle 14 zeigt die absoluten Konzentrationen der 8 Patient*innen zu den einzelnen Analysezeitpunkten. Eine Korrelation mit der Expression von CD25 auf den verschiedenen T-Zellpopulationen für die Kollektive **NR** und **R** zeigt Abb. 27. Die Signifikanztestung konnte weder Veränderungen im Verlauf noch Unterschiede zwischen den Gruppen als statistisch signifikant einstufen (Tabellen 32-34 im Anhang, Abschnitt 9.4).

Tabelle 14: Konzentration von sIL2-R α in Blutplasma

<i>Proband*in</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>
NR IL2-001-NR	1012	1543	872	960	1020	–
NR IL2-002-NR	513	772	739	–	520	–
NR IL2-003-NR	1919	2284	3325	2853	2429	–
NR IL2-004-NR	1636	1012	659	846	776	–
R IL2-001-R	1779	717	630	601	–	517
R IL2-002-R	850	828	1108	–	–	441
R IL2-003-R	1233	1166	1264	932	–	407
R IL2-004-R	1620	1375	–	1359	–	706
G	582	–	–	–	–	–

*Konzentrationen in pg/ml, NR Patient*innen ohne Rezidiv, R Patient*innen mit Rezidiv, G gesunder Proband*

Korrelation der Konzentration von sIL2-R α mit der CD25-Expression in den Gruppen NR und R

Abbildung 27 zeigt die Korrelationsanalysen der sIL2-R α -Konzentration im Blutplasma mit der CD25-Expression auf den verschiedenen Lymphozytenpopulationen. Es sind hier, möglicherweise auch aufgrund der geringen Stichprobengröße, keine eindeutigen Zusammenhänge erkennbar. Auf die Darstellung der Korrelation von plasmatischem IL2 mit der CD25-Expression der genannten Populationen wird, aufgrund der extrem niedrigen detektierten Konzentrationen von Interleukin 2, verzichtet.

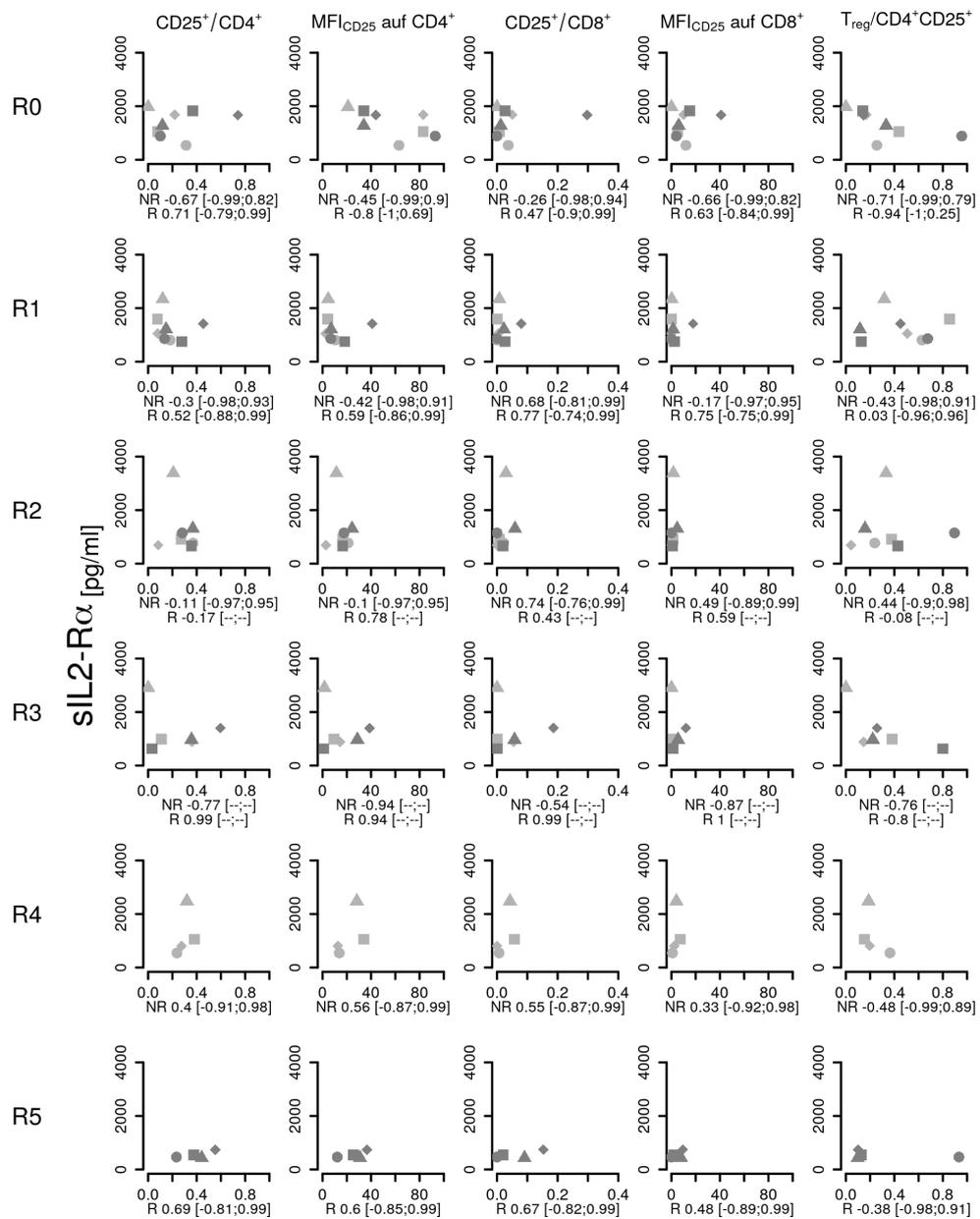


Abbildung 27: Korrelation von sIL2-R α in Plasma mit Expressionsparametern von CD25 auf T-Lymphozyten
*NR Patient*innen ohne Rezidiv (helle Symbole), R Patient*innen mit Rezidiv (dunkle Symbole), Sämtliche Konfidenzintervalle unter Annahme des linearen Modells überspannen praktisch den gesamten möglichen Wertebereich für r. Damit ist keine Aussage bzgl. einer Korrelation möglich. Eigene Abbildung.*

4 Diskussion

Studiendesign und Bedeutung der Analysezeitpunkte

Die multizentrische Konzeption der *HNprädBio*-Studie ermöglichte die Auswertung von insgesamt 369 Blutproben von 86 *HNSCC*-Patient*innen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit. Die Entnahme der Proben verteilte sich dabei, wie in Abschnitt 2.1.1 dargestellt, auf 6 mögliche Zeitpunkte. Da die Gesamtstudie bei Auswertung der Ergebnisse noch nicht abgeschlossen war, betrug der maximale Nachbeobachtungszeitraum nicht, wie eigentlich im Studienprotokoll vorgesehen 2 Jahre, sondern 12 Monate. Nichtsdestotrotz gelang hier eine Evaluation der CD25-Expression als prognostischer Marker für die primär mittels RCTx behandelte Kohorte. Leider lagen, aufgrund des Studiendesigns, noch keine *Baseline-Charakteristiken* der einzelnen Patient*innen vor. Somit entfällt vorerst eine schließende Statistik bzgl. eines Zusammenhangs von Alter, Geschlecht oder histologischen und metrischen Tumoreigenschaften mit der Prognose, in Abhängigkeit von der CD25-Expression. Auch Aussagen bzgl. des prognostisch entscheidenden HPV-Status sind hier noch nicht möglich. (Abschn. 1.2.4) Diese Informationen müssen im weiteren Verlauf der Studie mit den hier gefundenen Ergebnissen kombiniert werden. Im Folgenden sollen nun die in Abschnitt 3 bereits beschriebenen Ergebnisse der einzelnen Experimente bewertet, zu einem Gesamtbild vereinigt und diskutiert werden.

Den beiden Analysezeitpunkten *R2* und *R3* kommt eine besondere Bedeutung zu. Sucht man nach prognostischen Faktoren bezüglich einer Frührezidiventstehung, so bietet sich genau diese Zeitspanne von 4-8 Monaten nach abgeschlossener RCTx an. (Tab. 6, Abschn. 2.1.4) Die deutschen S3-Leitlinien empfehlen für das 1. und 2. Jahr nach abgeschlossener Therapie bei *HNSCC* ein maximales Nachsorgeintervall von 3 Monaten. Für das 3. bis 5. Jahr kann dieses dann auf 6 Monate ausgedehnt werden. (K. D. Wolff et al., 2012) Der mediane Zeitpunkt der Rezidiverkennung lag bei den in dieser Arbeit eingeschlossenen 20 Patient*innen der Gruppe **R** bei 10,5 Monaten nach Ende der Therapie. Die Analysezeitpunkte *R2* und *R3* decken sich also mit den empfohlenen ersten beiden Nachsorgeterminen. Diese beiden Zeitmarken wären folglich auch im klinischen Alltag relevante Erhebungszeitpunkte für ein posttherapeutisches Monitoring. Eine weitere Tatsache, die bei der Bewertung berücksichtigt werden muss ist, dass die einzelnen Blutentnahmen bei den Teilnehmern der *HNprädBio*-Studie durchschnittlich 1 Monat später als ursprünglich geplant erfolgten. Aufgrund der starken zeitlichen Streuung des Zeitpunktes *R5* (IQR 5,38 Monate) wurden die Werte hier für die untersuchten Parameter und Zellgruppen stets auch mit den Zeitpunkten *R2* und *R3* der Patient*innen ohne

Rezidiv verglichen.

Die Zeitpunkte *R0* und *R1* wiederum eignen sich zur Analyse der Expression von Zellmarkern vor und während der *RCTx*. Da ein Rezidiv definitionsgemäß erst nach Abschluss einer Therapie auftreten kann, sind beide Analysezeitpunkte selbstverständlich nicht zur Detektion eines solchen geeignet. Sie ermöglichen jedoch eine Einordnung des individuellen Verlaufs und zeigen womöglich bereits während der Therapie spezifische Tendenzen an, die eine Extrapolation bezüglich folgender Zeitpunkte ermöglichen. So war beispielsweise bei den Patient*innen der Gruppe **R**, die später ein Rezidiv entwickelten, bereits während der *RCTx* (*R1*) ein signifikant höherer mittlerer Anteil an CD25⁺ T_H im peripheren Blut nachweisbar (32,4% [SD 13,5%] gegenüber 16,1% [SD 9,7%] in der Gruppe **NR** - Abb. 19, Abschn. 3.3). Zur primären Tumordiagnostik oder gar zum Tumorscreening in der breiten Bevölkerung wird die CD25-Expression allerdings kaum geeignet sein, zumal dieser Oberflächenmarker auch bei unspezifischer Inflammation ansteigt. Der positive prädiktive Wert wäre angesichts der relativ niedrigen Prävalenz des *HNSCC* wahrscheinlich unverantwortbar niedrig. Eine Evaluation als diagnostischer Marker zum primären Screening wäre allenfalls für ein Kollektiv, welches unter einem starken Einfluss der im Einleitungsteil aufgeführten Risikofaktoren wie Nikotin- und Alkoholabusus steht, denkbar. Insgesamt fällt bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs auf, dass einige Rezidive relativ früh nach der Therapie auftraten, was zu der kritischen Frage führen muss, ob es sich tatsächlich bei allen diesen Fällen um Rezidive oder in einzelnen Fällen um Residualtumore handelt, die erst zu dem entsprechenden Zeitpunkt ein detektierbares Ausmaß erreichten. Auch hierüber wird die Betrachtung der Daten aller Patient*innen nach Abschluss der Gesamtstudie Klarheit bringen.

Veränderungen CD3⁺ Lymphozyten im Probenmaterial

Eine wichtige Voraussetzung für den Nutzen der hier diskutierten Ergebnisse stellt deren Reproduzierbarkeit dar. Zu diesem Zweck werden sämtliche Protokolle und verwendete Reagenzien im Anhang wiedergegeben. Darüberhinaus wurde überprüft, wie stabil die untersuchten Marker und Zellpopulationen im Probenmaterial nach Entnahme sind, um mögliche Einflüsse des zeitlichen Ablaufes auf die gemessene Markerexpression beurteilen zu können. (Abschn. 3.4) So zeigte sich bei der Untersuchung der Veränderung der Expressionsmuster und Zellzahlen der Lymphozytenpopulationen in EDTA-Blut über 75 Stunden nach Entnahme, dass hier der Zeitpunkt der Bearbeitung nach Probengewinnung durchaus einen Einfluss auf

die gemessenen Parameter hat. Die zeitlichen Abläufe müssen also, sowohl beim Vergleich verschiedener Patient*innen als auch bei der Verlaufsbeurteilung eines einzelnen Individuums, angeglichen bzw. standardisiert werden. In dieser Arbeit untersuchte Proben wurden im Schnitt 24 Stunden nach deren Entnahme bearbeitet und unmittelbar analysiert, was bei einer Übertragung in den klinischen Bereich zu berücksichtigen wäre. Hier erfolgen vergleichbare hämatologische und immunologische Auswertungen oft innerhalb weniger Stunden. Bereits 1984 untersuchten Nicholson et al. die Stabilität von T- und B-Lymphozyten in Blutproben, die mit verschiedenen Antikoagulantien versetzt waren. EDTA hatte dabei gegenüber den anderen Substanzen einen alterierenden Einfluss auf die Population der Granulozyten. Diese veränderten ihre morphologischen Eigenschaften im Laufe der Lagerungszeit von mehreren Tagen, was sich auf die Parameter *SSC* und *FSC* auswirkte. So waren sie teilweise nicht mehr sicher von der Gruppe der Lymphozyten zu unterscheiden. Ein Phänomen, welches die in dieser Arbeit beobachtete Zunahme der Events in *Region 1* und damit eine vermeintliche Akkumulation der Lymphozyten erklären könnte. (Abschn. 3.4) Nach 3 Tagen Lagerung des EDTA-Blutes stieg der mittlere gemessene Anteil der T-Lymphozyten um 10,8% [SD 18,2%] an. Andere Antikoagulantien wie Heparin beeinflussen, Nicholson et al. zufolge, die lymphozytären Zellpopulationen weniger. Daher sollte durchaus evaluiert werden, ob bei längerem Transport bzw. längerer Lagerung nicht ein Ersatz von EDTA durch ein anderes in-vitro Antikoagulans vorteilhaft wäre. (Nicholson et al., 1984) Eine andere Erklärung für die Alterationen wäre eine möglicherweise unterschiedliche Resistenz der einzelnen Zellgruppen gegenüber einer längeren Lagerungszeit.

Erstellung des Normalkollektivs

Bei der Erstellung des Normalkollektivs von 9 Proband*innen wurde das gleiche Bearbeitungsprotokoll angewandt, wie für die Untersuchung der eigentlichen Studienkollektive. Es wurden die Ein- und Ausschlusskriterien der *HNprädBio*-Studie zugrunde gelegt, weshalb Personen mit einer malignen Erkrankung generell vom Normalkollektiv ausgeschlossen waren. Darüberhinaus wurde darauf geachtet, dass sich das Alter der gesunden Proband*innen auf das durch die Einschlusskriterien vorgegebene Intervall verteilte. Insgesamt konnte so ein Normalkollektiv erstellt werden, dessen lymphozytäre Subpopulationen größtenteils einer Gauß'schen Normalverteilung folgten. Im Vergleich mit anderen Arbeiten fielen jedoch in Bezug auf die gesunden Proband*innen durchaus Unterschiede auf. Ein Problem stellen die häufig verschiedenen Bezugsgrößen in den einzelnen Publikationen dar. So geben die Autoren Anteile und Intervalle gelegentlich bezogen auf alle Leukozyten und ge-

legentlich begrenzt auf die Obergruppe der Lymphozyten oder die T-Lymphozyten an. Daher ist es unabdingbar, für die jeweilige Fragestellung ein eigenes Normalkollektiv zu erstellen. Zumal zahlreiche andere Faktoren, wie das verwendete Antikoagulans, der Analysezeitpunkt oder auch das Alter der Proband*innen, wie bereits ausgeführt, einen Einfluss auf die Messergebnisse einzelner morphologischer Parameter und Marker haben können. (Comans-Bitter et al., 1997; Louati et al., 2019) Zahlreiche statistische Methoden setzen darüber hinaus das Wissen um die Messwerte der einzelnen Individuen in ihrer mathematischen Definition voraus (Beispielsweise der *Student's T-Test* oder die *ANOVA*). Um Material für die Bearbeitung der Proben von Studienpatient*innen einzusparen, musste die ressourcenintensive intrazelluläre Färbung mit FoxP3 für das Normalkollektiv entfallen. So liegen hier leider keine Messwerte zu den $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) vor. Es ist also in Bezug auf das Normalkollektiv nur eine Bewertung der $CD25^+$ T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen als Obergruppe möglich.

Veränderungen der analysierten Zellpopulationen während der Radiochemotherapie und der Nachbeobachtung

Die Intention dieser Arbeit ist nicht allein, CD25 als prognostischen Marker zu evaluieren, sondern darüber hinaus, dessen Expression unter Radiochemotherapie in das Gesamtbild der Lymphozytenpopulationen einzuordnen. Aus diesem Grunde wurden auch andere, nicht $CD25^+$ Populationen analysiert. Die deutlichsten Veränderungen traten im Verlauf der kombinierten *RCTx* zwischen den Zeitpunkten *R0* und *R2*, also während der Therapie selbst, auf. So war, unabhängig vom Kollektiv, eine Reduktion der T-Zellen insgesamt sowie der T-Helferzellen als Untergruppe festzustellen. Auch der Anteil der B-Lymphozyten halbierte sich durchschnittlich während der *RCTx*, um sich im weiteren Verlauf wieder zu erholen. Demgegenüber steht eine signifikante Zunahme des Anteils der Natürlichen Killerzellen und der zytotoxischen T-Zellen in beiden Kollektiven. Auch die Population der NKT-Zellen ($CD3^+CD56^+$) zeigte in der Gruppe **NR** einen signifikanten Anstieg. Diese Beobachtungen sprechen in Kombination am ehesten für eine Weichenstellung hin zur zellulären Immunabwehr (Abschn. 1.3.1). Die Abnahme der $CD4^+$ simultan zur Zunahme der $CD8^+$ T-Lymphozyten führte zu einer signifikanten Reduktion der *CD4/CD8-Ratio* im Verlauf der *RCTx*, die bei den Nachuntersuchungen erhalten blieb. (Abb. 10-14, Abschn. 3.2) Die Rolle der *CD4/CD8-Ratio* für Patient*innen mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Hypopharynx, und der Tonsillen untersuchten Wansom et al., 2010. Hier erhielten die Patient*innen vor einer Tumorsektion oder einer *RCTx*, abweichend vom Protokoll der *HNprädBio*-Studie,

eine neoadjuvante Chemotherapie. Patient*innen mit einer niedrigeren *CD4/CD8-Ratio* im peripheren Blut zeigten dabei ein signifikant besseres Ansprechen auf das neoadjuvante Konzept. Der Einfluss auf das Gesamtüberleben über ein *Follow-up* von 84 Monaten war indes nicht signifikant. Diese Beobachtung einer tendenziell erhöhten *CD4/CD8-Ratio* bei Patient*innen, die später ein Rezidiv entwickelten, deutete sich auch in der vorliegenden Arbeit an (Abschn. 3.2), wenngleich hier keine neoadjuvante Therapie erfolgt war. Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer Arbeit von Tao et al., 2016. Hier war eine erhöhte *CD4/CD8-Ratio* ($\geq 1,77$) abhängig vom Nodalstatus mit einem höheren metastasenfrem 5-Jahresüberleben von Patient*innen mit Nasopharynxkarzinom verbunden. Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse mögen Ausdruck der Notwendigkeit einer wesentlich individuelleren Betrachtung von Tumorlokalisationen und Tumoreigenschaften sein. Neben der Analyse der Lymphozyten im Blut wäre hier, wie bereits weiter oben ausgeführt, ein Vergleich mit Tumorgewebe für die Bewertung hilfreich. So untersuchten Borsetto et al., 2021 im Rahmen einer Metaanalyse den Einfluss tumorinfiltrierender $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten auf das Gesamtüberleben. Dabei zeigten beide Subpopulationen, abhängig von der Lokalisation des Tumors und der Lokalisation der Immunzellen im Tumor selbst, jeweils unabhängig voneinander eine Verbesserung des Gesamtüberlebens. Daneben hängt der prognostische Nutzen der beiden Populationen deutlich vom HPV-Status des/der Patient*in ab. (Abschn. 1.2.2) Das Verhältnis der beiden Zelltypen zueinander (*CD4/CD8-Ratio*) selbst, wurde indes in der Metaanalyse von Borsetto et al. nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse unterstreichen aber die Bedeutung einer individuellen Betrachtung einer Kombination zahlreicher Parameter wie der Tumorgröße, der Tumorlokalisation und des HPV-Status.

Den Veränderungen der Zellpopulationen hin zur verstärkten zellulären Immunabwehr steht ein signifikanter Anstieg der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) im Verhältnis zu den $CD4^+$ T-Lymphozyten in der Gruppe **NR** gegenüber. Diese eher hemmend auf die zelluläre Abwehr wirkende Gruppe scheint den anderen Beobachtungen auf den ersten Blick zuwiderzulaufen. Auf der einen Seite könnte es sich hier um einen negativen Feedbackmechanismus handeln, der eine überschießende Immunreaktion verhindert. Auf der anderen Seite wäre aber auch eine Resistenz der T_{reg} gegenüber der RCTx denkbar. Schuler et al., 2013 verglichen diesbezüglich peripheres Blut von *HNSCC*-Patient*innen, die eine adjuvante RCTx erhalten hatten, einerseits mit dem von noch nicht therapierten Patient*innen und andererseits mit dem eines gesunden Normalkollektivs. Auch hier wurde für RCTx-therapierte

Patient*innen, neben einer signifikanten Reduktion der oben bereits diskutierten CD4/CD8-Ratio bei Verminderung der CD4⁺ und gleichzeitigem Anstieg der CD8⁺ T-Lymphozyten, eine Erhöhung des Anteils der regulatorischen T-Zellen beobachtet. Schuler et al. vermuten dabei eine Resistenz der T_{reg} und der T_C gegenüber der RCT_x, während CD4⁺ Lymphozyten eher sensibel auf Bestrahlung und Chemotherapie reagieren. Die Einordnung dieser Beobachtung fällt angesichts der teils widersprüchlichen Literatur schwer. So stellten Seminerio et al. fest, dass eine Erhöhung der T_{reg} mit einem statistisch signifikanten verlängerten rezidivfreien Überleben einhergeht. (Seminerio et al., 2019) Die Kontroverse diesbezüglich wird in einer Metaanalyse von Liu et al. aus dem Jahr 2015 deutlich. Hier konnte für tumorinfiltrierende regulatorische T-Zellen keine klare Aussage bzgl. des prognostischen Nutzens im Zusammenhang mit HNSCC gemacht werden. Bei anderen Tumoren wie etwa Lungen- und Magenkarzinomen sowie Melanomen, war das rezidivfreie Überleben bei einem hohen Anteil an T_{reg} signifikant reduziert, während eine Erhöhung der T_{reg} bei kolorektalen Karzinomen und Endometrium-Karzinomen protektiv zu wirken schien. Darüber hinaus wird eine exakte Bewertung dadurch erschwert, dass sich die Definition der Population der T_{reg} im Laufe der Zeit immer wieder verändert hat. So wurden in frühen Arbeiten noch gelegentlich sämtliche CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten als regulatorische T-Zellen bezeichnet, was die Rolle von CD25 als Aktivitätsmarker nach dem heutigen Stand sicherlich nicht ausreichend berücksichtigt. (Siehe Feinerman et al., 2010.) Darüber hinaus existieren mittlerweile zahlreiche verschiedene Marker zur Identifikation der T_{reg}, deren Gating in FACS™ -Analysen teilweise zu völlig unterschiedlichen Zellzahlen und damit auch Verhältnissen führt. (Rodríguez-Perea et al., 2016; Santegoets et al., 2015) In der vorliegenden Arbeit wird bei der Betrachtung der CD25-Expression explizit zwischen CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ und CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Lymphozyten unterschieden. So stieg die Expression von CD25 auf CD4⁺FoxP3⁻ T-Lymphozyten in der Gruppe **NR** im Verlauf der Nachbeobachtung leicht an. In der Gruppe **R** hingegen war die Expression dieses Oberflächenantigens bereits während der Therapie erhöht und blieb im Verlauf der Nachuntersuchung auf hohem Niveau stabil. Gleiches galt für die *Mean Fluorescence Intensity* des an APC-gekoppelten Antikörpers gegen CD25. Der detaillierte Vergleich der Gruppen **N**, **NR** und **R** bzgl. der CD25-Expression wird weiter unten diskutiert.

Aus einem weiteren Grund ist der Vergleich der peripheren Lymphozyten mit den tumorinfiltrierenden Zellen in Biopsaten des Primärtumors im weiteren Verlauf der *HNprädBio*-Studie von Bedeutung. Es stellt sich ja grundsätzlich die Frage, wie das

Zellbild im peripheren Blut im Bezug zur Infiltration des Tumors durch gleichartige Lymphozytenpopulationen einzuordnen ist. - Handelt es sich dabei beispielsweise um eine Art „Spiegelbild“ der tumorinfiltrierenden Zellen, würde dies bedeuten, dass Zellen, die in der Peripherie erhöht sind, auch im Tumor selbst vermehrt vorkommen. - Würde sich in der Peripherie hingegen eher ein „Negativbild“ zeigen, so wären im Tumor kumulierende Abwehrzellen in der Peripherie erniedrigt. Diese Frage lässt sich allein durch Korrelation von Immunzellen in Tumorgewebe mit peripherem Blut von ein und demselben Individuum, bei gleichem Entnahmezeitpunkt beider Proben, sicher beantworten. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit standen, wie bereits erwähnt, keine Gewebeproben zur Verfügung, so dass diese Einordnung zunächst entfallen muss. Erst eine Gesamtanalyse aller Daten der *HNprädi-Bio*-Studie, unter Mitbeurteilung der in den teilnehmenden Zentren asservierten Präparate, wird hier Aufschluss geben. Wäre nun tatsächlich eine starke positive oder eine starke negative Korrelation zwischen tumorinfiltrierenden Lymphozyten und peripheren Blutzellen der gleichen Art nachweisbar, so könnte zukünftig, gegebenenfalls mittels einer Blutuntersuchung, vom einen auf das andere geschlossen werden. Balermipas et al., 2016 attestierten, wie später Borsetto et al., im Rahmen einer anderen Studie des DKTK, tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Lymphozyten bei *HNSCC* einen positiven Einfluss auf das progressionsfreie und metastasenfremie Überleben sowie auf das Gesamtüberleben nach adjuvanter *RCTx*. Würde beispielsweise diese erhöhte Anzahl CD8⁺ T-Zellen im Tumor mit dem Anteil CD8⁺ Lymphozyten im peripheren Blut korrelieren, so könnte über den Nachweis im Blut indirekt auf die Verhältnisse im Tumor geschlossen werden. Die peripheren CD8⁺ T-Lymphozyten im Blut wären damit ein möglicher prognostischer Marker. Über eine rein spekulative Einschätzung wird in dieser Dissertationsarbeit jedoch nicht hinausgegangen. Insgesamt entsprechen die Beobachtungen der FACSTM-Analyse größtenteils den gemäß anderen Studien zu erwartenden Veränderungen der lymphozytären Subpopulationen im Verlauf einer kombinierten Radiochemotherapie. (Balermipas et al., 2016; Schuler et al., 2013)

Der Prognostische Nutzen der CD25-Expression

Das Ziel dieser Arbeit ist, wie oben ausgeführt, die Evaluation der CD25-Expression als prognostischer Marker im Sinne eines radiobiologischen Profilings. Nachdem die im Verlauf der *RCTx* zu beobachtenden Veränderungen der Lymphozytenpopulationen diskutiert wurden, soll nun eine Einordnung des prognostischen Nutzens im direkten Vergleich der untersuchten Kollektive erfolgen.

Um die Rolle des CD25 vollständig einordnen zu können, wurden über die *FACS™* - Analyse hinaus zwei weitere Experimente durchgeführt. Einerseits wurde die Konzentration seines Liganden, des Interleukin 2 und andererseits die seiner löslichen Form sIL2-R α quantitativ bestimmt. IL2 war im Plasma der Patient*innen und des gesunden Probanden praktisch nicht nachweisbar. Möglicherweise ist IL2, das ja eher ein autokrin und parakrin wirkendes Zytokin ist, im peripheren Blut zu stark verdünnt, um sicher detektierbare Konzentrationen zu erreichen. Verschiedene Arbeiten beschäftigten sich zwar bereits mit der IL2-Konzentration in peripherem Blut, hier wurde jedoch meist Serum, statt Plasma verwendet (Bussu et al., 2018). Es scheint, als interferiere IL2 mit Plasma stärker als mit Serum, dem ja ein großer Teil der Gerinnungsfaktoren entzogen wurde. - Für eine Beeinflussung durch das Probenmaterial spricht auch die Beobachtung, dass bei Zugabe von IL2-Standard zum Plasma eines gesunden Probanden, die IL2-Konzentration deutlich niedriger gemessen wurde, als rechnerisch zu erwarten gewesen wäre (Abschn. 3.5). Guo et al., 2013 analysierten verschiedene Zytokine in diversem Probenmaterial. Auch hier zeigten sich Unterschiede zwischen den Konzentrationen von IL2 in Serum und Plasma. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte allerdings unter Verwendung eines *Biochips* statt mittels *ELISA*. Die Ergebnisse der *ELISAs* suggerieren, dass IL2 im Blut für die Überwachung nach einer Therapie bei *HNSCC*, zumindest mit der hier angewandten Methodik, nicht geeignet ist.

Die Ergebnisse des *ELISA* zur Konzentrationsbestimmung des im Blut gelösten CD25 (sIL2-R α) zeigten eine über den gesamten Zeitraum der Nachbeobachtung reproduzierbare Nachweisbarkeit dieses Markers. Eine Korrelation mit der CD25-Expression auf den verschiedenen T-Lymphozyten ergab indes keinen signifikanten Zusammenhang. Eine positive Korrelation hätte hier beispielsweise auf einen erhöhten Umsatz von CD25 schließen lassen können. Auch waren bei individuell zum Teil sehr unterschiedlichen Verläufen der sIL2-R α -Konzentration keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen **NR** und **R** feststellbar. Die plötzlich zum Zeitpunkt *R5* abgefallene und an den Wert des gesunden Probanden angegliche Konzentration bei allen 4 Rezidivpatient*innen ist wohl am ehesten, wie bereits erwähnt, auf einen technischen Fehler bei der Bearbeitung zurückzuführen. So bleibt die Rolle von sIL2-R α , im Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit, unklar. Schiegnitz et al., 2018 beschreiben allerdings für Patient*innen mit oralen Plattenepithelkarzinomen eine signifikante Erhöhung dieses Markers gegenüber einem gesunden Normalkollektiv und einen negativen Zusammenhang hoher Konzentrationen mit dem Gesamtüberleben. So ist sIL2-R α womöglich bei der primären

Diagnosestellung von größerer Bedeutung als bei der Rezidivüberwachung, zumal die Konzentrationen dieses Markers im Blut von 7 der 8 *HNSCC*-Patient*innen zu den Zeitpunkten *R0-R3* bzw. *R4* deutlich über der Konzentration des gesunden Probanden lagen. Eine schließende Statistik lässt die geringe Zahl an Proband*innen hier selbstverständlich nicht zu. Darüberhinaus dürfte sIL2-R α , genauso wie die zellständige Form, zu unspezifisch für das *HNSCC* sein, um als Screening-Instrument dienen zu können.

Die in Abschnitt 3.2 dargestellten Beziehungen zwischen den T_{reg} und den übrigen CD25⁺ T-Lymphozyten unterstützen das von Feinerman et al., 2010 beschriebene Modell eines „Tauziehens“ (*engl. tug-of-war*) der IL2-assoziierten CD25⁺ Zellgruppen. Der Mechanismus um Interleukin 2 kann die Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit bei lediglich mittelstarker Korrelation allerdings nur teilweise erklären. Feinerman et al., 2010 machen in ihrer Publikation deutlich, dass sich der Einfluss von T_{reg} auf schwach aktivierte T-Effektorzellen beschränkt. Demnach wären T-Zellen, die unter dem Einfluss einer starken Aktivierung durch Antigene stehen, aus diesem Mechanismus weitgehend losgelöst, da sie mehr CD25 exprimieren als die weniger stark aktivierten Lymphozyten und folglich auch für geringere IL2-Konzentrationen sensibel sind. (Abschn. 1.3.3) Dies könnte auch den tendenziell geringeren Anteil der T_{reg} an den CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten bei den Rezidivpatient*innen erklären. Stark aktivierte T-Effektorzellen proliferieren und exprimieren CD25 folglich unabhängig vom Einfluss der FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen. Damit sind sie schließlich, relativ gesehen, in der Überzahl (Abb. 20, Abschn. 3.3). Die Unterschiede zwischen den Kollektiven **NR** und **R** waren bezüglich der regulatorischen T-Zellen nach der hier verwendeten Definition (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) nicht statistisch signifikant. Einzig die CD8/T_{reg}-Ratio unterschied sich bei den Patient*innen der Gruppe **R** zum Zeitpunkt *R5* signifikant von jener der Patient*innen ohne Rezidiv zu den Zeitpunkten *R2* und *R3*. Hier zeigt sich sicherlich einerseits der von Schuler et al., 2013 beschriebene prognostische Nutzen der CD8/T_{reg}-Ratio. Andererseits wird der Vorteil einer auf die zelluläre Abwehr ausgerichteten Aktivierung des Immunsystems in Bezug auf die Rezidiventstehung bei *HNSCC* herausgestellt.

In den Ergebnissen der *FACS™* -Analyse des peripheren Blutes der Studienkollektive zeigte sich ein statistisch signifikant erhöhter Anteil CD25⁺ T-Helferzellen sowie CD25⁺ zytotoxischer T-Zellen bei Diagnose eines Rezidivs gegenüber den vergleichbaren Zeitpunkten von Patient*innen ohne Rezidiv. Damit kann die Expression des zellständigen CD25 durchaus das Vorliegen eines Rezidivs suggerieren,

ist somit als prognostischer Faktor zu bezeichnen und bietet sich als Teilinstrument einer posttherapeutischen Überwachung an. Interessanterweise war darüber hinaus der Anteil der CD25⁺ T-Helferzellen bei den Rezidivpatient*innen bereits während der RCTx im Vergleich zu den Patient*innen ohne Rezidiv signifikant erhöht. Diese gesteigerte Expression von CD25, die sich auch in Form einer höheren *Mean fluorescence intensity* präsentierte, bleibt bei den betreffenden Patient*innen bis zur Entdeckung des Rezidivs bestehen. Gleiches gilt, wenn auch in geringerem Ausmaß, für die Expression von CD25 auf den zytotoxischen T-Zellen. Noch vor der Diagnose des Rezidivs war der Anteil der CD25⁺ zytotoxischen T-Zellen gegenüber den Patient*innen ohne Rezidiv signifikant erhöht. Hier zeigt sich wiederum der prognostische Wert der CD25-Expression. (Abb. 19, Abschn. 3.3) Fasst man CD25, die zellständige α -Untereinheit des IL2-Rezeptors (IL2-R α) ohne gleichzeitige Expression von FoxP3 als Aktivitätsmarker auf (Abschn. 1.3.3), so sind diese Beobachtungen am ehesten als verstärkte Aktivierung der T_H und T_C bei den Patient*innen zu werten, die später ein Rezidiv entwickelten. Auch hier wäre wiederum ein Vergleich mit den Lymphozyten im Tumor wünschenswert, da sich natürlich die Frage stellt, ob auch die infiltrierenden Zellen der Rezidivpatient*innen dieses Oberflächenantigen verstärkt exprimieren. Die meisten Arbeiten zu tumorinfiltrierenden Zellen beschäftigen sich indes bei der Betrachtung von CD25 im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen in erster Linie mit der bereits diskutierten Subpopulation der T_{reg}. Intuitiv scheint die Vorstellung, dass diese Zellgruppe ob ihrer immunsuppressiven Wirkung eine Aggravation der Erkrankung, insbesondere durch Hemmung einer Antitumorabwehr, bewirken kann. Was, wie ebenfalls bereits ausgeführt, im Zusammenhang mit HNSCC bisher weder sicher bestätigt noch widerlegt werden konnte.

Dass das Zusammenspiel der einzelnen Aktoren rund um IL2 und seinen Rezeptor wesentlich komplexer ist, findet in neueren Publikationen auch zu anderen, zum Teil benignen Erkrankungen, durchaus Beachtung. So beschäftigten sich Meng et al., 2019 dezidiert mit der Rolle der einzelnen CD25⁺ T-Lymphozyten im Zusammenhang mit der akuten exacerbierten COPD. Hier konnte mittels eines sehr ähnlichen Ansatzes unter Verwendung der FACSTM-Technik nachgewiesen werden, dass die Hochregulation von CD25 allein und CD25 in Kombination mit FoxP3 auf CD4⁺ T-Lymphozyten des peripheren Blutes als Indikator zur Unterscheidung einer stabilen und einer exacerbierten COPD geeignet sind. In ROC-Analysen zeigte sich hier unter dem Studienkollektiv für CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ Zellen eine AUC von 0,687 (95% KI 0,5-0,86) und für CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ eine AUC von 0,869 (95% KI 0,746-

0,992). Die Tatsache, dass beide Untergruppen unabhängig voneinander als Indikator geeignet schienen, zeigt wiederum, dass es wichtig ist, die IL2-dependente Subgruppen der T-Lymphozyten einzeln und als Ganzes zu betrachten. So wurden durch Meng et al. in einem *in-vitro* Experiment CD4⁺ T-Lymphozyten mit einem monoklonalen CD28-Antikörper unter Anwesenheit von IL2 inkubiert. Innerhalb von 7 Tagen kam es zu einer massiven Expression von CD25 auf diesen Zellen und einer etwas verzögerten Expression von FoxP3. Hier wurde geschlossen, dass sich auch zunächst FoxP3⁻ T-Lymphozyten unter Aktivierung zu regulatorischen T-Zellen wandeln können. Das heißt, dass Lymphozyten, die zunächst nur CD25⁺ waren, im Verlauf von ihrer ursprünglich aktivierenden Funktion zu einer supprimierenden wechseln können. Eine Tatsache, die abermals die Komplexität des Systems und die Fähigkeit zur Selbstregulation unterstreicht. Auch in Bezug auf maligne Erkrankungen werden die Betrachtungen CD25-positiver Lymphozytenpopulationen immer differenzierter. So stellte sich ein erhöhter Anteil an CD25⁺ T_H bei Urothelkarzinomen der Blase, neben der Tumorausdehnung in der Computertomographie, als starker negativer prognostischer Faktor heraus (R.-J. Wang et al., 2019). Im Zusammenhang mit HNSCC sind Publikationen, die zwischen CD25⁺ nicht-regulatorischen T-Zellen und tatsächlichen T_{reg} unterscheiden noch selten. So befassten sich (Boucek et al., 2010), genau wie diese Dissertationsarbeit, mit den Lymphozytenpopulationen des peripheren Blutes von HNSCC-Patient*innen. Hier wird der Anteil der „regulatorischen T-Zellen“ an den CD4⁺ T-Lymphozyten von Patient*innen mit Rezidiv und Patient*innen ohne Rezidiv verglichen. Demzufolge ist der Anteil der T_{reg} bei Rezidivpatient*innen erhöht. Interessanterweise war, wie durch Boucek et al., 2010 erläutert wird, zum Zeitpunkt der Studie kein monoklonaler Antikörper zur Bindung an FoxP3 verfügbar, so dass man, in der Annahme, der Großteil der CD25⁺ T_H seien ohnehin T_{reg}, diese Population als Ganzes als „regulatorische T-Zellen“ bezeichnete. Eine weitere Differenzierung in FoxP3⁺ und FoxP3⁻ CD25⁺CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgte, aus dem genannten Grund, nicht. Damit decken sich die Ergebnisse von Boucek et al., 2010 weitestgehend mit denen dieser Arbeit. Auch hier war bei den Rezidivpatient*innen die Population der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten gegenüber den Patient*innen ohne Rezidiv signifikant erhöht. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit jedoch eine weitere Unterteilung der CD25⁺ T-Zellen mittels der Anfärbung von FoxP3 erfolgen. Nicht unerwähnt darf bleiben, dass bei der zitierten Arbeit nicht nur Patient*innen nach primärer Radiochemotherapie untersucht wurden, sondern dass hier alle verfügbaren Therapiekonzepte und Stadien eingeschlossen wurden. Damit ist eine direkte Vergleichbarkeit nur begrenzt gegeben.

In den ROC-Analysen fand sich durchaus eine Diskriminierbarkeit zwischen den Kollektiven **NR** und **R** bezüglich der CD25-Expression. Besonders der Vergleich des Zeitpunktes *R2* und *R3* des Kollektivs **NR** mit dem Zeitpunkt *R5* der Gruppe **R** ergab akzeptable *AUC* von 0,775-0,768. Die Gegenüberstellung zweier verschiedener Analysezeitpunkte mag zunächst willkürlich erscheinen. Aufgrund der weiten Streuung des Zeitpunktes *R5* in der Gruppe der Patient*innen mit Rezidiv, überschneidet sich dieses Intervall jedoch zu einem großen Teil mit dem Zeitpunkt *R3* des Kollektivs **NR** (Abbildung 2 **B**). Darüber hinaus war in Bezug auf die CD25-Expression auf Lymphozyten bereits während der RCTx zum Zeitpunkt *R1* auf der einen Seite ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patient*innen die später ein Rezidiv entwickelten und solchen, bei denen dies nicht der Fall war, festzustellen. Hier war auch in der ROC-Analyse (Abbildung 23 **B**) eine gute Diskriminierbarkeit mit einer *AUC* von 0,839, bei einer Entscheidung für ein Rezidiv im Falle eines Anteils CD25-positiver Zellen von > 27,6% an den CD4⁺ T-Lymphozyten, auszumachen. Möglicherweise zeigt sich bereits hier eine unterschiedliche Reaktion des zellulären Immunsystems, die im späteren Verlauf relevant für die Entstehung eines Rezidivs ist bzw. die Wahrscheinlichkeit eines residuellen Befundes erhöht. Korrelationsanalysen mit Parametern wie dem Lymphknotenstatus und der Tumorgroße sind, sobald möglich, dringend notwendig. Bei den hier dargestellten ROC kann es sich nur um eine Abschätzung der tatsächlichen Gütekriterien handeln. Zumal die Eignung der jeweiligen Parameter zur endgültigen Beurteilung einer prospektiven Validierung bedarf. Außerdem sind die gefundenen *AUC* nicht hoch genug, um die CD25-Expression als alleinigen prognostischen Marker geeignet erscheinen zu lassen. Denkbar ist jedoch die Kombination dieses Parameters mit anderen, unter Umständen tumorspezifischeren Parametern, wie dem Nodalstatus und der Tumorausdehnung. Aufgrund der vielen Faktoren, welche die CD25-Expression beeinflussen, sind diese Werte allerdings vorsichtig zu betrachten. Insofern ist diese Arbeit in erster Linie als Voruntersuchung zur Gesamtstudie *HNprädBio* zu sehen. Hier wird bei einem größeren Kollektiv und dem Vorhandensein der *Baseline-Charakteristiken* der Patient*innen eine wesentlich präzisere Aussage möglich sein.

5 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die CD25-Expression auf T-Lymphozyten im Blut von Patient*innen die an Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Hypopharynx leiden, als möglichen prognostischen Marker im Verlauf einer primären kombinierten Radiochemotherapie zu evaluieren. Die Blutproben wurden im Rahmen der *HNprädBio*-Studie des DTKK gewonnen und mittels *FACS™* sowie ELISAs die Anteile CD25⁺ lymphozytärer Subpopulationen und die Konzentration der löslichen Form des CD25, des sIL2-R α und seines Liganden Interleukin 2 (IL2) bestimmt. Als Studienkollektiv dienten einerseits Patient*innen, bei denen während des Beobachtungszeitraumes kein Rezidiv auftrat (**NR**) und solche, die nach der Therapie ein Rezidiv entwickelten (**R**). In den durchgeführten Versuchen zeigten sich im Bezug auf die CD25-Expression statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. So trat dieser Marker vermehrt, bereits frühzeitig im Behandlungsverlauf, auf T-Helferzellen von Patient*innen, die später ein Rezidiv entwickelten, auf. Darüber hinaus wurde, gemäß dem Modell von Feinerman et al., 2010, eine Korrelation zwischen dem Anteil der regulatorischen T-Zellen und der Expression von CD25 auf Effektor-T-Zellen in beiden Kollektiven dargestellt. Die vorliegenden Ergebnisse in Kombination mit denen anderer Publikationen zeigen, dass die Interaktion verschiedener CD25-positiver T-Zellpopulationen als selbst regulierendes System verstanden werden muss. Zahlreiche Arbeiten betrachten lediglich die regulatorischen T-Zellen bezüglich ihrer hemmenden Funktion und lassen andere CD25-positive Populationen außen vor. Dies ergibt jedoch nur ein unvollständiges Bild des Spiels von Aktivierung und Suppression und damit der Funktionalität des Gesamtsystems rund um IL2. Nach den vorliegenden Untersuchungen könnte CD25 als prognostisches Instrument bei der Nachsorge primär *RCTx*-therapierter *HNSCC*-Patient*innen dienen. Die durchgeführten ROC-Analysen suggerieren jedoch, dass dies allein nicht ausreicht, um eine befriedigende Sensitivität und Spezifität bei der Unterscheidung von Patient*innen mit und ohne Rezidiv zu erzielen. - Es sollte daher eine Kombination mit anderen Markern bzw. individuellen Charakteristiken (z.B. Tumorgröße und Nodalstatus) erfolgen. Auch ein Score, z.B. unter Verwendung der CD25⁺ T-Helferzellen oder zytotoxischen T-Lymphozyten als Parameter, wäre denkbar. Vorher müssen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch mittels Untersuchung weiterer Patient*innen verifiziert werden. Genau das wird die *HNprädBio*-Studie als Ganzes leisten und damit wichtige neue Erkenntnisse bezüglich immunologischer Marker im Zusammenhang mit *HNSCC* liefern.

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S., Sharma, S. C. & N Das, S. (2017). Dynamics of regulatory T cells (Tregs) in patients with oral squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 116(8), 1103–1113. <https://doi.org/10.1002/jso.24782>
- Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 32–41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
- Armstrong, R. A. (2014). When to use the bonferroni correction. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 34(5), 502–508. <https://doi.org/10.1111/opo.12131>
- Balermipas, P., Rödel, F., Rödel, C., Krause, M., Linge, A., Lohaus, F., Baumann, M., Tinhofer, I., Budach, V., Gkika, E., Stuschke, M., Avlar, M., Grosu, A.-L., Abdollahi, A., Debus, J., Bayer, C., Stangl, S., Belka, C., Pigorsch, S., ... Fokas, E. (2016). CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *International Journal of Cancer*, 138(1), 171–181. <https://doi.org/10.1002/ijc.29683>
- Beltz, A., Gösswein, D., Zimmer, S., Stauber, R. H., Hagemann, J., Strieth, S., Matthias, C. & Künzel, J. (2018). [Staging of oropharyngeal carcinomas : New TNM classification as a challenge for head and neck cancer centers]. *HNO*, 66(5), 375–382. <https://doi.org/10.1007/s00106-018-0499-0>
- Borsetto, D., Tomasoni, M., Payne, K., Polesel, J., Deganello, A., Bossi, P., Ty-some, J. R., Masterson, L., Tirelli, G., Tofanelli, M. & Boscolo-Rizzo, P. (2021). Prognostic Significance of CD4+ and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cancers*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/cancers13040781>
- Boucek, J., Mrkvan, T., Chovanec, M., Kuchar, M., Betka, J., Boucek, V., Hladikova, M., Betka, J., Eckschlager, T. & Rihova, B. (2010). Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(1), 426–433. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00650.x>
- Bussu, F., Graziani, C., Gallus, R., Cittadini, A., Galli, J., de Corso, E., di Cintio, G., Corbi, M., Almadori, G., Bininsegna, A., Paludetti, G. & Sgambato, A. (2018). IFN-gamma and other serum cytokines in headand neck squamous cell carcinomas. *ACTA OTORHINOLARYNGOLOGICA ITALICA*, 94–102. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-1530>

- Chatfield, M. & Mander, A. (2009). The skillings–mack test (friedman test when there are missing data). *The Stata Journal*, 9(2), 299–305. <https://doi.org/10.1177/1536867X0900900208>
- Chen, C., Rowell, E. A., Thomas, R. M., Hancock, W. W. & Wells, A. D. (2006). Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *The Journal of biological chemistry*, 281(48), 36828–36834.
- Chen, Q., Kim, Y. C., Laurence, A., Punksody, G. A. & Shevach, E. M. (2011). IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(11), 6329–6337. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100061>
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D. & Rudensky, A. Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nature Immunology*, 17(11), 1322–1333. <https://doi.org/10.1038/ni.3540>
- Cole, D. K. & Gao, G. F. (2004). CD8: adhesion molecule, co-receptor and immunomodulator. *Cellular & Molecular Immunology*, 1(2), 81–88.
- Comans-Bitter, W. M., de Groot, R., van den Beemd, R., Neijens, H. J., Hop, W. C., Groeneveld, K., Hooijkaas, H. & van Dongen, J. J. (1997). Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *The Journal of Pediatrics*, 130(3), 388–393. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(97\)70200-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(97)70200-2)
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlaschi, V., Liotta, F. & Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 85(1), 36–42. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22348>
- Cossarizza, A., Chang, H.-D., Radbruch, A., Akdis, M., Andra, I., Annunziato, F., Bacher, P., Barnaba, V., Battistini, L., Bauer, W. M., Baumgart, S., Becher, B., Beisker, W., Berek, C., Blanco, A., Borsellino, G., Boulais, P. E., Brinkman, R. R., Buscher, M., ... Zimmermann, J. (2017). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European journal of immunology*, 47(10), 1584–1797. <https://doi.org/10.1002/eji.201646632>
- Denaro, N., Russi, E. G. & Merlano, M. C. (2018). Pros and Cons of the New Edition of TNM Classification of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*, 95(4), 202–210. <https://doi.org/10.1159/000490415>

- Destatis. (2019). Todesursachenstatistik Deutschland 1980 und 2017 - GENESIS-Online Datenbank des Statistischen Bundesamtes [Aufgerufen am 14.09.2019]. Statistisches Bundesamt. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/>
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A. & Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, *100*(4), 261–269. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn011>
- Feinerman, O., Jentsch, G., Tkach, K. E., Coward, J. W., Hathorn, M. M., Sneddon, M. W., Emonet, T., Smith, K. A. & Altan-Bonnet, G. (2010). Single-cell quantification of IL-2 response by effector and regulatory T cells reveals critical plasticity in immune response. *Molecular Systems Biology*, *6*(437). <https://doi.org/10.1038/msb.2010.90>
- Fox, J. & Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression* (Third Edition). Thousand Oaks CA, Sage Publications. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J. & Caligiuri, M. A. (2017). The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*, *47*(5), 820–833. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.008>
- Friedman, M. (1937). The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance. *Journal of the American Statistical Association*, *32*(200), 675–701. <https://doi.org/10.1080/01621459.1937.10503522>
- Gan, S. D. & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of investigative dermatology*, *133*(9), e12. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Gavin, M. A., Torgerson, T. R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W. Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E. L., Greenberg, P. D., Ochs, H. D. & Rudensky, A. Y. (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(17), 6659–6664. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509484103>
- Guo, G.-H., Dong, J., Yuan, X.-H., Dong, Z.-N. & Tian, Y.-P. (2013). Clinical evaluation of the levels of 12 cytokines in serum/plasma under various storage conditions using evidence biochip arrays. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1263>

- Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology*, 21, 107–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>
- Holmes, B. J., Maleki, Z. & Westra, W. H. (2015). The Fidelity of p16 Staining as a Surrogate Marker of Human Papillomavirus Status in Fine-Needle Aspirates and Core Biopsies of Neck Node Metastases: Implications for HPV Testing Protocols. *Acta cytologica*, 59(1), 97–103. <https://doi.org/10.1159/000375148>
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), 1057–1061. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Waldeyer-Sauerland, M., Waldmann, A., Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., ... Wolf, U. (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014. *Berlin*, Robert Koch Institut. <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2017-007>
- Krause, M., Combs, S., Grosu, A.-L., Debus, J., Zips, D., Belka, C., Rödel, C., Stuschke, M., Budach, V. & Schreiber, A. (2014). Observational Study on Biomarkers in Head and Neck Cancer (HNprädBio), NCT number: NCT02059668 [Aufgerufen am 22.09.2019]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02059668?term=NCT02059668&rank=1>
- Krshnan, L., Park, S., Im, W., Call, M. J. & Call, M. E. (2016). A conserved alphabeta transmembrane interface forms the core of a compact T-cell receptor-CD3 structure within the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), E6649–E6658. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611445113>
- Lindqvist, C. A., Christiansson, L. H., Simonsson, B., Enblad, G., Olsson-Strömberg, U. & Loskog, A. S. I. (2010). T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. *Immunology*, 131(3), 371–376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03308.x>
- Louati, N., Rekik, T., Menif, H. & Gargouri, J. (2019). Blood lymphocyte T subsets reference values in blood donors by flow cytometry. *La Tunisie Medicale*, 97(2), 327–334.

- Lu, L., Barbi, J. & Pan, F. (2017). The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nature reviews. Immunology*, *17*(11), 703–717. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.75>
- Ma, C. S., Deenick, E. K., Batten, M. & Tangye, S. G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine*, *209*(7), 1241–1253. <https://doi.org/10.1084/jem.20120994>
- Mendes, R., Bromelow, K. V., Westby, M., Galea-Lauri, J., Smith, I. E., O'Brien, M. E. & Souberbielle, B. E. (2000). Flow cytometric visualisation of cytokine production by CD3-CD56+ NK cells and CD3+CD56+ NK-T cells in whole blood. *Cytometry*, *39*(1), 72–78. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(20000101\)39:1<72::aid-cyto10>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(20000101)39:1<72::aid-cyto10>3.0.co;2-r)
- Meng, Z.-J., Wu, J.-H., Zhou, M., Sun, S.-W., Miao, S.-Y., Han, H.-L., Chen, L. & Xiong, X.-Z. (2019). Peripheral blood CD4+ T cell populations by CD25 and Foxp3 expression as a potential biomarker: reflecting inflammatory activity in chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, *14*, 1669–1680. <https://doi.org/10.2147/COPD.S208977>
- Metz, C. E. (1978). Basic principles of ROC analysis. *Seminars in nuclear medicine*, *8*(4), 283–298. [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(78\)80014-2](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(78)80014-2)
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G. & Sakaguchi, S. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, *30*(6), 899–911. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019>
- Morikawa, H. & Sakaguchi, S. (2014). Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunological reviews*, *259*(1), 192–205. <https://doi.org/10.1111/imr.12174>
- Narendra, B. L., Reddy, K. E., Shantikumar, S. & Ramakrishna, S. (2013). Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research*, *62*(9), 823–834. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0645-9>
- Nicholson, J. K., Jones, B. M., Cross, G. D. & McDougal, J. S. (1984). Comparison of T and B cell analyses on fresh and aged blood. *Journal of Immunological Methods*, *73*(1), 29–40. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(84\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(84)90028-0)

- Ostertagova, E., Ostertag, O. & Kovavc, J. (2014). Methodology and Application of the Kruskal-Wallis Test. *Applied Mechanics and Materials*, 611, 115–120. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.611.115>
- Owen, G. R., Channell, J. A., Forsyth, V. T., Haertlein, M., Mitchell, E. P., Capovilla, A., Papathanasopoulos, M. & Cerutti, N. M. (2016). Human CD4 Metastability Is a Function of the Allosteric Disulfide Bond in Domain 2. *Biochemistry*, 55(15), 2227–2237. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00154>
- Park, E., Cho, M. & Ki, C.-S. (2009). Correct use of repeated measures analysis of variance. *The Korean journal of laboratory medicine*, 29(1), 1–9. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.1>
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S. & Cassatella, M. A. (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, 115(2), 335–343. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-216085>
- Perlmann, P. & Engval, E. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- Plitas, G. & Rudensky, A. Y. (2016). Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunology Research*, 4(9), 721–725. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0193>
- Pulendran, B. & Artis, D. (2012). New paradigms in type 2 immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6093), 431–435. <https://doi.org/10.1126/science.1221064>
- R-Core-Team. (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N. & Garcia, K. C. (2005). The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5727), 1477–1480. <https://doi.org/10.1126/science.1109745>
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J.-C. & Müller, M. (2011). pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77>
- Rodríguez-Perea, A. L., Arcia, E. D., Rueda, C. M. & Velilla, P. A. (2016). Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents.

- Clinical and Experimental Immunology*, 185(3), 281–291. <https://doi.org/10.1111/cei.12804>
- Romagnani, S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual review of immunology*, 12, 227–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001303>
- Rudra, D., DeRoos, P., Chaudhry, A., Niec, R. E., Arvey, A., Samstein, R. M., Leslie, C., Shaffer, S. A., Goodlett, D. R. & Rudensky, A. Y. (2012). Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nature Immunology*, 13(10), 1010–1019. <https://doi.org/10.1038/ni.2402>
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(3), 1151–1164.
- Santegoets, S. J. A. M., Dijkgraaf, E. M., Battaglia, A., Beckhove, P., Britten, C. M., Gallimore, A., Godkin, A., Gouttefangeas, C., Gruijl, T. D. d., Koenen, H. J. P. M., Scheffold, A., Shevach, E. M., Staats, J., Tasken, K., Whiteside, T. L., Kroep, J. R., Welters, M. J. P. & Burg, S. H. v. d. (2015). Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 64(10), 1271–1286. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1729-x>
- Schiegnitz, E., Kämmerer, P., Schön, H., Blatt, S., Berres, M., Sagheb, K. & Al-Nawas, B. (2018). Proinflammatory cytokines as serum biomarker in oral carcinoma - A prospective multi-biomarker approach. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 268–274. <https://doi.org/10.1111/jop.12670>
- Schuler, P. J., Harasymczuk, M., Schilling, B., Saze, Z., Strauss, L., Lang, S., Johnson, J. T. & Whiteside, T. L. (2013). Effects of adjuvant chemoradiotherapy on the frequency and function of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for*, 19(23), 6585–6596. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0900>
- Seminario, I., Descamps, G., Dupont, S., Marrez, L. d., Laigle, J.-A., Lechien, J. R., Kindt, N., Journe, F. & Saussez, S. (2019). Infiltration of FoxP3+ Regulatory T Cells is a Strong and Independent Prognostic Factor in Head

- and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/cancers11020227>
- Semrau, R. (2017). The Role of Radiotherapy in the Definitive and Postoperative Treatment of Advanced Head and Neck Cancer. *Oncology research and treatment*, 40(6), 347–352. <https://doi.org/10.1159/000477128>
- Smith, K. A. (1989). The interleukin 2 receptor. *Annual review of cell biology*, 5, 397–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.05.110189.002145>
- Srisuradetchai, P. (2015). The Skillings-Mack Test Statistic for Block Designs with Missing Observations (1.10) [Aufgerufen am 14.08.2019]. <https://cran.r-project.org/web/packages/Skillings.Mack/index.html>
- STIKO. (2018). Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren: Epidemiologisches Bulletin 2018 Nr. 26. Berlin, Robert Koch Institut. <http://www.rki.de/epidbull>
- Sugamura, K., Takeshita, T., Asao, H., Kumaki, S., Ohbo, K., Othani, K. & Nakamura, M. (1992). The IL-2/IL-2 Receptor System: Involvement of a Novel Receptor Subunit, γ Chain, in Growth Signal Transduction. *Journal of Experimental Medicine*, 231–237. <https://doi.org/10.1620/tjem.168.231>
- Tao, C.-J., Chen, Y.-Y., Jiang, F., Feng, X.-L., Jin, Q.-F., Jin, T., Piao, Y.-F. & Chen, X.-Z. (2016). A prognostic model combining CD4/CD8 ratio and N stage predicts the risk of distant metastasis for patients with nasopharyngeal carcinoma treated by intensity modulated radiotherapy. *Oncotarget*, 7(29), 46653–46661. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9695>
- Wang, H. M. & Smith, K. A. (1987). The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *The Journal of experimental medicine*, 166(4), 1055–1069. <https://doi.org/10.1084/jem.166.4.1055>
- Wang, K., Wei, G. & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental hematology and oncology*, 1(1), 36. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-36>
- Wang, R.-J., Liu, W., Mu, X.-Y., Yao, Z.-X., Wu, K., Zheng, Z., Jiang, J.-T., Tan, M.-Y., Sun, F., Fan, J., Wang, X., Zheng, J.-H., He, Y.-Y. & Liu, Z.-H. (2019). Preoperative CD4+CD25+/CD4+ and tumor diameter predict prognosis in male patients with bladder cancer. *Biomarkers in Medicine*, 13(16), 1387–1397. <https://doi.org/10.2217/bmm-2018-0481>
- Wang, X., Rickert, M. & Garcia, K. C. (2005). Structure of the Quaternary Complex of Interleukin-2 with Its alpha, beta, and gamma Receptors. *Science*, 310(5751), 1159–1163. <https://doi.org/10.1126/science.1117893>

- Wansom, D., Light, E., Worden, F., Prince, M., Urba, S., Chepeha, D. B., Cordell, K., Eisbruch, A., Taylor, J., D'Silva, N., Moyer, J., Bradford, C. R., Kurnit, D., Kumar, B., Carey, T. E. & Wolf, G. T. (2010). Correlation of cellular immunity with human papillomavirus 16 status and outcome in patients with advanced oropharyngeal cancer. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, *136*(12), 1267–1273. <https://doi.org/10.1001/archoto.2010.211>
- Waters, R. S., Perry, J. S. A., Han, S., Bielekova, B. & Gedeon, T. (2018). The effects of interleukin-2 on immune response regulation. *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA*, *35*(1), 79–119. <https://doi.org/10.1093/imammmb/dqw021>
- Williams, L. M. & Rudensky, A. Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nature Immunology*, *8*(3), 277–284. <https://doi.org/10.1038/ni1437>
- Winqvist, E., Agbassi, C., Meyers, B. M., Yoo, J. & Chan, K. K. W. (2017). Systemic therapy in the curative treatment of head and neck squamous cell cancer: a systematic review. *Journal of otolaryngology - head and neck surgery*, *46*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s40463-017-0199-x>
- Wolff, K. D., Bootz, F., Beck, J., Bikowski, K., Böhme, P., Budach, W., Burkhardt, A., Danker, H., Eberhardt, W., Engers, K., Fietkau, R., Frerich, B., Gauler, T., Germann, G., Gittler-Hebestreit, N., Grötz, K., Horch, R., Ihrler, S., Keilholz, U., ... Wittlinger, M. (2012). S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom: Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [Aufgerufen am 12.07.2017]. Berlin, AWMW, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007-100OLl_S3_Mundh%C3%B6hlenkarzinom_122012-122015-abgelaufen.pdf
- Wolff, M. J., Leung, J. M., Davenport, M., Poles, M. A., Cho, I. & Loke, P. (2012). TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum. *PLoS one*, *7*(7), e41373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041373>
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L. & Rao, A. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, *126*(2), 375–387. <https://doi.org/10.1126/science.1117893>

Wurdemann, N., Wagner, S., Sharma, S. J., Prigge, E.-S., Reuschenbach, M., Gattenlohner, S., Klusmann, J. P. & Wittekindt, C. (2017). Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *frontiers in Oncology*, 7, 129. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00129>

7 Abbildungsverzeichnis

1	Einteilung der T-Lymphozyten nach ihrer Markerexpression	16
2	Einhaltung der Analysezeitpunkte	24
3	<i>FACS™</i> -Gatingstrategie bei Erstellung des Normalkollektivs	31
4	Gatingstrategie zur Analyse der T- und B-Lymphozyten sowie der NKT- und NK-Zellen	34
5	Gatingstrategie zur Analyse der CD3 ⁺ Lymphozytenpopulationen	35
6	Gating-Strategie bei Überprüfung der Veränderung CD3 ⁺ Zellpopulationen in EDTA-Blut über 3 Tage	38
7	Standardkurven IL2- <i>ELISA</i>	41
8	Standardkurve Interleukin sIL2-R α - <i>ELISA</i>	42
9	CD3 ⁺ Zellpopulationen eines gesunden Normalkollektivs (N)	43
10	CD45 ⁺ Populationen in Region 1	46
11	CD3 ⁺ Populationen in Region 1 - Teil 1	48
12	CD3 ⁺ Populationen in Region 1 - Teil 2	49
13	CD4/CD8-Ratio	50
14	NKT-Zellen	51
15	Darstellung CD3 ⁺ Zellpopulationen als Mengendiagramm	52
16	Korrelation zwischen T _{reg} und CD25 ⁺ T-Effektorzellen	53
17	Zusammenhang zwischen T _{reg} , T-Effektorzellen und deren <i>Mean Fluorescence Intensity</i> zum Zeitpunkt R2	54
18	Problematik bei der objektiven Bestimmung der CD25-Expression	56
19	Vergleich der CD25-Expression auf CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten von Patient*innen mit und ohne Rezidiv	57
20	Vergleich des Anteils der regulatorischen T-Zellen an den CD4 ⁺ Populationen von Patient*innen mit und ohne Rezidiv	58
21	Vergleich der CD8/T _{reg} -Ratio zwischen Patient*innen mit und ohne Rezidiv	59
22	Vergleich der T-Zellpopulationen zwischen den Gruppen N, NR und R zum Analysezeitpunkt R0	60
23	Receiver Operating Characteristics (ROC) zur Detektion von Rezidivpatient*innen - CD25 ⁺ Zellpopulationen	62

24	Receiver Operating Characteristics (ROC) zur Detektion von Rezidivpatient*innen - Mean Fluorescence Intensity (MFI)	63
25	Veränderungen CD3 ⁺ Lymphozytenpopulationen im Verlauf von 75 Stunden nach Blutentnahme	64
26	Konzentration von sIL2-R α in Blutplasma	68
27	Korrelation von sIL2-R α in Plasma mit Expressionsparametern von CD25 auf T-Lymphozyten	70
28	Standardreihe IL2	105
29	Plattenschema Interleukin 2-ELISA	106

8 Tabellenverzeichnis

1	Epidemiologische Maßzahlen zu Tumoren der Mundhöhle und des Rachens für die Jahre 2013 und 2014 in Deutschland	7
2	5-Jahresüberlebensrate bei Patient*innen mit <i>HNSCC</i> in Abhängigkeit vom HPV-Status	9
3	Therapieempfehlungen gemäß S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ von 2012	11
4	Ein- und Ausschlusskriterien der <i>HNprädBio</i> -Studie für Patient*innen mit primärer Radiochemotherapie	22
5	Anzahl der EDTA-Blutproben, aufgeschlüsselt nach Gruppe und Analysezeitpunkt	23
6	Tatsächliche Zeitpunkte der Nachuntersuchungen in Monaten nach Ende der <i>RCTx</i>	25
7	Antikörper zur Erstellung eines gesunden Normalkollektivs (N)	30
8	Antikörper in den einzelnen <i>FACS™</i> -Tubes	32
9	Veränderung CD3 ⁺ Zellpopulationen in EDTA-Blut über 3 Tage - Verwendete <i>FACS™</i> -Antikörper	36
10	Matching IL2- <i>ELISA</i>	40
11	CD3 ⁺ Zellpopulationen eines gesunden Normalkollektivs (N)	44
12	IL2-Konzentration in Blutplasma, Ergebnisse nach dem ersten Versuch (Verdünnung 1:4)	66
13	IL2-Konzentration in Blutplasma, Ergebnisse nach dem zweiten Versuch mit geringerer Verdünnung (1:2)	67
14	Konzentration von sIL2-R α in Blutplasma	69
15	UICC Stadien gemäß 8. Auflage 2017 der TNM-Klassifikation für Oropharynxkarzinome	98
16	N-Klassifikation gemäß 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation für Oropharynxkarzinome 2017	99
17	Antikörper DTKK	100
18	Antikörper Treg-Färbung	101
19	Antikörper N-CD25	102
20	Antikörper S-CD25	103
21	Antikörper Treg-Färbung S-CD25	104
22	Differenzierung CD45 ⁺ Zellen in Region 1	110

23	Differenzierung CD3 ⁺ Zellen in Region 1	111
24	Signifikanztestung zu den Veränderungen der einzelnen Zellpopulationen in den Gruppen NR und R	112
25	Post-hoc-Analysen zu den Veränderungen der einzelnen Zellpopulationen in den Gruppen NR und R	115
26	Vergleich der CD25 ⁺ Zellpopulationen den Gruppen NR und R	117
27	Vergleich der Gruppen N, NR und R zum Zeitpunkt <i>R0</i> . .	118
28	Receiver Operating Characteristics (ROC) - CD25 ⁺ T-Lymphozyten	119
29	Receiver Operating Characteristics (ROC) - Mean Fluorescence Intensity CD25 ⁺ T-Lymphozyten	120
30	Maßzahlen und Ergebnisse der Signifikanztestung zur Veränderung CD3-positiver Lymphozytenpopulationen gesunder Proband*innen in EDTA-Blut über 75 Stunden - <i>Teil 1/2</i>	121
31	Maßzahlen und Ergebnisse der Signifikanztestung zur Veränderung CD3-positiver Lymphozytenpopulationen gesunder Proband*innen in EDTA-Blut über 75 Stunden - <i>Teil 2/2</i>	122
32	Signifikanztestung des Verlaufs der sIL2-R α -Konzentration im Blutplasma für die Gruppen NR und R	123
33	Post-hoc-Analyse des Verlaufs der sIL2-R α -Konzentration im Blutplasma für die Gruppen NR und R	123
34	Vergleich der sIL2-R α -Konzentrationen im Blutplasma zwischen den Gruppen NR und R	124

9 Anhang

9.1 TNM-Klassifikation *HNSCC*

Tabelle 15: UICC Stadien gemäß 8. Auflage 2017 der TNM-Klassifikation für Oropharynxkarzinome

<i>p16+</i>						<i>p16-</i>			
<i>Stad.</i>	<i>cT</i>	<i>pT</i>	<i>cN</i>	<i>pN</i>	<i>M</i>	<i>Stad.</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
0	Tis	Tis	N0	N0	M0	0	Tis	N0	M0
I	T1- T2	T1- T2	N0- N1	N0- N1	M0	I	T1	N0	M0
II	T1- T2	T1- T2	N2	N2	M0	II	T2	N0	M0
	T3	T3	N0- N2	N0- N1	M0				
III	T1- T4	T3- T4	N3	N2	M0	III	T3	N0	M0
	T4		jedes N		M0			T1- T3	N1
IV	jedes T	jedes T	jedes N	jedes N	M1	IVA	T4a	N0- N1	M0
								T1- T4a	N2
						IVB	jedes T	N3	M0
								T4b	jedes N
						IVC	jedes T	jedes N	M1

UICC: Union Internationale Contre le Cancer, Stad.: UICC-Stadium, cT: Tumor klinisch, pT: Tumor pathologisch, cN: Lymphknotenstatus klinisch, pN: Lymphknotenstatus pathologisch, M: Metastasen, Tis: Carcinoma in situ, Der Tabelleninhalt wurde Beltz et al., 2018, S. 379 f., Tabelle 3 und 4 entnommen und wurde zur besseren Übersicht zusammengefasst. - Bedeutung der Tumorformelemente: T1: Größe ≤ 2cm und Invasionstiefe ≤ 0,5cm / T2: Größe ≤ 2cm und Invasionstiefe > 0,5cm aber ≤ 1cm oder Größe > 2cm, ≤ 4cm und Invasionstiefe ≤ 1cm / T3: Größe > 4cm oder Invasionstiefe > 1cm / T4: lokal fortgeschrittener Befund wie Muskel- oder Knocheninvasion [...] oder Gesichtshautbefall / Die Zuordnung des N-Status unterscheidet zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren sowie klinischer und pathologischer Erhebung (Tabelle 16 im Anhang). / M0: keine Fernmetastasen / M1: Fernmetastase(n) (Denaro et al., 2018, S. 204 ff.)

Tabelle 16: N-Klassifikation gemäß 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation für Oropharynxkarzinome 2017

<i>HPV+</i>				<i>HPV-</i>			
<i>N-Status</i>	<i>klinisch</i>		<i>pathologisch</i>		<i>N-Status</i>	<i>pathologisch</i>	
N0	keine regionalen LN	re-	keine regionalen LN	re-	N0	keine regionalen LN	keine regionalen LN
N1	ipsilaterale LN		1-4 LN		N1	ein LN, ≤ 3 cm, kein ECS	ein ipsilateraler LN, ≤ 3 cm, kein ECS
N2	bilaterale oder kontralaterale LN		≥ 5 LN		N2a	ein LN, 3-6 cm, kein ECS	ein LN, ≤ 3 cm, ECS ein LN, 3-6 cm, kein ECS
					N2b	multiple ipsilaterale LN, ≤ 6 cm, kein ECS	multiple ipsilaterale LN, ≤ 6 cm, kein ECS
					N2c	bilaterale oder kontralaterale LN, ≤ 6 cm, kein ECS	bilaterale oder kontralaterale LN, ≤ 6 cm, kein ECS
					N3a	jeder LN > 6 cm, kein ECS	jeder LN > 6 cm, kein ECS
					N3b	jeder LN > 6 cm, ECS	jeder einzelne LN > 3 cm mit ECS alle multiplen ipsilateralen, bilateralen oder kontralateralen LN mit ECS

LN: Lymphknoten / ECS: Extrakapsuläre Ausbreitung, bezogen auf den befallenen Lymphknoten / Der Tabelleninhalt wurde Denaro et al., 2018, S. 204 ff., Tabelle 1a und 2 entnommen und zur besseren Übersicht zusammengefasst.

9.2 Protokolle zur Probenbearbeitung im Rahmen der *HNprädBio*-Studie

9.2.1 *FACS™* -Analyse nach Lyse/Wash-Protokoll

1. 100 μ L EDTA-Vollblut in 14 FACS-Röhrchen pipettieren (muss NICHT ZENTRIFUGIERT werden!)
2. Antikörper zugeben, aufratschen

Tabelle 17: Antikörper DKTK

<i>Antikörper</i>	<i>Tubes</i>	<i>Konzentration/ μl [sic!]</i>
IgG1-FITC	1, 12	5
IgG1-PE	1	5
IgG1-PerCP	1, 12	5
IgG1-APC	1, 12	1
CD94-FITC	2, 8, 9, 10	5
CD56-FITC	3, 4, 5, 6, 7	5
CD4-FITC	11, 13	20
CD8-FITC	14	20
CD56-PE	2	5
CD19-PE	3	20
CD16-PE	4	10
NKG2D-PE	5, 8	10
Nkp30-PE	6, 9	10
Nkp46-PE	7, 10	10
CD8-PE	11	20
CD3-PerCP	alle AUßER 1 und 12	10
CD45-APC	2, 3, 4, 11	1
CD69-APC	5, 6, 7	5
CD56-APC	8, 9, 10	10
CD25-APC	13, 14	5

3. Inkubation 15min bei RT im Dunkeln
4. 2mL 10%-FacsPuffer in jedes Tube geben
5. Bei 500g=1500rpm große Zentrifuge/ 5min / RT zentrifugieren
Währenddessen LysePuffer-Lösung frisch ansetzen: 1+9 Verdünnung mit H2O!! -> z.B. für 14 Tubes:
27ml H2O + 3ml FACS Lysing Solution
6. Überstand vollständig abschütten, Pellet aufratschen, Zugabe von 2mL LysePuffer-Lösung in jedes Röhrchen
Tubes kurz sanft vortexen (Stufe 4, <1 Sek.); überprüfen, ob Pellet resuspendiert ist!
7. Inkubation 10min bei RT im Dunkeln
Bitte nicht länger lysieren lassen!!!
8. Zentrifugieren 500g /5min / RT
Überstand vollständig abschütten, Pellet vorsichtig aufratschen

9. 3mL 10%-FacsPuffer in jedes Tube geben und bei 500g / 5min / RT zentrifugieren
Überstand vollständig abschütten, Pellet aufratschen
10. Röhrrchen 12-14 mit der Treg-Färbung weitermachen!
11. Währenddessen Röhrrchen 1-11 facsen: 500 μ l FACS-Puffer in alle Röhrrchen zugeben und innerhalb einer Stunde facsen.
Treg-Färbung
Puffervorbereitung:
Puffer A: Komponente A 1:1 in H2Odd verdünnen (9ml für 3 Röhrrchen: 8,1ml H2Odd, 0,9ml Komponente A)
Puffer C: Komponente B 1:50 in Puffer A verdünnen (2ml für 3 Röhrrchen: 2ml Puffer A, 40 μ l Komponente B)
12. **Fixierung:** 2mL Puffer A zugeben, vortexen, 10min Inkubation
13. Zentrifugieren 500g / 5min / RT
14. Überstand abkippen, 3mL 10%-FacsPuffer in jedes Tube geben (zum Waschen)
15. Zentrifugieren 500g / 5min /RT
16. Überstand abkippen, **Permeabilisierung:** Pellet aufratschen -> 0,5mL Puffer C zugeben, vortexen, 30min Inkubation
17. 2mL 10%-FacsPuffer in jedes Tube zugeben
18. Zentrifugieren 500g / 5min / RT
19. Überstand abkippen, 2mL 10%-FacsPuffer in jedes Tube geben
20. Zentrifugieren 500g / 5min /RT
21. Überstand abkippen
Färbung: Jeweils PE-konjugierten Antikörper zugeben, vortexen und 30min inkubieren

Tabelle 18: Antikörper Treg-Färbung

Tube 12	IgG1-PE	5 μ L	pur
Tube 13	FoxP3-PE	20 μ L	pur
Tube 14	FoxP3-PE	20 μ L	pur

22. 2mL 10%-FacsPuffer in jedes Tube zugeben
23. Zentrifugieren 500g / 5min / RT
24. Überstand abkippen, 2mL 10%-FacsPuffer in jedes Tube geben
25. Zentrifugieren 500g / 5min / RT
26. Überstand abkippen, 500 μ L 10%-FacsPuffer zugeben und im FACS analysieren

Anmerkung: Die einzelnen Schritte sind jeweils im Originalwortlaut wiedergegeben. Bei den Werten der letzten Spalte in Tabelle 17 handelt es sich nicht, wie in der Spaltenüberschrift (sic!) angegeben um Konzentrationen, sondern um das Volumen der Antikörperlösung in μ l, die den entsprechenden Röhrrchen zugegeben wird. Die Tabellenüberschriften wurden zur besseren Strukturierung des Dokumentes eingefügt und sind im Original nicht enthalten. Die Nummerierungen wurden zur besseren Übersichtlichkeit angepasst.

9.2.2 Protokoll zur Erstellung eines Normalkollektivs (N-CD25)

1. **100 μ l EDTA-Vollblut** in 2 FACS-Röhrchen pipettieren
2. Antikörper zugeben, dann aufratschen:

Tabelle 19: Antikörper N-CD25

<i>Antikörper</i>	<i>Tube</i>	<i>Menge (μl)</i>
IgG1-FITC	1	5
IgG1-PE	1	5
IgG1-PerCP	1	5
IgG1-APC	1	1
CD4-FITC	2	20
CD8-PE	2	20
CD3-PerCP	2	10
CD25-APC	2	5

3. Inkubation 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln
4. 2ml 10%-FACS-Puffer in beide Röhrchen geben
5. Bei 500g=1500rpm in großer Zentrifuge für 5min bei Raumtemperatur zentrifugieren
Währenddessen Lyse-Puffer-Lösung frisch ansetzen: 3,8 ml H₂O + 0,43 ml FACS-Lysing-Solution
6. Überstand vorsichtig abkippen, Pellet aufratschen, Zugabe von 2ml Lyse-Puffer-Lösung in jedes Röhrchen, Röhrchen kurz sanft vortexen (Stufe 4, <1 Sek.); überprüfen, ob Pellet resuspendiert ist!
7. Inkubation 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Bitte nicht länger lysieren lassen!!!
8. Zentrifugieren 500g, 5min bei RT. Überstand vorsichtig abkippen, Pellet vorsichtig aufratschen
9. 3ml 10%-FACS-Puffer in jedes Tube geben und bei 500g, 5min bei Raumtemperatur zentrifugieren. Überstand vorsichtig abkippen, Pellet aufratschen.
10. 500 μ l FACS-Puffer in jedes Tube geben und so schnell wie möglich im FACS-Gerät analysieren.

9.2.3 Protokoll zur Überprüfung der Veränderungen auf T-Lymphozyten in EDTA-Blut im Zeitverlauf von 75 Stunden (S-CD25)

1. **10 μ l EDTA-Vollblut** in 2 FACS-Röhrchen pipettieren
2. Antikörper zugeben, dann aufratschen:

Tabelle 20: Antikörper S-CD25

<i>Antikörper</i>	<i>Tube</i>	<i>Menge (μl)</i>
IgG1-FITC	1	0,5
IgG1-PerCP	1	0,5
IgG1-APC	1	0,1
CD4-FITC	2	2
CD3-PerCP	2	1
CD25-APC	2	0,5

3. Inkubation 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln
4. 2ml 10%-FACS-Puffer in beide Röhrchen geben
5. Bei 500g=1500rpm in großer Zentrifuge für 5min bei Raumtemperatur zentrifugieren
Währenddessen Lyse-Puffer-Lösung frisch ansetzen: 3,8 ml H₂O + 0,43 ml FACS-Kysing-Solution
6. Überstand vorsichtig absaugen, pellet aufratschen, Zugabe von 2ml Lyse-Puffer-Lösung in jedes Röhrchen, Röhrchen kurz sanft vortexen (Stufe 4, <1 Sek.); überprüfen, ob Pellet resuspendiert ist!
7. Inkubation 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Bitte nicht länger lysieren lassen!!!
8. Zentrifugieren 500g, 5min bei RT. Überstand vorsichtig absaugen, pellet vorsichtig aufratschen
9. 3ml 10%-FACS-Puffer in jedes Tube geben und bei 500g, 5min bei Raumtemperatur zentrifugieren. Überstand vorsichtig absaugen, Pellet aufratschen.
Puffervorbereitung:
Puffer A: Komponente A 1:10 in H₂O verdünnen (6ml für 2 Röhrchen: 5,4ml H₂O, 0,6ml Komponente A)
Puffer C: Komponente B 1:50 in Puffer A verdünnen (1,3 ml Puffer A, 26,6 μ l Komponente B)
10. Fixierung: 2ml Puffer A zugeben, vortexen, 10min Inkubation
11. Zentrifugieren 500g, 5min, RT
12. Überstand absaugen, 3ml 10%-FACS Puffer in jedes Tube geben (zum Waschen)
13. Zentrifugieren 500g, 5min, RT
14. Überstand absaugen, Permeabilisierung: Pellet aufratschen -> 0,5 ml Puffer C zugeben, vortexen, 30min Inkubation
15. 2ml 10%-FACS-Puffer in jedes Tube zugeben
16. Zentrifugieren 500g, 5min, RT
17. Überstand absaugen, 2ml 10%-FACS-Puffer in jedes Tube geben
18. Zentrifugieren 500g, 5min, RT
19. Überstand absaugen,
Färbung: Jeweils PE-konjugierte Antikörper zugeben

Tabelle 21: Antikörper Treg-Färbung S-CD25

Tube 1:	IgG1-PE	0,5 μ L
Tube 2:	FoxP3-PE	2 μ L

20. 2ml 10%-FACS-Puffer in jedes Tube zugeben
21. Zentrifugieren 500g, 5min, RT
22. Überstand absaugen, 2ml 10%-FACS-Puffer in jedes Tube geben
23. Zentrifugieren 500g, 5min, RT
24. Überstand absaugen, 500 μ l 10%-FACS-Puffer zugeben und mittels FACS analysieren

9.2.4 Protokoll - IL2-ELISA aus Plasmaproben

Tag 1 (Nachmittag-Abend)

Vorbereitung: Capture Antibody in Coating Buffer lösen (**CC**):

Coating Buffer: 15 Teile Na₂CO₃-Lsg. 2988 μ l + 35 Teile NaHCO₃-Lsg. 6972 μ l -> 9960 μ l + **Capture Antibody:** 40 μ l (=1:250 Verdünnung)

1. Jeweils 100 μ l **CC** in jedes Well geben, Platte versiegeln und über Nacht bei 4°C inkubieren

Tag 2

Vorbereitung: **Assay-Diluent (AD):** PBS 500ml + FCS 50ml (=9%)

Wash-Buffer (WB): PBS 500ml + 250 μ l Tween (=0,05%)

Substrate Solution (SuS): Tetramethylbenzidine (Substrat A) 6ml + Wasserstoffperoxid (Substrat B) 6ml (Bei RT im Dunkeln aufbewahren)

Working Detector (WD):

- **Assay-Diluent** 9960 μ l + **Detection Antibody** 40 μ l (= 1/250 Verdünnung), vortexen
- 40 μ l dieser Mischung verwerfen
- 40 μ l **Enzyme Reagent** hinzufügen, vortexen

Stop Solution (Stop): 1M H₃PO₄ oder 2M H₂SO₄

Standardreihe:

Stammlösung (SL): 5 μl recombinant human IL-2 (240 ng/ml) + 2395 μl Assay-Diluent (AD)

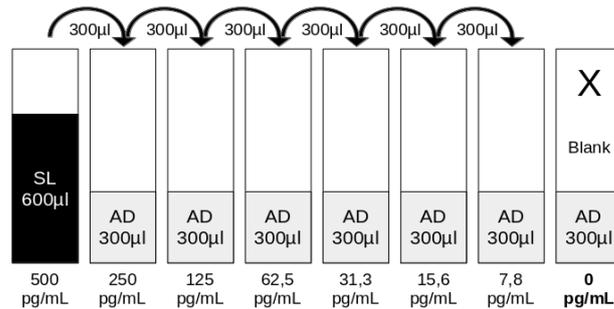


Abbildung 28: Standardreihe IL2

SL: Stammlösung, AD: Assay-Diluent, - Eigene Abbildung.

- 8 Gefäße mit den Konzentrationen 500 / 250 / 125 / 62,5 / 31,3 / 15,6 / 7,8 / 0 pg/ml beschriften

- 600 μl **Stammlösung (SL)** in das erste Gefäß (500 pg/mL) geben

- 300 μl **Assay-Diluent** in die übrigen 7 Gefäße pipettieren

- 300 μl aus dem 1. Gefäß (500 pg/mL) in das 2. Gefäß (250 pg/mL) überführen

- 300 μl aus dem 2. Gefäß (250 pg/mL) in das 3. Gefäß (125 pg/mL) überführen [...]

- Die Verdünnungsreihe bis 7,8 pg/mL fortsetzen (in diesem Gefäß befinden sich am Ende 600 μl Flüssigkeit)

Das Gefäß mit 0 pg/mL (Blank) auslassen!

1. 3 x waschen (**Wash-Buffer**)
2. 200 μl **Assay-Diluent (AD)** in jedes Well geben
3. Platte versiegeln, 1h Inkubation bei RT
4. 3 x waschen (**Wash-Buffer**)
5. 100 μl **Standard** (500pg/mL - 7,8pg/mL), **Blank** bzw. **Probe** in das entsprechende Well geben. (Nach vorher festgelegtem Schema)
6. Platte versiegeln, 2h Inkubation bei RT
7. 5 x waschen (**Wash-Buffer**)
8. 100 μl **Working Detector (WD)** in jedes Well geben.
9. Platte versiegeln, 1h Inkubation bei RT
10. 7 x waschen (**Wash-Buffer**), dabei jeweils 30s-1min einwirken lassen
11. 100 μl **Substrate Solution (SuS)** in jedes Well geben
12. Platte versiegeln, 30min Inkubation bei RT im Dunkeln
13. 50 μl **Stop Solution** in jedes Well geben

14. Analyse im ELISA-Reader bei 450 und 570nm innerhalb von 30min

A) Platte IL2-ELISA - Versuch 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
					pg/mL	Standard	G	gesunder Proband		NR		R
A	500	500	NR 001 R0	NR 001 R1	NR 001 R2	NR 001 R3	NR 001 R4	R 001 R0	R 001 R1	R 001 R2	R 001 R3	R 001 R5
B	250	250	NR 001 R0	NR 001 R1	NR 001 R2	NR 001 R3	NR 001 R4	R 001 R0	R 001 R1	R 001 R2	R 001 R3	R 001 R5
C	125	125	NR 002 R0	NR 002 R1	NR 002 R2	G	NR 002 R4	R 002 R0	R 002 R1	R 002 R2	0	R 002 R5
D	62,5	62,5	NR 002 R0	NR 002 R1	NR 002 R2	G	NR 002 R4	R 002 R0	R 002 R1	R 002 R2	0	R 002 R5
E	31,3	31,3	NR 003 R0	NR 003 R1	NR 003 R2	NR 003 R3	NR 003 R4	R 003 R0	R 003 R1	R 003 R2	R 003 R3	R 003 R5
F	15,6	15,6	NR 003 R0	NR 003 R1	NR 003 R2	NR 003 R3	NR 003 R4	R 003 R0	R 003 R1	R 003 R2	R 003 R3	R 003 R5
G	7,8	7,8	NR 004 R0	NR 004 R1	NR 004 R2	NR 004 R3	NR 004 R4	R 004 R0	R 004 R1	0	R 004 R3	R 004 R5
H	0	0	NR 004 R0	NR 004 R1	NR 004 R2	NR 004 R3	NR 004 R4	R 004 R0	R 004 R1	0	R 004 R3	R 004 R5

B) Platte IL2-ELISA - Versuch 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
					pg/mL	Standard	G	gesunder Proband		NR		R
A	500	500	NR 001 R0	NR 001 R1	NR 001 R2	NR 001 R3	NR 001 R4	R 001 R0	R 001 R1	R 001 R2	R 001 R3	R 001 R5
B	250	250	NR 001 R0	NR 001 R1	NR 001 R2	NR 001 R3	NR 001 R4	R 001 R0	R 001 R1	R 001 R2	R 001 R3	R 001 R5
C	125	125	NR 002 R0	NR 002 R1	NR 002 R2	G+250 pg/ml	NR 002 R4	R 002 R0	R 002 R1	R 002 R2	G	R 002 R5
D	62,5	62,5	NR 002 R0	NR 002 R1	NR 002 R2	G+250 pg/ml	NR 002 R4	R 002 R0	R 002 R1	R 002 R2	G	R 002 R5
E	31,3	31,3	NR 003 R0	NR 003 R1	NR 003 R2	NR 003 R3	NR 003 R4	R 003 R0	R 003 R1	R 003 R2	R 003 R3	R 003 R5
F	15,6	15,6	NR 003 R0	NR 003 R1	NR 003 R2	NR 003 R3	NR 003 R4	R 003 R0	R 003 R1	R 003 R2	R 003 R3	R 003 R5
G	7,8	7,8	NR 004 R0	NR 004 R1	NR 004 R2	NR 004 R3	NR 004 R4	R 004 R0	R 004 R1	0	R 004 R3	R 004 R5
H	0	0	NR 004 R0	NR 004 R1	NR 004 R2	NR 004 R3	NR 004 R4	R 004 R0	R 004 R1	0	R 004 R3	R 004 R5

Abbildung 29: Plattenschema Interleukin 2-ELISA

A) Erster Versuchsdurchlauf, **B)** Zweiter Versuchsdurchlauf mit veränderter Verdünnung der Proben / Spalten 1 und 2: Standardkonzentrationen in pg/ml / Spalten 3-7: Proben von Patient*innen ohne Rezidiv im Beobachtungszeitraum (NR) / Spalten 8-12: Proben von Patient*innen mit Rezidiv / Well C6 und D6: A) Probe eines gesunden Probanden, B) Probe eines gesunden Probanden mit Standard vermischt (250 pg/ml effektive Konzentration) / Well C11 und D11: A) Standard mit 0 pg/ml, B) Probe eines gesunden Probanden / G10 und H10: Standard mit 9 pg/ml - Eigene Abbildung.

9.2.5 Protokoll - sIL2-R α -ELISA aus Plasmaproben

Proben-Vorbereitung

50 μ l Plasma + 150 μ l Calibrator Diluent RD6S für jede Probe

Reagenzien-Vorbereitung

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

Wash Buffer (WB) - Wash-Buffer-Konzentrat vorsichtig schwenken, bis sich eventuelle Kristalle aufgelöst haben.
- 20 mL Wash-Buffer-Konzentrat + 480 ml Aqua dd

Substrate Solution (SuSo) - Achtung: erst 15min vor Gebrauch(*): Color Reagent A + Color reagent B zu gleichen Teilen mischen. 200 μ l der Mischung werden pro Well benötigt. Vor Licht schützen.

IL2-R α Standard (Sd) - Rekonstruktion des **IL2-R α Standards** mit **Calibrator Diluent RD6S**. Vorsichtig mischen und mindestens 30min ruhen lassen. -> Stock mit 5000 pg/mL

Standardreihe erstellen:

Je 200 μ l **Calibrator Diluent RD6S** in 6 Tubes pipettieren. Tubes absteigend beschriften mit 2500, 1250, 625, 313, 156 und 78.

200 μ l **Sd-5000** in Tube 2500 pipettieren, vortexen.

200 μ l **Sd-2500** in Tube 1250 pipettieren, vortexen.

etc.

1 Tube mit 5000 beschriften und nur mit **200 μ l Stock-Standard (Sd-5000)** befüllen.

1 Tube mit 0 beschriften und nur mit **200 μ l Calibrator Diluent RD6S** befüllen.

Versuchsablauf

1. Alle Reagenzien und Proben, wie oben beschrieben, vorbereiten
2. Klebefolie vom Plattenrahmen entfernen und zurück in den Beutel geben, diesen verschließen.
3. **100 μ l Assay Diluent RD1-1** in jedes Well geben.
4. Je **50 μ l Standard, Kontrolle oder Probe (verdünnt)** in jedes Well geben (nach vorher festgelegtem Schema). -> Sofort mit nächstem Schritt weitermachen, nicht inkubieren oder waschen!
5. **100 μ l Human IL-2-R α -Konjugat** in jedes Well geben. Vorsichtig, durch Klopfen gegen die Ränder der Platte, mischen. Mit beigelegter Folie versiegeln.
3 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren. Ca. 5 Minuten vor Ende der Inkubationszeit Schritt 6 durchführen.
6. ***Substrate Solution (SuSo) herstellen** - Achtung: erst 15min vor Gebrauch: color Reagent A + Color Reagent B zu gleichen Teilen mischen. 200 μ l der Mischung werden pro Well benötigt. Vor Licht schützen.
7. **4x Waschen:** Jedes Well mit **400 μ l Wash Buffer (WB)** befüllen. Anschließend über Ausguss ausschütten und auf Papierhandtuch ausklopfen.
8. **200 μ l Substrate Solution (SuSo)** in jedes Well geben.
20min bei Raumtemperatur **im Dunkeln** inkubieren.
9. **50 μ l Stop Solution** in jedes Well geben. Die Farbe im Well sollte von blau in gelb umschlagen. Falls die Farbe grün oder nicht homogen erscheint, durch vorsichtiges Klopfen gegen die Plattenränder mischen.
10. **Innerhalb von 30 Minuten im ELISA-Reader einlesen.**
Wellenlänge auf 450 nm setzen.
Falls Wellenlängenkorrektur vorhanden, auf 540 oder 570nm setzen, falls nicht, 540nm oder 570nm von 450nm subtrahieren. Dies berücksichtigt optische Störungen der Platte.

9.3 Verwendete Reagenzien

FACS™

IgG1-FITC, FITC-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 345815

IgG1-PE, PE-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 345816

IgG1-PerCP, PerCP-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 345817

IgG1-APC, APC-markierter monoklonaler Antikörper, invitrogen/caltag

Katalognummer: MG105

CD56-FITC, FITC-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 345811

CD19-PE, PE-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 555413

CD3-PerCP, PerCP-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 345766

CD45-APC, APC-markierter monoklonaler Antikörper, invitrogen/caltag

Katalognummer: MHCD4505

CD4-FITC, FITC-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 555346

CD8-FITC, FITC-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 555366

CD25-APC, APC-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 340907

FoxP3-PE, PE-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 560046

CD8-PE, PE-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 555367

FoxP3 Puffer Set A, PE-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 51-9005451

FoxP3 Puffer Set B, PE-markierter monoklonaler Antikörper, BD

Katalognummer: 51-9005450

BD FACS™Lysing Solution 100ml

Katalognummer: 349202

FACS™ -Puffer: 500ml PBS + 50ml FCS

frisch angesetzt

H₂O dd

Hinweis: Die Chargennummern der verwendeten Reagenzien variierten aufgrund des langen Zeitraumes der Probensammlung über mehrere Jahre. Sie sind für jede einzelne Probe in der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar dokumentiert.

IL-2 ELISA: BD OptEIA™Set Human IL-2 - LOT: 7174527EU

Capture Antibody: *Anti-human IL-2*

Katalognummer: 51-26271E Empfohlene Verdünnung: 1:250 in Coating Buffer

Detection Antibody: *Biotinylated Anti-human IL-2*

Katalognummer: 51-26272E

Empfohlene Verdünnung: 1:250 in Assay Diluent ergibt Working Detector (WD)

Enzyme Reagent: *Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*

Katalognummer: 51-9002813

Empfohlene Verdünnung: 1:250 in verdünntem Detection Antibody

Standards: *Recombinant human IL-2*

Katalognummer: 51-26276E

Rekonstitution in 1,0 ml demineralisiertem Wasser

Stop Solution: *1 molare Schwefelsäure*

Assay Diluent (AD): *500 ml PBS + 50 ml FCS (=9%)*

Wash Buffer (WB): *500 ml PBS + 250 µl Tween (=0,05%)*

R&D systems Quantikine® ELISA Human CD25/IL-2 R α (DR2A00) - LOT: P129375

Human IL-2 R α 96 well Microplate coated with a monoclonal antibody specific for human IL-2 R α

Katalognummer: 890196

Human IL-2 R α Standard - Recombinant human IL-2 R α in a buffered protein base with preservatives

Katalognummer: 890198

Human IL-2 R α Conjugate - polyclonal antibody specific for human IL-2 R α conjugated to horseradish peroxidase with preservatives

Katalognummer: 890197

Assay Diluent RD1-1 - buffered protein base with preservatives

Katalognummer: 895143

Calibrator Diluent RD65 - animal serum with preservatives

Katalognummer: 895142

Wash Buffer Concentrate - 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative

Katalognummer: 895003

Color Reagent A - stabilized hydrogen peroxide

Katalognummer: 895000

Color Reagent B - stabilized chromogen (tetraethylbenzidine)

Katalognummer: 895001

Stop Solution - 2 N sulfuric acid

Katalognummer: 895032

9.4 Tabellen zu Maßzahlen, Lageparametern und zur Signifikanztestung der Experimente

Tabelle 22: Differenzierung CD45⁺ Zellen in Region 1

		NR					R				
		R0	R1	R2	R3	R4	R0	R1	R2	R3	R5
CD3 ⁺	Mittelw.	0,741	0,752	0,687	0,652	0,643	0,720	0,705	0,635	0,621	0,579
	SD	0,125	0,112	0,134	0,127	0,139	0,112	0,173	0,136	0,143	0,145
	Median	0,762	0,773	0,705	0,644	0,629	0,745	0,749	0,634	0,631	0,536
	IQR	0,114	0,089	0,175	0,192	0,177	0,119	0,157	0,212	0,175	0,194
CD56 ⁺ CD3 ⁻	Mittelw.	0,110	0,121	0,154	0,174	0,167	0,114	0,143	0,173	0,160	0,205
	SD	0,082	0,098	0,097	0,097	0,097	0,070	0,098	0,102	0,057	0,100
	Median	0,088	0,095	0,140	0,160	0,176	0,103	0,127	0,172	0,186	0,213
	IQR	0,082	0,059	0,123	0,143	0,116	0,047	0,070	0,098	0,07	0,102
CD19 ⁺	Mittelw.	0,088	0,041	0,069	0,094	0,115	0,120	0,096	0,111	0,108	0,141
	SD	0,049	0,032	0,044	0,061	0,074	0,085	0,153	0,091	0,082	0,106
	Median	0,081	0,029	0,06	0,087	0,107	0,092	0,044	0,063	0,080	0,114
	IQR	0,052	0,037	0,051	0,084	0,104	0,057	0,059	0,146	0,101	0,124
CD56 ⁺ /CD3 ⁺	Mittelw.	0,095	0,119	0,093	0,093	0,095	0,064	0,086	0,087	0,100	0,098
	SD	0,147	0,165	0,078	0,088	0,098	0,078	0,079	0,070	0,094	0,090
	Median	0,050	0,075	0,074	0,069	0,064	0,037	0,074	0,070	0,072	0,065
	IQR	0,067	0,089	0,085	0,066	0,100	0,037	0,079	0,077	0,075	0,099

*SD: Standardabweichung, IQR: Interquartilsabstand, NR: Patient*innen ohne Rezidiv, R: Patient*innen mit Rezidiv, CD3⁺: T-Lymphozyten, CD56⁺CD3⁻: Natürliche Killerzellen, CD19⁺: B-Lymphozyten, CD56⁺CD3⁺: NKT-Zellen*

Tabelle 23: Differenzierung CD3⁺ Zellen in Region 1

		NR					R				
		R0	R1	R2	R3	R4	R0	R1	R2	R3	R5
CD4 ⁺	Mittelw.	0,594	0,513	0,402	0,418	0,429	0,616	0,554	0,426	0,459	0,466
	SD	0,163	0,194	0,152	0,143	0,145	0,191	0,167	0,201	0,243	0,183
	Median	0,611	0,523	0,410	0,412	0,424	0,604	0,521	0,342	0,498	0,443
	IQR	0,193	0,245	0,235	0,190	0,179	0,218	0,223	0,306	0,418	0,259
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Mittelw.	0,215	0,161	0,238	0,227	0,268	0,299	0,324	0,323	0,372	0,390
	SD	0,180	0,097	0,154	0,134	0,170	0,257	0,135	0,193	0,201	0,167
	Median	0,176	0,169	0,204	0,203	0,250	0,188	0,321	0,351	0,322	0,340
	IQR	0,139	0,140	0,174	0,191	0,262	0,306	0,138	0,200	0,326	0,275
T _{reg}	Mittelw.	0,057	0,055	0,087	0,081	0,080	0,074	0,076	0,087	0,100	0,098
	SD	0,027	0,027	0,038	0,049	0,079	0,041	0,066	0,063	0,054	0,049
	Median	0,054	0,049	0,089	0,067	0,064	0,074	0,044	0,071	0,078	0,083
	IQR	0,043	0,038	0,047	0,050	0,040	0,050	0,059	0,061	0,093	0,059
CD8 ⁺	Mittelw.	0,271	0,320	0,384	0,374	0,351	0,209	0,232	0,343	0,264	0,290
	SD	0,142	0,165	0,203	0,183	0,158	0,129	0,145	0,178	0,152	0,143
	Median	0,242	0,294	0,369	0,346	0,340	0,202	0,202	0,311	0,213	0,283
	IQR	0,171	0,263	0,285	0,267	0,210	0,156	0,136	0,246	0,087	0,092
CD8 ⁺ CD25 ⁺	Mittelw.	0,078	0,056	0,048	0,049	0,062	0,121	0,067	0,090	0,110	0,101
	SD	0,157	0,068	0,066	0,061	0,073	0,198	0,095	0,109	0,122	0,109
	Median	0,029	0,036	0,018	0,026	0,038	0,025	0,032	0,039	0,073	0,072
	IQR	0,074	0,070	0,058	0,072	0,093	0,169	0,065	0,159	0,120	0,154
CD4/CD8-Ratio	Mittelw.	2,952	2,09	1,891	1,515	1,752	4,257	3,400	2,205	2,152	2,320
	SD	1,986	1,295	3,267	1,123	1,717	3,265	2,192	3,149	1,699	2,039
	Median	2,438	1,862	1,135	1,160	1,259	3,492	3,200	0,897	1,746	1,727
	IQR	2,129	1,465	1,391	1,213	0,989	4,336	2,686	1,996	2,120	1,561
CD8/T _{reg} -Ratio	Mittelw.	46,58	78,99	15,3	19,2	41,55	10,38	15,53	10,6	8,54	8,42
	SD	192,3	441,4	13,8	25,23	136,1	16,56	28,01	9,46	7,48	7,38
	Median	8,11	9,55	12,31	13,00	10,46	4,93	7,23	7,34	6,06	5,68
	IQR	9,37	9,73	11,23	13,82	14,4	3,08	11,03	7,37	3,87	6,84

*SD: Standardabweichung, IQR: Interquartilsabstand, CD4⁺: Anteil der T-Helferzellen an allen T-Lymphozyten, CD4⁺CD25⁺: Anteil CD25-positiver Zellen an den T-Helferzellen, T_{reg}: Anteil der regulatorischen T-Zellen an den T-Helferzellen, CD8⁺: Anteil zytotoxischer T-Zellen an den T-Lymphozyten, CD8⁺CD25⁺: Anteil CD25-positiver Zellen an den zytotoxischen T-Zellen, CD4/CD8-Ratio: Verhältnis der CD4⁺ zu den CD8⁺ T-Lymphozyten, NR: Patient*innen ohne Rezidiv, R: Patient*innen mit Rezidiv*

Tabelle 24: Signifikanztestung zu den Veränderungen der einzelnen Zellpopulationen in den Gruppen NR und R

<i>Population</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Sign.-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>
CD3 ⁺ /CD45 ⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,000	0,001	0,087	0,741	0,670	
		Levene			0,170			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,254	0,102	0,171	0,940		0,570
		Levene			0,635			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			
CD56 ⁺ CD3 ⁻ / CD45 ⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,000	0,000	0,000	0,153	0,003	
		Levene			0,206			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,075	0,008	0,291	0,114		0,257
		Levene			0,638			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			
CD19 ⁺ /CD45 ⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,000	0,000	0,000	0,022	0,006	
		Levene			0,000			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,005	0,000	0,019	0,024		0,020
		Levene			0,777			
		ANOVA within			0,417			
		Skillings-Mack			0,000			
NKT/CD3 ⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
		Levene			0,668			
		ANOVA within			0,805			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,000	0,002	0,042	0,004		0,001
		Levene			0,921			
		ANOVA within			0,013			
		Skillings-Mack			0,000			

<i>Population</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Sign.-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>
CD4⁺/CD3⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,017	0,162	0,603	0,396	0,259	
		Levene			0,153			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,976	0,740	0,085	0,300		0,517
		Levene			0,440			
		ANOVA within			0,001			
		Skillings-Mack			0,000			
CD25⁺/CD4⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,000	0,027	0,000	0,008	0,026	
		Levene			0,099			
		ANOVA within			0,049			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,015	0,534	0,108	0,248		0,118
		Levene			0,543			
		ANOVA within			0,166			
		Skillings-Mack			0,000			
T_{reg}/CD4⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,682	0,410	0,798	0,000	0,000	
		Levene			0,286			
		ANOVA within			0,0096			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,467	0,004	0,064	0,150		0,019
		Levene			0,751			
		ANOVA within			0,065			
		Skillings-Mack			0,002			
CD8⁺/CD3⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,001	0,008	0,320	0,052	0,529	
		Levene			0,055			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,084	0,122	0,371	0,002		0,228
		Levene			0,864			
		ANOVA within			0,005			
		Skillings-Mack			0,000			
CD25⁺/CD8⁺	NR	Shapiro-Wilk	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
		Levene			0,423			
		ANOVA within			0,305			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,000	0,000	0,0,005	0,011		0,007
		Levene			0,737			
		ANOVA within			0,912			
		Skillings-Mack			0,000			

Population	Gruppe	Sign.-Test	R0	R1	R2	R3	R4	R5
CD4/CD8-Ratio	NR	Shapiro-Wilk	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	
		Levene			0,327			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			
	R	Shapiro-Wilk	0,019	0,420	0,000	0,047		0,000
		Levene			0,615			
		ANOVA within			0,000			
		Skillings-Mack			0,000			

Es sind jeweils die p-Werte der jeweiligen Signifikanztests angegeben. **Shapiro-Wilk:** $p \geq 0,05$ Annahme einer Normalverteilung, **Levene:** $p \geq 0,05$ Annahme einer Homogenität der Varianzen, **ANOVA within:** $p < 0,05$ Annahme einer Veränderung über die drei Zeitpunkte bei Vorliegen von Normalverteilung und Varianzhomogenität der Stichproben, **Friedman:** $p < 0,05$ Annahme einer Veränderung über die drei Zeitpunkte, nicht-parametrischer Test, der für die Testentscheidung herangezogene p-Wert ist jeweils hervorgehoben

Tabelle 25: Post-hoc-Analysen zu den Veränderungen der einzelnen Zellpopulationen in den Gruppen NR und R

CD3 ⁺ /CD45 ⁺ - NR										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	1,000				<i>R1</i>	1,000			
	<i>R2</i>	0,013	0,036			<i>R2</i>	0,0008	0,025		
	<i>R3</i>	0,000	0,000	0,013		<i>R3</i>	0,000	0,000	0,007	
	<i>R4</i>	0,000	0,000	0,002	1,000	<i>R4</i>	0,000	0,000	0,000	1,000
CD3 ⁺ /CD45 ⁺ - R										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	1,000				<i>R1</i>	1,000			
	<i>R2</i>	0,072	1,000			<i>R2</i>	0,093	1,000		
	<i>R3</i>	0,323	1,000	1,000		<i>R3</i>	0,674	1,000	1,000	
	<i>R5</i>	0,006	0,074	0,006	0,376	<i>R5</i>	0,003	0,026	0,001	0,494
CD56 ⁺ CD3 ⁻ /CD45 ⁺ - NR										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	1,000				<i>R1</i>	0,462			
	<i>R2</i>	0,001	0,057			<i>R2</i>	0,002	0,061		
	<i>R3</i>	0,000	0,001	0,029		<i>R3</i>	0,000	0,000	0,047	
	<i>R4</i>	0,000	0,007	1,000	1,000	<i>R4</i>	0,000	0,002	0,605	1,000
CD56 ⁺ CD3 ⁻ /CD45 ⁺ - R										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	1,000				<i>R1</i>	1,000			
	<i>R2</i>	0,060	1,000			<i>R2</i>	0,093	1,000		
	<i>R3</i>	0,663	1,000	1,000		<i>R3</i>	0,830	1,000	1,000	
	<i>R5</i>	0,001	0,115	0,159	0,159	<i>R5</i>	0,007	0,479	0,245	0,052
CD19 ⁺ /CD45 ⁺ - NR										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	0,000				<i>R1</i>	0,000			
	<i>R2</i>	0,016	0,008			<i>R2</i>	0,022	0,006		
	<i>R3</i>	1,000	0,000	0,000		<i>R3</i>	1,000	0,000	0,000	
	<i>R4</i>	0,003	0,000	0,000	0,002	<i>R4</i>	0,005	0,000	0,000	0,001
CD19 ⁺ /CD45 ⁺ - R										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	1,000				<i>R1</i>	1,000			
	<i>R2</i>	1,000	1,000			<i>R2</i>	1,000	1,000		
	<i>R3</i>	1,000	1,000	1,000		<i>R3</i>	1,000	1,000	1,000	
	<i>R5</i>	1,000	1,000	0,009	1,000	<i>R5</i>	1,000	0,479	0,004	1,000
CD56 ⁺ /CD3 ⁺ - NR										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	1,000				<i>R1</i>	0,001			
	<i>R2</i>	1,000	1,000			<i>R2</i>	0,000	1,000		
	<i>R3</i>	1,000	1,000	1,000		<i>R3</i>	0,000	1,000	1,000	
	<i>R4</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	<i>R4</i>	0,035	1,000	1,000	1,000
CD56 ⁺ /CD3 ⁺ - R										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	0,433				<i>R1</i>	0,574			
	<i>R2</i>	1,000	1,000			<i>R2</i>	1,000	1,000		
	<i>R3</i>	0,588	1,000	1,000		<i>R3</i>	0,537	1,000	1,000	
	<i>R5</i>	0,099	1,000	0,009	1,000	<i>R5</i>	0,129	1,000	1,000	1,000
CD4/CD8-Ratio - NR										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	0,102				<i>R1</i>	0,018			
	<i>R2</i>	0,959	1,000			<i>R2</i>	0,000	0,082		
	<i>R3</i>	0,000	0,001	1,000		<i>R3</i>	0,000	0,000	1,000	
	<i>R4</i>	0,000	0,263	1,000	0,656	<i>R4</i>	0,000	0,002	1,000	1,000
CD4/CD8-Ratio - R										
	<i>T-Test</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
	<i>R1</i>	1,000				<i>R1</i>	0,674			
	<i>R2</i>	0,015	0,585			<i>R2</i>	0,005	0,781		
	<i>R3</i>	0,393	0,194	1,000		<i>R3</i>	0,020	0,234	1,000	
	<i>R5</i>	0,002	0,425	1,000	1,000	<i>R5</i>	0,000	0,398	1,000	1,000

CD4 ⁺ /CD3 ⁺ - NR									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	0,317				R1	0,008			
R2	0,000	0,000			R2	0,000	0,000		
R3	0,000	0,000	1,000		R3	0,000	0,000	1,000	
R4	0,000	0,016	1,000	1,000	R4	0,000	0,000	0,983	1,000
CD4 ⁺ /CD3 ⁺ - R									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	0,428				R1	0,425			
R2	0,016	0,705			R2	0,007	1,000		
R3	0,047	1,000	1,000		R3	0,024	1,000	1,000	
R5	0,012	1,000	1,000	1,000	R5	0,028	1,000	1,000	1,000
CD25 ⁺ /CD4 ⁺ - NR									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	1,000			
R2	1,000	0,066			R2	1,000	0,159		
R3	1,000	0,147	1,000		R3	1,000	0,036	1,000	
R4	1,000	0,014	1,000	0,232	R4	1,000	0,022	1,000	0,418
CD25 ⁺ /CD4 ⁺ - R									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	1,000			
R2	1,000	1,000			R2	1,000	1,000		
R3	1,000	1,000	1,000		R3	1,000	1,000	1,000	
R5	1,000	1,000	0,617	1,000	R5	1,000	1,000	0,353	1,000
T _{reg} /CD4 ⁺ - NR									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	1,000			
R2	0,000	0,000			R2	0,000	0,000		
R3	0,012	0,038	0,577		R3	0,023	0,056	0,472	
R4	0,214	1,000	0,209	1,000	R4	0,044	0,556	0,343	1,000
T _{reg} /CD4 ⁺ - R									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	1,000			
R2	1,000	1,000			R2	1,000	1,000		
R3	0,996	1,000	1,000		R3	0,640	1,000	1,000	
R5	0,572	1,000	1,000	1,000	R5	0,898	1,000	1,000	1,000
CD8 ⁺ /CD3 ⁺ - NR									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	0,106			
R2	0,001	0,258			R2	0,001	0,205		
R3	0,000	0,024	1,000		R3	0,000	0,008	1,000	
R4	0,004	0,884	1,000	1,000	R4	0,000	0,095	1,000	1,000
CD8 ⁺ /CD3 ⁺ - R									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	0,513				R1	0,674			
R2	0,013	0,228			R2	0,015	0,156		
R3	1,000	0,136	0,464		R3	1,000	0,156	0,488	
R5	0,114	0,013	1,000	1,000	R5	0,052	0,024	1,000	1,000
CD25 ⁺ /CD8 ⁺ - NR									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	1,000			
R2	0,489	1,000			R2	0,721	1,000		
R3	1,000	1,000	1,000		R3	1,000	1,000	1,000	
R4	1,000	1,000	1,000	1,000	R4	1,000	1,000	1,000	0,962
CD25 ⁺ /CD8 ⁺ - R									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	1,000			
R2	1,000	1,000			R2	1,000	1,000		
R3	1,000	1,000	1,000		R3	1,000	1,000	1,000	
R5	1,000	1,000	1,000	1,000	R5	1,000	1,000	1,000	1,000

NR Patient*innen ohne Rezidiv, R Patient*innen mit Rezidiv / Es werden die p-Werte der jeweiligen zweiseitigen und gepaarten Signifikanztests nach Bonferroni-Korrektur gezeigt.

Tabelle 26: Vergleich der CD25⁺ Zellpopulationen den Gruppen NR und R

CD25 ⁺ /CD4 ⁺										
	<i>T-Test</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>
	<i>R R0</i>	1,000				<i>R R0</i>	1,000			
	<i>R R1</i>		0,003			<i>R R1</i>		0,0008		
	<i>R R2</i>			0,878		<i>R R2</i>			0,448	
	<i>R R3</i>				0,129	<i>R R3</i>				0,085
	<i>R R5</i>			0,007	0,003	<i>R R5</i>			0,002	0,003
MFI CD25 auf CD4 ⁺										
	<i>T-Test</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>
	<i>R R0</i>	0,414				<i>R R0</i>	0,333			
	<i>R R1</i>		0,074			<i>R R1</i>		0,0498		
	<i>R R2</i>			0,296		<i>R R2</i>			0,008	
	<i>R R3</i>				0,036	<i>R R3</i>				0,005
	<i>R R5</i>			0,061	0,001	<i>R R5</i>			0,0007	0,0002
CD25 ⁺ /CD8 ⁺										
	<i>T-Test</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>
	<i>R R0</i>	1,000				<i>R R0</i>	1,000			
	<i>R R1</i>		0,781			<i>R R1</i>		0,330		
	<i>R R2</i>			0,813		<i>R R2</i>			0,707	
	<i>R R3</i>				0,104	<i>R R3</i>				0,009
	<i>R R5</i>			0,063	0,067	<i>R R5</i>			0,025	0,033
MFI CD25 auf CD8 ⁺										
	<i>T-Test</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>
	<i>R R0</i>	1,000				<i>R R0</i>	1,000			
	<i>R R1</i>		0,811			<i>R R1</i>		1,000		
	<i>R R2</i>			1,000		<i>R R2</i>			1,000	
	<i>R R3</i>				0,086	<i>R R3</i>				0,005
	<i>R R5</i>			1,000	0,019	<i>R R5</i>			0,008	0,005
T _{reg} /CD4 ⁺										
	<i>T-Test</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>
	<i>R R0</i>	0,704				<i>R R0</i>	0,832			
	<i>R R1</i>		1,000			<i>R R1</i>		1,000		
	<i>R R2</i>			1,000		<i>R R2</i>			1,000	
	<i>R R3</i>				1,000	<i>R R3</i>				1,000
	<i>R R5</i>			1,000	1,000	<i>R R5</i>			1,000	0,705
T _{reg} /CD4 ⁺ CD25 ⁺										
	<i>T-Test</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>
	<i>R R0</i>	1,000				<i>R R0</i>	1,000			
	<i>R R1</i>		0,106			<i>R R1</i>		0,138		
	<i>R R2</i>			0,090		<i>R R2</i>			0,056	
	<i>R R3</i>				1,000	<i>R R3</i>				1,000
	<i>R R5</i>			0,163	1,000	<i>R R5</i>			0,089	0,382
CD8 ⁺ /T _{reg}										
	<i>T-Test</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>
	<i>R R0</i>	0,892				<i>R R0</i>	0,274			
	<i>R R1</i>		1,000			<i>R R1</i>		1,000		
	<i>R R2</i>			0,947		<i>R R2</i>			0,857	
	<i>R R3</i>				0,062	<i>R R3</i>				0,179
	<i>R R5</i>			0,042	0,041	<i>R R5</i>			0,049	0,042

NR Patient*innen ohne Rezidiv, *R* Patient*innen mit Rezidiv, *Wilcoxon* Wilcoxon-Rangwert-Test, es wurden jeweils zweiseitige Tests für unverbundene Stichproben angewendet, die *p*-Werte sind adjustiert angegeben.

Tabelle 27: Vergleich der Gruppen N, NR und R zum Zeitpunkt R0

<i>CD3⁺ Events in Region 1</i>	<i>N</i>	<i>NR</i>	<i>R</i>
Shapiro-Wilk	0,616	0,000	0,975
Levene		0,935	
ANOVA		0,071	
Kruskal-Wallis		0,011	
	<i>N/NR</i>	<i>N/R</i>	<i>NR/R</i>
post-hoc T-Test	1,000	0,753	0,014
post-hoc Wilcoxon	0,917	0,636	0,010
<i>CD4⁺/CD3⁺</i>	<i>N</i>	<i>NR</i>	<i>R</i>
Shapiro-Wilk	0,213	0,017	0,976
Levene		0,845	
ANOVA		0,649	
Kruskal-Wallis		0,421	
	<i>N/NR</i>	<i>N/R</i>	<i>NR/R</i>
post-hoc T-Test	0,952	1,000	1,000
post-hoc Wilcoxon	0,667	1,000	1,000
<i>CD8⁺/CD3⁺</i>	<i>N</i>	<i>NR</i>	<i>R</i>
Shapiro-Wilk	0,460	0,001	0,084
Levene		0,804	
ANOVA		0,003	
Kruskal-Wallis		0,010	
	<i>N/NR</i>	<i>N/R</i>	<i>NR/R</i>
post-hoc T-Test	0,047	0,006	0,351
post-hoc Wilcoxon	0,054	0,020	0,282
<i>CD4/CD8-Ratio</i>	<i>N</i>	<i>NR</i>	<i>R</i>
Shapiro-Wilk	0,086	0,000	0,019
Levene		0,061	
ANOVA		0,005	
Kruskal-Wallis		0,028	
	<i>N/NR</i>	<i>N/R</i>	<i>NR/R</i>
post-hoc T-Test	0,336	0,020	0,118
post-hoc Wilcoxon	0,124	0,035	0,455
<i>CD25⁺/CD3⁺CD4⁺</i>	<i>N</i>	<i>NR</i>	<i>R</i>
Shapiro-Wilk	0,199	0,000	0,015
Levene		0,121	
ANOVA		0,547	
Kruskal-Wallis		0,051	
	<i>N/NR</i>	<i>N/R</i>	<i>NR/R</i>
post-hoc T-Test	704	1,000	0,316
post-hoc Wilcoxon	0,039	1,000	1,000
<i>CD25⁺/CD3⁺CD8⁺</i>	<i>N</i>	<i>NR</i>	<i>R</i>
Shapiro-Wilk	0,008	0,000	0,000
Levene		0,360	
ANOVA		0,224	
Kruskal-Wallis		0,981	
	<i>N/NR</i>	<i>N/R</i>	<i>NR/R</i>
post-hoc T-Test	1,000	0,758	1,000
post-hoc Wilcoxon	1,000	1,000	1,000

Tabelle 28: Receiver Operating Characteristics (ROC) - CD25⁺ T-Lymphozyten

<i>Parameter</i>	<i>NR</i>	<i>R</i>	<i>AUC</i>	<i>95% KI</i>	<i>Cutoff gem. Youden J</i>	<i>Sens.</i>	<i>Spez.</i>
CD25⁺/CD4⁺	R0	R0	0,573	0,406-0,739	(>) 0,336	0,389	0,887
	R1	R1	0,839	0,718-0,96	(>) 0,276	0,714	0,915
	R2	R2	0,656	0,47-0,842	(>) 0,274	0,714	0,685
	R3	R3	0,716	0,546-0,885	(>) 0,284	0,714	0,673
	R2	R5	0,775	0,658-0,892	(>) 0,225	0,95	0,611
	R3	R5	0,768	0,645-0,892	(>) 0,232	0,95	0,538
CD25⁺/CD8⁺	R0	R0	0,499	0,319-0,679	(>) 0,009	0,375	0,742
	R1	R1	0,491	0,307-0,674	(>) 0,026	0,5	0,609
	R2	R2	0,582	0,389-0,775	(>) 0,054	0,5	0,722
	R3	R3	0,655	0,472-0,837	(>) 0,056	0,643	0,712
	R2	R5	0,622	0,456-0,788	(>) 0,066	0,55	0,778
	R3	R5	0,626	0,464-0,787	(>) 0,057	0,6	0,712
T_{reg}/CD4⁺CD25⁺	R0	R0	0,543	0,379-0,7073	(<) 0,187	0,6	0,697
	R1	R1	0,602	0,472-0,732	(<) 0,21	0,75	0,576
	R2	R2	0,698	0,567-0,83	(<) 0,171	0,75	0,742
	R3	R3	0,593	0,441-0,746	(<) 0,233	0,7	0,621
	R2	R5	0,561	0,426-0,697	(<) 0,231	0,65	0,652
	R3	R5	0,506	0,364-0,648	(<) 0,229	0,65	0,621

AUC: Area Under the Curve, 95% KI: 95%-Konfidenzintervall der AUC, NR: Zeitpunkt der Gruppe NR, der für die ROC-Analyse verwendet wurde, R: Zeitpunkt der Gruppe R, der für die ROC-Analyse verwendet wurde, Cutoff gem. Youden J: Wert mit der optimalen Kombination aus Sensitivität und Spezifität, das Zeichen (> oder <) vor dem Wert gibt an, ob ein größerer oder kleinerer Wert als der Cutoff eher für ein Rezidiv spricht, Sens.: Sensitivität, Spez.: Spezifität

Tabelle 29: Receiver Operating Characteristics (ROC) - Mean Fluorescence Intensity CD25⁺ T-Lymphozyten

<i>Parameter</i>	<i>NR</i>	<i>R</i>	<i>AUC</i>	<i>95% KI</i>	<i>Cutoff gem. Youden J</i>	<i>Sens.</i>	<i>Spez.</i>
MFI CD25⁺CD4⁺	R0	R0	0,66	0,501-0,82	(>) 29,3	0,353	0,952
	R1	R1	0,799	0,634-0,965	(>) 18,4	0,714	0,913
	R2	R2	0,8	0,659-0,942	(>) 19,1	0,589	0,923
	R3	R3	0,784	0,62-0,952	(>) 31,2	0,643	0,922
	R2	R5	0,78	0,653-0,908	(>) 29,2	0,65	0,875
	R3	R5	0,807	0,681-0,933	(>) 33,6	0,6	0,961
MFI CD25⁺CD8⁺	R0	R0	0,635	0,475-0,795	(>) 17,9	0,952	0,353
	R1	R1	0,719	0,543-0,895	(>) 13,7	0,5	0,957
	R2	R2	0,707	0,505-0,91	(>) 16,7	0,538	0,946
	R3	R3	0,786	0,641-0,932	(>) 14,5	0,571	0,902
	R2	R5	0,73	0,573-0,888	(>) 14,6	0,6	0,911
	R3	R5	0,746	0,585-0,908	(>) 16,6	0,55	0,98

AUC: Area Under the Curve, 95% KI: 95%-Konfidenzintervall der AUC, NR: Zeitpunkt der Gruppe NR, der für die ROC-Analyse verwendet wurde, R: Zeitpunkt der Gruppe R, der für die ROC-Analyse verwendet wurde, Cutoff gem. Youden J: Wert mit der optimalen Kombination aus Sensitivität und Spezifität, das Zeichen (> oder <) vor dem Wert gibt an, ob ein größerer oder kleinerer Wert als der Cutoff eher für ein Rezidiv spricht, Sens.: Sensitivität, Spez.: Spezifität

Tabelle 30: Maßzahlen und Ergebnisse der Signifikanztestung zur Veränderung CD3-positiver Lymphozytenpopulationen gesunder Proband*innen in EDTA-Blut über 75 Stunden - Teil 1/2

<i>Population</i>		<i>3 Std.</i>	<i>27 Std.</i>	<i>75 Std.</i>
Lymphozyten Events in Region 1 / alle Events	Mittelwert	0,159	0,219	0,288
	SD	0,047	0,065	0,064
	Median	0,160	0,211	0,285
	IQR	0,057	0,090	0,104
	Shapiro-Wilk-Test	0,929	0,481	0,142
	Levene-Test		0,294	
	ANOVA (verbunden)		0,030	
	Friedman-Test		0,039	
T-Lymphozyten CD3 ⁺ / Events in Region 1	Mittelwert	0,536	0,707	0,780
	SD	0,145	0,081	0,082
	Median	0,537	0,694	0,794
	IQR	0,199	0,073	0,073
	Shapiro-Wilk-Test	0,708	0,783	0,757
	Levene-Test		0,153	
	ANOVA (verbunden)		0,062	
	Friedman-Test		0,105	
T-Helferzellen CD4 ⁺ / CD3 ⁺ in Region 1	Mittelwert	0,517	0,536	0,644
	SD	0,129	0,096	0,054
	Median	0,566	0,534	0,665
	IQR	0,104	0,157	0,040
	Shapiro-Wilk-Test	0,102	0,126	0,088
	Levene-Test		0,227	
	ANOVA (verbunden)		0,049	
	Friedman-Test		0,039	

Fortsetzung und Beschreibung auf der nächsten Seite.

Tabelle 31: Maßzahlen und Ergebnisse der Signifikanztestung zur Veränderung CD3-positiver Lymphozytenpopulationen gesunder Proband*innen in EDTA-Blut über 75 Stunden - Teil 2/2

<i>Population</i>		<i>3 Std.</i>	<i>27 Std.</i>	<i>75 Std.</i>
CD25⁺ T-Helferzellen CD25 ⁺ / CD3 ⁺ CD4 ⁺ in Region 1	Mittelwert	0,277	0,276	0,283
	SD	0,045	0,075	0,113
	Median	0,267	0,265	0,283
	IQR	0,032	0,100	0,109
	Shapiro-Wilk-Test	0,480	0,601	0,996
	Levene-Test		0,290	
	ANOVA (verbunden)		0,874	
	Friedman-Test		0,779	
regulatorische T-Zellen CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ / CD3 ⁺ CD4 ⁺ in Region 1	Mittelwert	0,028	0,015	0,011
	SD	0,022	0,005	0,004
	Median	0,018	0,015	0,011
	IQR	0,012	0,007	0,005
	Shapiro-Wilk-Test	0,016	0,610	0,616
	Levene-Test		0,032	
	ANOVA (verbunden)		0,229	
	Friedman-Test		0,018	

*Tabelle 30 und 31: Für jede Population sind **Mittelwert**, **Standardabweichung (SD)**, **Median** und **Interquartilsabstand (IQR)** nach 3, 27 und 75 Stunden sowie die *p*-Werte der einzelnen Signifikanztests angegeben. Für die einzelnen Tests gilt: **Shapiro-Wilk** - $p \geq 0,05$ Annahme einer Normalverteilung, **Levene-Test** - $p \geq 0,05$ Annahme einer Homogenität der Varianzen, **ANOVA (verbunden)** - $p < 0,05$ Annahme einer Veränderung über die drei Zeitpunkte, Voraussetzung ist das Vorliegen von Normalverteilung und Varianzhomogenität der Stichproben, **Friedman-Test** - $p < 0,05$ Annahme einer Veränderung über die drei Zeitpunkte, nicht-parametrischer Test, der für die Testentscheidung maßgebliche *p*-Wert ist jeweils hervorgehoben*

Tabelle 32: Signifikanztestung des Verlaufs der sIL2-R α -Konzentration im Blutplasma für die Gruppen NR und R

Gruppe		R0	R1	R2	R3	R4	R5
NR	Mittelwert	1311	1446	1438	1596	1225	–
	SD	642	679	1299	1139	8650	–
	Median	1368	1321	840	997	934	–
	IQR	833	788	776	1014	672	–
	Shapiro-Wilk	0,768	0,683	0,010	0,097	0,194	–
	Levene			0,995			
ANOVA (verbunden)				0,743			
R	Mittelwert	1414	1060	1039	1001	–	543
	SD	422	309	338	388	–	138
	Median	1472	1035	1149	970	–	504
	IQR	530	427	324	387	–	136
	Shapiro-Wilk	0,727	0,631	0,453	0,865	–	0,376
	Levene			0,442			
ANOVA (verbunden)				0,007*			

Für die Signifikanztests sind jeweils die p-Werte angegeben. **Shapiro-Wilk:** $p \geq 0,05$ Annahme einer Normalverteilung, **Levene:** $p \geq 0,05$ Annahme einer Homogenität der Varianzen, **ANOVA (verbunden):** $p < 0,05$ Annahme einer Veränderung über die drei Zeitpunkte bei Vorliegen von Normalverteilung und Varianzhomogenität der Stichproben, die Post-hoc-Testung unter Bonferronikorrektur konnte das signifikante Ergebnis der ANOVA (*) für die Gruppe **R** keinem einzelnen Paar von Analysezeitpunkten zugeordnet werden (Tabelle 33). Es wird daher, nach der Post-hoc-Analyse die Nullhypothese beibehalten und das Ergebnis als nicht signifikant eingestuft.

Tabelle 33: Post-hoc-Analyse des Verlaufs der sIL2-R α -Konzentration im Blutplasma für die Gruppen NR und R

NR									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	1,000			
R2	1,000	1,000			R2	1,000	1,000		
R3	1,000	1,000	1,000		R3	1,000	1,000	1,000	
R4	1,000	1,000	1,000	1,000	R4	1,000	1,000	1,000	1,000
R									
T-Test	R0	R1	R2	R3	Wilcoxon	R0	R1	R2	R3
R1	1,000				R1	1,000			
R2	1,000	1,000			R2	1,000	1,000		
R3	1,000	1,000	1,000		R3	1,000	1,000	1,000	
R5	0,160	0,290	1,000	1,000	R5	1,000	1,000	1,000	1,000

NR Patient*innen ohne Rezidiv, **R** Patient*innen mit Rezidiv, **Wilcoxon** Wilcoxon-Rangwert-Test, es sind jeweils die p-Werte nach Adjustierung angegeben. Das signifikante Ergebnis der ANOVA für die Gruppe **R** (Tabelle 32) konnte in der Post-hoc-Analyse keinem einzelnen Paar von Analysezeitpunkten zugeordnet werden. Es wurde daher die Nullhypothese beibehalten.

Tabelle 34: Vergleich der sIL2-R α -Konzentrationen im Blutplasma zwischen den Gruppen NR und R

<i>T-Test</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>	<i>Wilcoxon</i>	<i>NR R0</i>	<i>NR R1</i>	<i>NR R2</i>	<i>NR R3</i>
<i>R R0</i>	1,000				<i>R R0</i>	1,000			
<i>R R1</i>		1,000			<i>R R1</i>		1,000		
<i>R R2</i>			1,000		<i>R R2</i>			1,000	
<i>R R3</i>				1,000	<i>R R3</i>				1,000
<i>R R5</i>			1,000	1,000	<i>R R5</i>			0,343	0,343

*NR Patient*innen ohne Rezidiv, R Patient*innen mit Rezidiv, Wilcoxon Wilcoxon-Rangwert-Test, es wurden jeweils zweiseitige Tests für unverbundene Stichproben angewendet, die p-Werte sind adjustiert angegeben.*