

Zellulärer Immunstatus von Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

eingereicht an der

Medizinischen Fakultät der Universität Augsburg

von

Anja Schuh

Augsburg, 14.07.2022



Eidesstattliche Versicherung und Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Zudem wurden keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet. Außerdem versichere ich, dass die Dissertation keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde und ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

Augsburg, 14.07.2022

Statutory declaration and statement

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources/resources. As well I declare that I have not submitted a dissertation without success and not passed the oral exam. The present dissertation (neither the entire dissertation nor parts) has not been presented to another examination board.

Augsburg, 14.07.2022

Dissertation eingereicht am: 14.07.2022

Erstgutachter: Prof. Dr. Martin Trepel

Zweitgutachter: PD Dr. Stefanie Gilles

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2023

Widmung

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Tumore - Epidemiologie, Definition, Pathogenese, Risikofaktoren	10
1.2	Aufbau des Immunsystems	12
1.3	Chemotherapie und Immuntherapie im Fokus der Behandlung	21
2	Zielsetzung und Fragestellungen	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Patientenkollektiv	24
3.2	Gewinnung der Blutproben	24
3.3	Antikörper und Fluorochrome	25
3.4	Das verwendete Durchflusszytometer.....	28
3.5	Vorbereitung der Blutproben.....	30
3.6	Durchflusszytometrie	34
3.6.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	34
3.6.2	Das Flüssigkeitssystem	36
3.6.3	Das optische System.....	37
3.6.4	Das elektronische System	40
3.6.5	Das Phänomen des Spillovers	41
3.6.6	Graphische Darstellung der Ergebnisse	42
3.7	Gating-Strategien	43
3.7.1	B-Lymphozyten und deren Subpopulationen	45
3.7.2	T-Lymphozyten und deren Subpopulationen.....	46
3.7.3	NK-Lymphozyten und deren Subpopulationen.....	57
3.8	Statistik	61

4	Ergebnisse	62
4.1	Beschreibung der Studienpopulation	62
4.2	Lymphozytenzahlen - Patienten vs. gesunde Kontrollprobanden	64
4.3	Einfluss der Chemotherapie auf Lymphozyten der Tumorpatienten	67
4.3.1	B-Lymphozyten und deren Subpopulationen	67
4.3.2	T-Lymphozyten und deren Subpopulationen	70
4.3.3	NK-Lymphozyten und deren Subpopulationen	72
4.4	Endogene und exogene Effekte auf Lymphozyten der Patienten	73
4.4.1	Patienteneigene Faktoren	73
4.4.1.1	Die Rolle des Geschlechts	73
4.4.1.2	Infektionen während Chemotherapie	75
4.4.1.3	Verlauf der Erkrankung	77
4.4.2	Therapiebedingte Faktoren	80
4.4.2.1	Substitution von G-CSF	80
4.4.2.2	Zusätzliche Therapie via Radiatio	81
4.4.2.3	Das Chemotherapeutikum Platin	82
5	Diskussion	84
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	84
5.2	Diskussion der Methoden	84
5.3	Diskussion der Ergebnisse	89
5.4	Fazit – Stärken und Schwächen dieser Studie	96
5.5	Ausblick	97
6	Zusammenfassung	98
7	Publikation	100
8	Literaturverzeichnis	101
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	111
10	Anhang	115
10.1	Ethikvotum	115

10.2	Statistische Auswertung	117
10.3	Patienteninformation und Einverständniserklärung	121
11	Danksagung	123

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
7-AAD	7-Aminoactinomycin
AF488	Alexa-Fluor 488
APC	antigenpräsentierende Zellen
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
BD	Becton Dickinson and Company
bright	bright expression, starke Expression
BP	Bandpass-Filter, Bandbreitenfilter
CD	clusters of differentiation, Oberflächenmarker
CD40L, CD62L	CD40-, CD62-Ligand
CR	complete remission/response, Vollremission
CTL	zytotoxische T-Zellen
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DAMPs	damage-associated molecular patterns
dim	dim expression, schwache Expression
ECD, PE-TR, RED613	Phycoerythrin-TexasRed, PE-TexasRed
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMRA-T-Zellen	effector memory RA+, terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calb serum, fötales Kalbserum; Flow Cytometry Standard Format
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL1, FL2, FL3, FL4, FL5	Fluoreszenzkanäle 1, 2, 3, 4, 5
FLOT	Chemotherapie-Schema aus 5-Fluoruracil, Leucovorin/Folinsäure, Oxaliplatin, Taxan/Docetaxel
FN	febrile Neutropenie
FOLFIRI	Chemotherapie-Schema aus Folinsäure/Leucovorin, 5-Fluoruracil, Irinotecan
FOLFIRINOX	Chemotherapie-Schema aus Folinsäure/Leucovorin, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin
FoxP3	forkhead box protein 3, Scurfin
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
G	Gauge

G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease, Spender-gegen- Empfänger-Reaktion, Graft-versus-Host-Reaktion
HCC	hepatozelluläres Karzinom
hi	high expression, besonders starke Expression
HLA	Human Leucocyte Antigen, humanes Leukozyten-Antigen
ICD	immunogenic cell death, immunogener Zelltod
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17	Interleukine 2, 4, 5, 10, 13, 17
KRK	kolorektales Karzinom
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LMD	list mode data, correlated data, Listmode Daten, Listenmodusdateien
LP, DLP	Longpass-/Langpass-, dichroitischer Longpass-Filter
mAb	monoclonal antibody, monoklonaler Antikörper
MCL	Multi-Carousel, Multikarussell
MESF	molecules of equivalent soluble fluorochrome
ml	Milliliter
mW	Milliwatt
NK-Zellen, -Lymphozyten	natürliche Killer-Zellen, -Lymphozyten
NKT	Natural killer like T cells, natürliche Killerzellen ähnliche T-Zellen
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NSCLC	non-small cell lung cancer, nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
PB	peripheres Blut
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC5, PE-Cy5, Cy-Chrome, TriChrome, TriColor	Phycoerythrin-Cyanin-5
PC7, PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin-7
PD	progressive disease, progressive Erkrankung

PD-1, CD279	programmed cell death protein 1
PE	Phycoerythrin
PerFix-nc kit	PerFix no centrifuge assay kit
PMT	Photomultiplier Tubes, Photoröhren
PR	partial remission, Teilremission
Re	Reynoldsche Zahl
RIA	Radioimmunassay
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SCLC	small cell lung cancer, kleinzelliger Lungenkrebs
SP, DSP	Shortpass-/Kurzpass-, dichroitischer Shortpass-Filter
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	tumor necrosis factor, Tumornekrosefaktor
Treg-Zellen	Tregs, regulatorische T-Zellen
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Tumore - Epidemiologie, Definition, Pathogenese, Risikofaktoren

Bereits der griechische Arzt Hippokrates beschrieb um 500 v. Chr. mit „carcinosa“ und „carcinoma“ nicht-ulzerierende und ulzerierende Tumore (1). Bis heute im 21. Jahrhundert stellen sie eine der gefürchtetsten Erkrankungen für die Menschheit dar (2) (3): Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO sorgen sie jährlich für etwa acht Millionen Tote weltweit (4). In zehn Jahren sollen mehr als 11 Millionen pro Jahr an Malignomen sterben (4). Darüber hinaus entwickelt sich bei jedem Zweiten in Deutschland laut dem Robert-Koch-Institut (RKI) ein Tumor (5). Besonders im Alter nimmt die Inzidenz zu: Bei insgesamt ungefähr 500.000 jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland werden etwa 20.000 Patienten zwischen 15 und 39 Jahren neu diagnostiziert, der andere große Anteil beläuft sich auf Menschen über 40 Jahre (siehe Abbildung 1) (5). Dabei leiden und sterben Männer häufiger an einer Krebserkrankung als Frauen im Verhältnis 50% zu 40% bzw. 25% zu 20% (6).

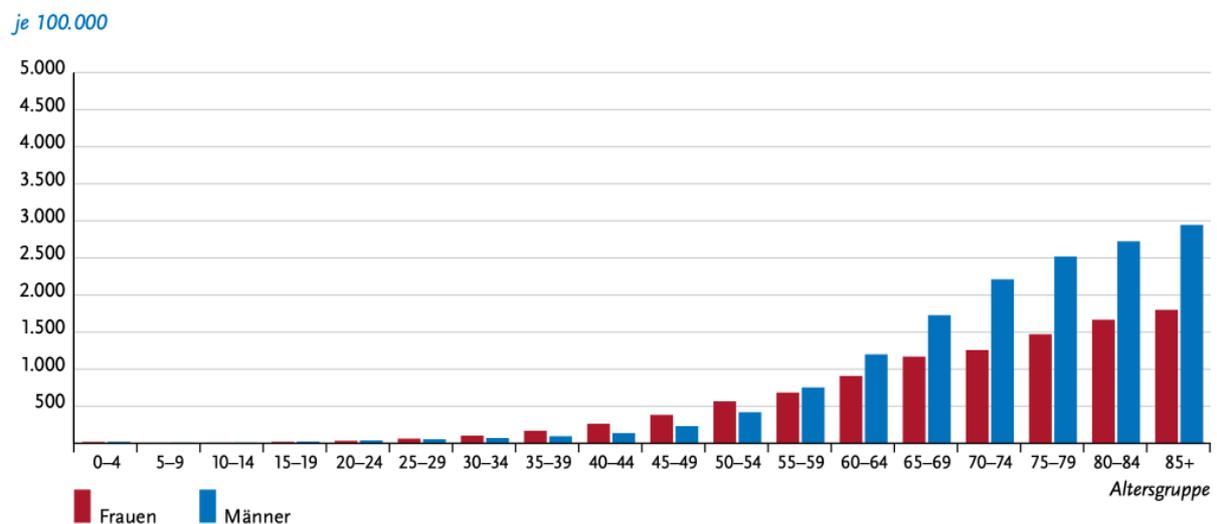


Abb. 1: Erkrankungsrate nach Geschlecht abhängig vom Alter (5)
(RKI, 2019, S. 75, Abb. 3.16.2)

In Deutschland stehen Prostata- und Mammakarzinome an erster Stelle, gefolgt von kolorektalen Karzinomen und Lungenkrebs bei beiden Geschlechtern, wie in Abbildung 2 sichtbar (5).

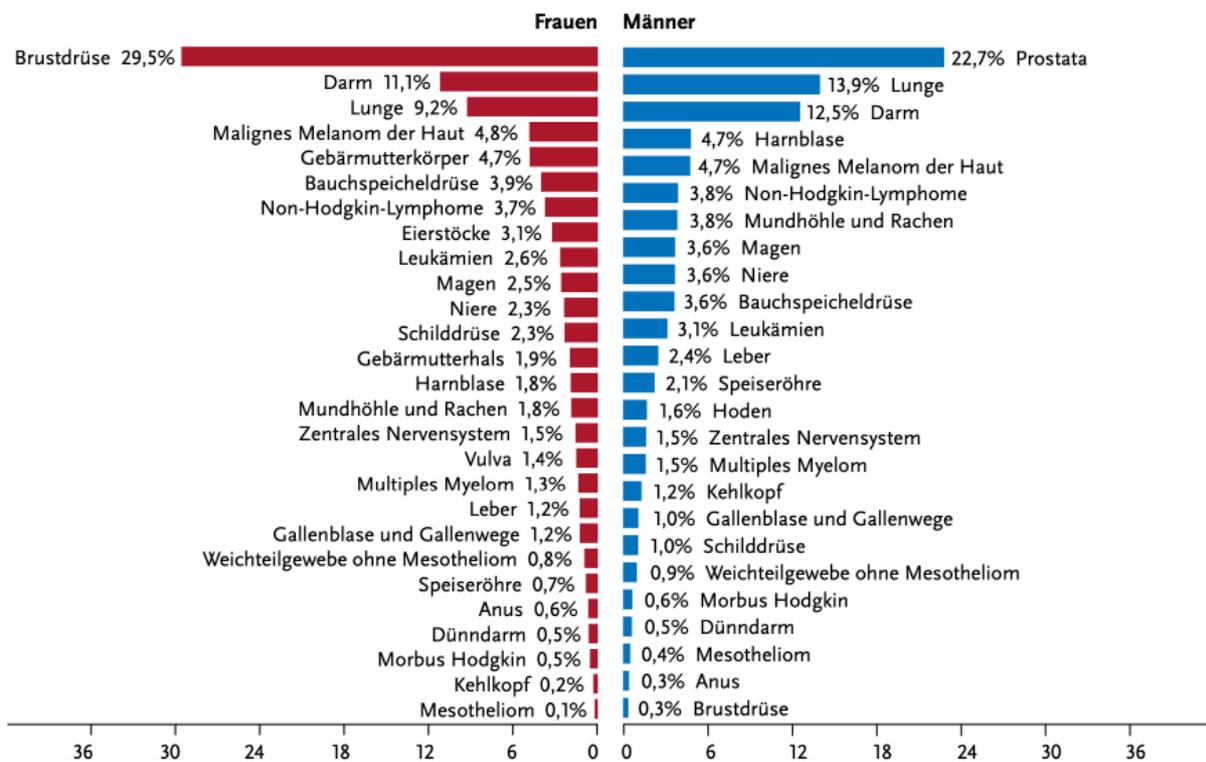


Abb. 2:

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (5)

(RKI, 2019, S. 17, Abb. 3.0.1)

Malignome können sich aus jedem Organ und jeder anderen Körperstruktur entwickeln. Es kommt durch genetische Veränderungen in der DNA von Zellen zu einer unkontrollierten Proliferation, wodurch diese entarten und sich zu einem Tumor formieren können (2) (4).

Die Auslöser für Mutationen in Körperzellen sind vielfältig: Zum einen spielen exogene Risikofaktoren eine Rolle. Dazu zählen z.B. konstant hoher Stress, chronische Erkrankungen, Nikotin- und Alkoholabusus, UV- und Radon-Strahlung, Hormonersatz- und Chemotherapie, der Missbrauch von Kortikosteroiden, Antibiotika und Analgetika sowie ein höheres Alter (2) (4) (7). Auch Infektionen beispielsweise mit Salmonella typhi, Borrelia burgdorferi, humanem Papillomavirus und anderen Viren sollen mit etwa 20% zu der Entstehung von Malignomen beitragen (8). Den neuesten Studien zufolge steht auch die tägliche Essensaufnahme im Vordergrund. Zu wenig Gemüse und Früchte, keine ausreichende Zufuhr von Folsäure sowie häufiger Konsum von rotem Fleisch und Salz werden diskutiert (8) (9).

Zum anderen können sich, neben Umwelteinflüssen, akzidentiell täglich ca. 20.000 Mutationen in einer normalen Körperzelle ausbilden (4). Die Tumorentstehung wird dann dadurch begünstigt, wenn die immunologischen Kontrollmechanismen des Körpers im Rahmen eines kompromittierten Immunsystems geschwächt sind und nicht mehr dazu fähig sind, die fehltransformierten Zellen frühzeitig oder überhaupt zu erkennen und abzuwehren (4) (7) (8).

Doch auch wenn zunehmend Präventionsmaßnahmen zur Reduktion der äußeren Risikofaktoren ergriffen werden, steigen die Zahlen an Tumorerkrankungen. Im Hinblick darauf ist es notwendig, den Fokus in Zukunft auf die Behandlung von Malignomen und den Möglichkeiten für ihre Optimierung zu setzen.

1.2 Aufbau des Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus lymphatischen Organen, Zellen und humoralen Signalen sowie Zytokinen (10). Seine Aufgabe ist es, pathogene Keime wie z.B. Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen abzuwehren sowie entartete Zellen zu erkennen und zu vernichten (10). Hierbei wird zwischen angeborener und erworbener Immunität unterschieden.

Zum Immunsystem, das von Beginn an existiert, gehören Barrieren wie Haut und Schleimhäute. Außerdem zählen Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Lymphozyten), neutrophile Granulozyten, Akute-Phase-Proteine und das Komplementsystem dazu (10). Sie ermöglichen eine schnelle, jedoch antigenunspezifische Immunantwort (10).

Das adaptive Immunsystem umfasst Lymphozyten mit spezifischen Rezeptoren für fremde Substanzen, Antigene genannt (10). Auf diese reagieren T-Zellen, wenn sie mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) in Kontakt kommen (10). Dadurch werden sie zur Aktivierung oder Differenzierung angeregt (10). Da sich ein immunologisches Gedächtnis bildet, würde bei erneuter Exposition mit dem gleichen Antigen eine effektivere Immunantwort ausgelöst werden (10).

Lymphozyten entwickeln sich aus Stammzellen des Knochenmarks und verteilen sich im Laufe ihres Differenzierungsprozesses im Thymus und in peripheren lymphatischen Organen sowie in Schleimhäuten, Blut und Lymphflüssigkeit (10). Entsprechend ihres Entstehungsortes und ihrer Aufgaben werden dabei zwei Zellpopulationen unterschieden: B- und T-Lymphozyten (10).

B-Zellen wandern ausgehend vom Knochenmark in die Follikel der Lymphknoten, in denen sie zu Plasma- oder Gedächtnis-Zellen heranreifen (11). Plasmazellen bilden Antikörper, die eine wichtige Komponente der adaptiven humoralen Immunität darstellen (11). B-Lymphozyten sind sowohl für die adaptive als auch die angeborene Immunität verantwortlich. Dabei wird zwischen ruhenden und aktivierten naiven B-Zellen unterschieden (10). Aktivierte naive B-Lymphozyten erfahren mittels Signale durch CD4⁺ T-Helferzellen klonale Expansion (10). Zum Beispiel ist die Interaktion zwischen CD40 auf B-Zellen und dem CD40L (CD40-Ligand) auf T-Zellen dafür verantwortlich (11). Diese CD40-Signalübertragung sorgt dafür, dass naive B-Zellen sich zu einem Zwischenstadium zwischen naiven B-Zellen und Plasmazellen entwickeln, den transitorischen B-Lymphozyten (11). Diese sind unreife Zellen, die sich vom Knochenmark aus in der Milz entwickeln (12). Danach können sich B-Zellen zu verschiedenen

Typen von Effektorzellen differenzieren: Keimzentrum- und Gedächtnis-Zellen oder zu Plasmazellen (13) (14) (15) (16). Während diese Antikörper produzieren, Pathogene binden und sie beseitigen und damit eine Infektion oder Immunreaktion schnell beenden (11) (17), dienen Gedächtnis-B-Zellen dazu, rasch auf nachfolgende Angriffe auf das Immunsystem zu reagieren (12). Ob eine einzelne naive B-Zelle alle drei Zellen bilden kann, bleibt unklar (11) (15). Genauso ist unbekannt, welche B-Zellen welchen Weg nehmen und welche Einflüsse auf sie für diese Entscheidung wirken (11) (12) (13) (15).

Die Lymphozyten haben wie jede Körperzelle spezifische Antigene auf ihrer Oberfläche, anhand derer sie eindeutig charakterisiert sind und die als clusters of differentiation, CD genannt, bezeichnet werden (18). Diese Antigene können durch monoklonale Antikörper erkannt werden (18). Dadurch ist es möglich, verschiedene Lymphozytensubpopulationen wie z.B. von B-, T- und NK-Zellen zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die häufigsten und relevantesten Zelloberflächenmarker verwendet, die in Tabelle 1 aufgeführt sind (18).

Verschiedene Studien zeigen unterschiedliche Immunphänotypisierungen von B-Zellen. CD20 und CD19 sind charakteristisch für sie (18). CD38 dient der Unterscheidung zwischen Plasmablasten, Vorläufern von Plasmazellen, und transitorischen B-Zellen (13) (18). Diese werden anhand von CD24 separat identifiziert (17) (18). IgD und CD27 tragen zur Unterscheidung zwischen naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei (18). Durch die IgD-Oberflächenexpression wird bei Gedächtnis-B-Lymphozyten zwischen klassengewechselter und nicht-klassengewechselter Immunglobulin-Produktion weiter unterteilt (19) (20) (21): Klassengewechselte Gedächtnis B-Zellen (CD27+ IgD-) werden hauptsächlich in Keimzentren gebildet und spielen eine Schlüsselrolle bei adaptiven Immunantworten (18) (21). Nicht-klassengewechselte B-Zellen (CD27+ IgD+) beinhalten hauptsächlich Marginalzonen-B-Zellen und schützen vor Bakterien mit Kapsel (21). Neben Tabelle 1 stellen Abbildung 3 und Tabelle 7 in Kapitel 3.7.1 einen Überblick über die Expressionseigenschaften dar.

Marker	Art des Moleküls	Zugehörigkeit
CD19	Membran-Glykoprotein	alle B-Zellen
CD20	Glykosyliertes Phosphoprotein	alle B-Zellen außer Plasmazellen und Plasmablasten
IgD	Antikörpermolekül in Y-Form	alle B-Zellen außer Plasmazellen
CD27	Membran-Glykoprotein	Gedächtniszellen, Plasmazellen, Plasmablasten
CD24	Zelladhäsionsmolekül	transitorische B-Zellen
CD38	Oberflächen-Glykoprotein	alle aktivierten B-Zellen

Tab. 1: Überblick über die Marker der B-Zellen
(Anlehnung an: BD Biosciences, 2011, S. 1-2; Sack, 2007, S. 58-60 Tab 6.)

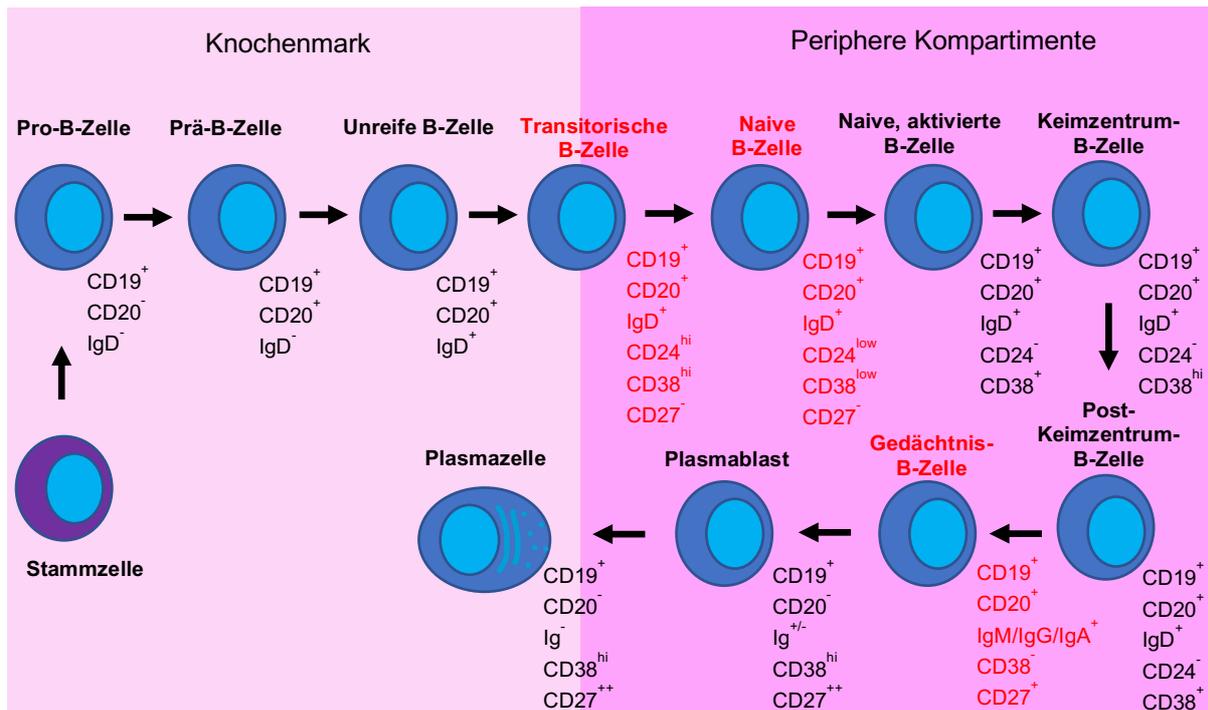


Abb. 3: Entwicklung der B-Zellen mit ihren Expressionseigenschaften
(Anlehnung an: Zündorf/Dingermann DAZ, 2016, S. 36)

Wie viele B-Zellen ein Mensch besitzt, ist individuell und kann derzeit nicht anhand von Zahlen belegt werden. Seifert beschreibt, dass ca. 40% der B-Lymphozyten bei einem Erwachsenen Gedächtnis-B-Zellen sind (22). Bei Neugeborenen gibt es am meisten naive und transitorische B-Zellen sowie wenige Gedächtnis-Zellen (20). Im Vergleich zur Immunantwort bei jungen Menschen nimmt im Alter die zelluläre und humorale Immunantwort quantitativ und qualitativ ab. Auch das angeborene Immunsystem wird im Laufe des Lebens beeinträchtigt (23). Da sich die Zellproduktion im Knochenmark bei Älteren verringert, ist auch die Zahl der naiven Zellen minimiert (24). Außerdem ist bekannt, dass die Diversität der B-Lymphozyten bei älteren Menschen reduziert ist (23) (24). Bei gealterten B-Zellen werden Defekte bei Klassenwechsel beschrieben. Dies führt zu einer eingeschränkten Bildung von Antikörpern und deren Funktionen (24). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass B-Zellen durch CD4⁺ T-Helferzellen aktiviert werden. Diese werden auch mit zunehmendem Alter geschwächt (24).

Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass Gedächtnis B-Zellen schneller proliferieren als alle anderen B-Zellen, vor allem naive (14) (25).

B-Lymphozyten spielen eine wesentliche Rolle bei den meisten Tumorentitäten. Es ist umstritten, ob sie einen positiven oder einen negativen Effekt auf den Verlauf einer Tumorerkrankung haben. Therapiestrategien zur Einschränkung oder Förderung von B-Zellen werden diskutiert (26). Bei Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematodes und rheumatoide Arthritis steht aktuell die Depletion von B-Zellen als

Therapie im Vordergrund (26). Hier produzieren B-Lymphozyten Autoantikörper und Zytokine und präsentieren Antigene (26). Gerade deshalb ist es wichtig, B-Zellen und ihre Aufgaben bei Tumorerkrankungen besser zu verstehen (26).

Zusammen mit B-Lymphozyten bilden T-Zellen die Mehrheit der Immunzellen und werden auch zunehmend bei Immuntherapien für Tumorerkrankungen benötigt (27). Daher ist es auch bedeutend, herauszufinden, wie sich meist vor Immuntherapien stattfindende zytostatische Behandlungen auf T-Lymphozyten auswirken (27). T-Lymphozyten reifen im Thymus, in dem sie ihre Antigen-spezifität entwickeln und sich zu Effektorzellen differenzieren: Als T-Helferzellen (Th-Zellen) aktivieren sie andere Zellen für die Immunantwort, z.B. Makrophagen und B-Lymphozyten (10) (27). In ihrer Rolle als zytotoxische T-Zellen (CTL) vernichten sie von Pathogenen infizierte Zellen (27). Damit sind sie ein wichtiger Bestandteil der erworbenen zellulären Immunität (10).

T-Lymphozyten stellen bis zu 24% der Leukozyten im Blut dar und können anhand von CD3, CD4 und CD8 charakterisiert werden (18) (28). Ähnlich wie bei B-Zellen gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, die unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen anhand von Oberflächenmarkern zu beschreiben (29). Um die Fraktionen naive, Effektor-Gedächtnis-, zentrale Gedächtnis- und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen zu definieren, werden häufig CD45RA und CCR7 verwendet (18) (30). Der C-C-Chemokin-Rezeptor 7 (CD197) gehört zu den Homing-Rezeptoren, der dafür sorgt, dass verschiedene T-Zell-Subpopulationen und antigenpräsentierende Zellen in die Lymphknoten wandern (30). Dort können T-Lymphozyten antigenspezifisch aktiviert werden, indem sie mit dendritischen Zellen interagieren (30). Der Oberflächenmarker CCR7 charakterisiert daher die Zelltypen naive- und zentrale Gedächtnis-T-Zellen im lymphatischen Gewebe (30) (31). Mithilfe von CD45RA können naive T-Zellen identifiziert werden, die noch nicht in die Nähe von Antigenen gekommen sind (32). Die Expression von CD45RO bezeichnet einen Antigenkontakt, weshalb damit Gedächtniszellen definiert werden (18) (30). Terminal differenzierte Gedächtnis-Effektor-T-Zellen sind diejenigen, die CD45RA erneut exprimieren können und damit bei wiederholter Stimulation sofort funktionieren (32) (33). Naive T-Zellen exprimieren CCR7, CD45RA und CD62L (18). Der CD62-Ligand ist das Zelladhäsionsmolekül L-Selectin (34). CD8- als auch CD4-positive T-Zellen können jeweils in drei Gedächtniszellsubpopulationen eingeteilt werden: Zentrale Gedächtniszellen sind eine Zellpopulation in Lymphknoten. Sie haben CCR7 auf ihrer Oberfläche, exprimieren jedoch nicht CD45RA (32). Zentrale Gedächtnis T-Zellen entwickeln sich zu Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen, wenn sie via Antigen aktiviert werden (33). Effektor-Gedächtniszellen zirkulieren im peripheren Blut und können nicht mit Hilfe von CCR7 und CD45RA identifiziert werden (18). Terminal differenzierte Effektor-Gedächtniszellen tragen zwar CD45RA, aber kein CCR7 an ihrer Oberfläche (31)

(32). Effektor-Gedächtniszellen zeigen eine stärkere Abwehrfunktion als zentrale Gedächtniszellen, da sie stärker zytotoxisch sind und vor allem Zytokine bilden, die die Th1-Immunantwort aktivieren, z.B. IFN- γ (Interferon- γ) (30). Zentrale Gedächtniszellen produzieren vor allem Interleukin 2 (IL-2), einen wichtigen Wachstumsfaktor für die klonale Expansion von T-Zellen (30). Darüber hinaus weisen sie eine höhere Proliferationsaktivität als Effektor-Gedächtnis- und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-Zellen auf und können besser Apoptosestrategien supprimieren (32).

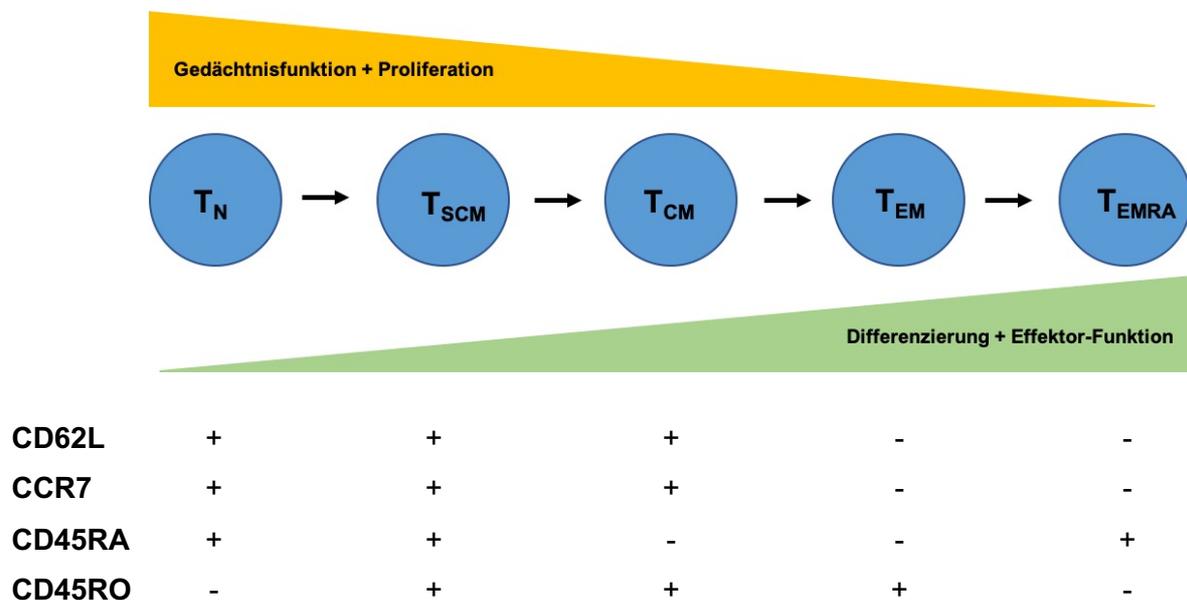


Abb. 4: Differenzierung und Expressionseigenschaften von T-Lymphozyten (T_{SCM} , Gedächtnis-Stammzelle)
(Anlehnung an: Restifo, 2014, S. 476-477)

Abbildung 4 sowie die Tabellen 2 und 8 im Kapitel 3.7.2 veranschaulichen die Definition der T-Zellen über die CD-Moleküle.

Des Weiteren werden CD8-positive T-Zellen in ihrer Entwicklung in früh, intermediär und spät anhand von CD28 und CD27 eingeteilt (siehe Tabelle 10 in Kapitel 3.7.2) (29) (35) (36). Je reifer sie werden und je mehr Antigenkontakt sie haben, desto weniger werden CD28 und CD27 exprimiert (35) (36). Im Vergleich zu CD28-negativen CD8+ T-Lymphozyten weisen CD28-positive eine höhere Proliferationsfähigkeit auf und bilden eine größere Anzahl an verschiedenen Zytokinen, wie z.B. IL-2. Deshalb stellen sie mehr als 95% aller CD8-positiven T-Zellen in lymphatischen Geweben dar (35). Daneben werden noch erschöpfte CD8-positive T-Lymphozyten und terminal differenzierte Effektor CD8+ T-Zellen unterschieden. Im Gegensatz zu erschöpften Zellen, die sich nach chronischer Antigenstimulation nicht

weiterentwickeln und nicht proliferieren können, werden terminal differenzierte Effektor-CD8-positive T-Zellen als diejenigen beschrieben, die trotz und durch weiterhin dauerhaftem Antigenkontakt dazu fähig sind, sich wieder zu erholen und gesteigerte Proliferationskapazität zu erlangen (35). Warum ein Teil in replikativer Seneszenz endet und ein anderer Teil sich terminal differenziert, ist jedoch aktuell noch unklar (36). Terminale Effektor-Zellen exprimieren CD57, ein Zelladhäsionsmolekül, aber kein PD-1, programmed death-1, auch CD279 genannt, erschöpfte CD8-positive T-Zellen dagegen PD-1, aber kein CD57 (35). PD-1 ist ein Oberflächenprotein der Immunglobulin-Superfamilie (36).

Darüber hinaus wurden regulatorische T-Zellen, Tregs genannt, untersucht. Tabelle 9 in Kapitel 3.7.2 zeigt ihre Expressionseigenschaften. Tregs sind eine Untergruppe von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und kontrollieren sowohl andere T-Zellen des Immunsystems als auch eigene und fremde Antigene über direkte Zell-Zell-Kontakte oder über Botenstoffe, um z.B. Autoimmunreaktionen zu verhindern (37). Sie werden mittels CD25, einer alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R α), identifiziert (37). Weisen die regulatorischen Zellen eine sehr hohe Ausstattung von CD25 auf (CD25^{hi}), exprimieren sie den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead box protein 3) (37). FoxP3 stellt einen Transkriptionsfaktor der „forkhead“ Familie dar, der für die Bildung und die Aufgabe der Suppression von regulatorischen Zellen verantwortlich ist (38) (39). Als sensitivster Marker für Tregs ist er mehr auf CD4⁺ als auf CD8⁺ T-Zellen zu finden (40) (41).

Mittels CD69 und HLA (Human Leucocyte Antigen) werden aktivierte T-Lymphozyten wie T-Helfer- und zytotoxische Zellen identifiziert (siehe Tabelle 10) (18) (34).

Zuletzt wurden CD4⁺ T-Helfer-Zellen in der vorliegenden Arbeit analysiert. Zusammen mit regulatorischen T-Zellen spielen sie auch eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von humoralen und zellulären Immunantworten (18). Th1-Zellen sezernieren IL-2, IFN- γ und TNF (tumor necrosis factor), aktivieren Makrophagen, helfen bei der Bildung von Antikörpern wie IgM, IgG und IgA und verhindern allergische Reaktionen vom späten Typ (42). Th2-Zellen dagegen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, aktivieren B-Zellen, unterstützen die Entwicklung von allen Antikörperklassen und supprimieren zellvermittelte Immunität (42) (43).

Th17-Zellen bilden IL-17 und sorgen zusätzlich zu Th1- und Th2-Zellen für die Abwehr von Pathogenen (43). Alle drei T-Helfer-Zellen exprimieren verschiedene Chemokinrezeptoren: CXCR3, CCR4, CCR5 und CCR6 (18). Th1-Lymphozyten tragen CXCR3 und CCR5 auf ihrer Oberfläche, Th2-Zellen ausschließlich CCR4 und Th17-Zellen CCR4 und CCR6 (siehe Tabelle 11 in Kapitel 3.7.2) (18) (34).

Marker	Art des Moleküls	Zugehörigkeit
CD3	Proteinkomplex	alle T-Zellen
CD4	Oberflächen-Glykoprotein	CD4+-T-Zellen
CD8	Oberflächenprotein	CD8+-T-Zellen
CCR7, CD197	Chemokinrezeptor	naive T-Zellen, zentrale Gedächtnis-T-Zellen
CD45RA	Protein-Tyrosin-Phosphatase	naive T-Zellen
CD45RO	Protein-Tyrosin-Phosphatase	Gedächtnis-T-Zellen
CD62L	L-Selektin, Zelladhäsionsmolekül	naive T-Zellen
CD28	Oberflächenprotein	unreife bis wenig reife CD8+ T-Zellen
CD27	Membran-Glykoprotein	unreife bis wenig reife CD8+ T-Zellen
CD57	Mitglied der 3-beta-Glucuronosyltransferase Gen-Familie	terminale Effektor-CD8+ T-Zellen
PD-1, CD279	Oberflächenprotein der Immunglobulin-Superfamilie	erschöpfte CD8+ T-Zellen
CD25	Alpha-Kette des IL-2-Rezeptors	regulatorische T-Zellen
FoxP3	Transkriptionsfaktor	regulatorische T-Zellen
CD69	Transmembran C-Typ Lektinprotein	aktivierte T-Zellen
HLA	Zellmembran-Glykoproteine	aktivierte T-Zellen
CXCR3	Chemokinrezeptor	Th1-Zellen
CCR4	Chemokinrezeptor	Th2-, Th17-Zellen
CCR5	Chemokinrezeptor	Th1-Zellen
CCR6	Chemokinrezeptor	Th2-Zellen

Tab. 2: Überblick über die Marker der T-Zellen (34)

(Anlehnung an: BD Biosciences, 2011, S. 1-2)

Neben T- und B-Zellen gehören auch Natürliche Killerzellen zum Immunsystem (44). Sie tragen wesentlich zur angeborenen Immunität bei (44). Sie erkennen und beseitigen infizierte oder veränderte Zielzellen (45). Sie regulieren Immunantworten, indem sie Zytokine wie z.B. IFN- γ freisetzen sowie kostimulatorische und regulatorische Liganden exprimieren (45). Damit greifen sie in das adaptive Immunsystem ein (45). Sie stellen etwa 10% bis 15% der Lymphozyten im peripheren Blut und die drittgrößte Lymphozytenpopulation neben B- und T-Zellen dar (45) (46).

NK-Zellen lassen sich von anderen lymphatischen Zellen durch die Abwesenheit von T- und B-Zell-spezifischen Markern, z.B. CD3 und CD19, durch die Anwesenheit des neuronalen

Zelladhäsionsmoleküls CD56 und von CD16, auch FcR γ III genannt, einem Rezeptor, unterscheiden (siehe Tabelle 12 in Kapitel 3.7.2) (47). Sie haben eine Verwandtschaft mit T-Zellen, weil sie von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen (47). Dementsprechend weisen sie Überlappungen in ihrem Immunphänotyp auf, wie die Oberflächenmoleküle CD2, CD7 und CD8 (18). Es gibt abhängig von deren CD56/CD16-Expression zwei wesentliche Subpopulationen von reifen NK-Zellen: CD56^{bright}CD16^{dim} und CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen (47).

CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Lymphozyten machen ca. 10% der gesamten NK-Zellen aus, sind unreif und produzieren vorwiegend Zytokine innerhalb von wenigen Stunden nach ihrer Aktivierung und sind weniger zytotoxisch (47) (48) (49). Deshalb werden sie auch als zytokinproduzierender Typ oder NK-Zytokinproduzent bezeichnet. Sie spielen vor allem bei chronischen Entzündungen eine Rolle und können weiter in CD56^{bright}CD16⁺ und CD56^{bright}CD16⁻ unterteilt werden (50).

CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen sind reif und stellen etwa 90% der NK-Zellen im Blut dar (48) (49). Sie zeichnen sich durch eine schwache Bildung von Zytokinen und eine starke zytotoxische Aktivität aus, weshalb sie auch zytotoxischer Typ oder natürliche Killerzellen genannt werden (18) (48) (49) (50). CD56^{dim} NK-Zellen werden vorwiegend bei akuten Entzündungen rekrutiert (49). Innerhalb von CD56^{dim} NK-Zellen unterscheidet man verschiedene funktionelle Subpopulationen anhand ihres Reifungsstatus, wobei wenig entwickelte Zellen CD94 und CD62L exprimieren, aber kein CD57 (50).

Die relativen und absoluten Zahlen von NK-Zellen nehmen mit dem Alter zu, aber die Anzahl an CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen nimmt ab, vermutlich aufgrund der geringeren Produktion von solchen NK-Zellen im Knochenmark (50).

Die Entwicklung von CD56^{dim} und CD56^{bright} ist bisher nicht komplett verstanden.

Auch NK-Zellen spielen eine relevante Rolle bei Tumorerkrankungen. Sie kontrollieren das Wachstum von Tumoren und Metastasen, indem sie Krebszellen erkennen und sie beseitigen können. Bei Brust- und Kopf-Hals-Karzinomen wurde allerdings eine Reduktion der Anzahl von CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen festgestellt (50). Die Anzahl von CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen jedoch nimmt abhängig vom Progress des Malignoms zu (50). Dies trifft bei Patienten mit Brustkrebs und Melanomen als auch bei Kindern mit Knochenmarktumoren und Leukämie zu (50). Bei Ovarial- und Ösophagus-Karzinomen lassen sich diese Beobachtungen hingegen nicht finden (50).

Neben NK-Zellen wurden NK-ähnliche T-Zellen analysiert, da sie auch zum angeborenen und adaptiven Immunsystem gehören (51). Sie sind eine sehr heterogene Gruppe an T-Zellen und es werden zwei Typen unterschieden: NKT-Zellen vom Typ 1 richten sich gegen Tumore, Typ 2 Zellen dagegen supprimieren Anti-Tumor-Antworten (51). Genauso wie NK-Zellen exprimieren sie CD56 (51) (52).

Marker	Art des Moleküls	Zugehörigkeit
CD56, NCAM1	neurales Zelladhäsionsmolekül	NK-, NKT-Zellen
CD16, FcRγIII	Oberflächenprotein, Rezeptor	NK-Zellen
PD-1, CD279	Oberflächenprotein der Immunglobulin-Superfamilie	NK-Zellen

Tab. 3: Überblick über die Marker der NK-Zellen und NKT-Zellen (34)
(Anlehnung an: BD Biosciences, 2011, S. 1-2)

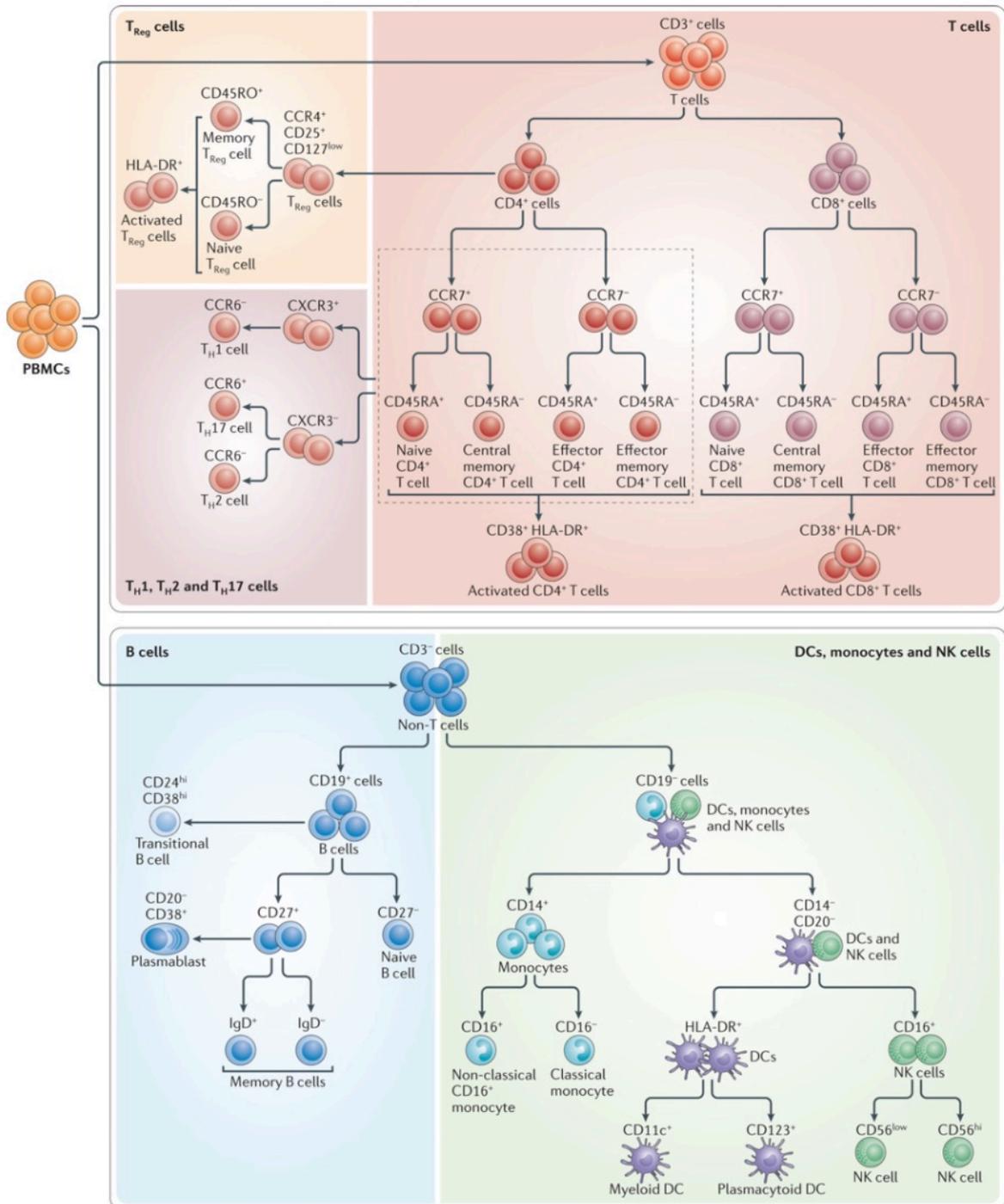


Abb. 5: Überblick über alle verwendeten Marker und Zellen in den Entwicklungsstufen
(Maecker, McCoy, Nussenblatt, 2012, S. 191-200, Abb. 2)

Abbildung 5 dient als weitere Übersicht über die erwähnten Zellen mit den unterschiedlichen Entwicklungsgraden und Oberflächenmarker.

Die Gesamtheit aus B-, T- und NK-Lymphozyten ist im Kampf gegen Tumorzellen maßgeblich involviert. Dennoch können sich Malignome in Menschen mit voll funktionsfähigem Immunsystem entwickeln. Der häufigste Grund für die Tumorentstehung ist allerdings ein kompromittiertes Immunsystem, wodurch entstandene Tumorzellen nicht mehr ausreichend abgewehrt werden können. Dies ist beispielsweise bei HIV-Erkrankten, bei Organtransplantierten, aber auch bei Menschen, die bereits mit Chemotherapie behandelt wurden, der Fall (53).

1.3 Chemotherapie und Immuntherapie im Fokus der Behandlung

Chemotherapie supprimiert das Immunsystem und führt dabei vor allem zu einer Leukozytopenie. Deshalb besteht ein hohes Risiko für eine mikrobielle Infektion. Außerdem verhindert sie physiologische antineoplastische Reaktionen gegen die Überlebensmechanismen der Tumorzellen (53).

Eine zytostatische Therapie stellt bei Patienten mit soliden Tumoren neben der Radiatio und der Operation eine der zentralen Säulen dar. Nach mehreren Jahrzehnten präklinischer Forschung hat sich die Immuntherapie bei vielen fortgeschrittenen malignen Neoplasien in der Praxis etabliert. Zu diesen gezielten Therapien gehören antineoplastisch aktive Antikörper, z.B. Checkpoint-Inhibitoren oder BiTEs, spezifische Inhibitoren von intrazellulären metabolischen Wegen, und die Modulation des zellulären Immunsystems, z.B. CAR-T-Zellen. Inwiefern Nebenwirkungen einer zytostatischen Behandlung Einfluss auf die Wirksamkeit einer Immuntherapie haben, ist derzeit noch nicht gut verstanden (54). Besonders die Auswirkung auf Checkpoint-Inhibitoren ist unbekannt. Bei diesen handelt es sich um Antikörper, die zytotoxische T-Zellen aktivieren, indem sie T-Zell-inhibitorische Rezeptoren wie CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, und PD-1, programmed cell death protein 1, auch CD279 genannt, blockieren. Ipilimumab z.B. greift an CTLA-4 an, Nivolumab beispielsweise an PD-1, Pembrolizumab blockiert den PD1-Rezeptor und Atezolizumab den Liganden von PD-1 (PD1-L) (53) (55). Sie können mit wenig Aufwand verwendet werden und sind im Vergleich zu anderen Immuntherapien eher nebenwirkungsarm. Bisher wurde beobachtet, dass bei einem Teil der Patienten, bei denen eine systemische Chemotherapie versagt hat, eine Behandlung mittels Checkpoint-Inhibitoren zu einer Krankheitsstabilisierung oder länger anhaltenden Remission geführt hat (53). Derzeit werden diese Aktivatoren der T-Lymphozyten als Zweit- oder Mehrlinientherapie nach oder in Kombination mit Zytostatika in der Palliativmedizin eingesetzt. Bislang allerdings kann der Erfolg der Immuntherapiestrategien noch nicht eindeutig vorhergesagt werden. Es gibt bereits

tumorspezifische Biomarker, wie die Höhe der genetischen Mutationslast oder die Expressionsrate des PD-1 Liganden auf der Tumorzelloberfläche, die aber derzeit keine relevante Korrelation zur Prognose der behandelten Patienten ermöglichen.

Damit eine Immuntherapie, vor allem mittels Checkpoint-Inhibitoren, wirken kann, wird grundsätzlich eine ausreichende Anzahl an funktionierenden T-Zellen benötigt (53).

Da die meisten Tumorpatienten mindestens eine Linie einer systemischen Chemotherapie erhalten, ist es wichtig zu wissen, welchen Effekt eine solche auf die Anzahl der Lymphozyten und ihrer Subpopulationen hat. Inwiefern Chemotherapeutika die einzelnen lymphozytären Fraktionen langfristig reduzieren, steigern bzw. aktivieren ist bisher bei Erwachsenen kaum untersucht (56) (57). In-vivo Longitudinal-Untersuchungen mit diesem Projektziel wurden bis dato ausschließlich in Einzelfallberichten und kleinen Fallserien publiziert (58) (59) (60).

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Chemotherapeutika auf T-, B- und NK-Zellen beurteilt. Dafür erfolgten Messungen der Anzahl von verschiedenen Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie vor und nach einer Erstlinienchemotherapie.

2 Zielsetzung und Fragestellungen

Das Ziel der vorliegenden prospektiven nicht-interventionellen Studie war es, den Einfluss einer systemischen Chemotherapie auf die Immunzellen bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Neoplasien zu untersuchen, mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren und Hinweise auf die Möglichkeit einer simultanen oder anschließenden Anwendung einer Immuntherapie zu gewinnen.

Dazu wurden folgende Fragen bearbeitet:

1. Inwiefern reduzieren, erhöhen bzw. aktivieren Chemotherapeutika B-, T- und NK-Lymphozyten und deren Subpopulationen?
2. Welchen Einfluss haben neben der zytostatischen Behandlung patienteneigene und therapiebedingte Faktoren auf B-, T- und NK-Zellen und deren lymphozytären Fraktionen? Hierbei wurden zum einen die Bedeutung von Geschlecht, Infektionen und klinisches Ansprechen der Patienten auf Chemotherapie und zum anderen die Auswirkungen der Anwendung von granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), Strahlentherapie als auch des Chemotherapeutikums Platin untersucht.

Basierend auf diesen Ergebnissen könnte die Studie langfristig einen Beitrag dazu leisten, den Nutzen der zellulären Immuntherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen Malignomen und damit ihre Bedeutung als weitere Behandlungsoption hervorzuheben.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Von Mai 2016 bis August 2017 wurden die Patienten der Studie aus der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Augsburg rekrutiert. Zu Beginn sind Informationen zum Geschlecht, Alter und zur Diagnose der Tumorerkrankung ermittelt worden. Im Verlauf wurden außerdem Daten bezüglich des Chemotherapieprotokolls, einer zusätzlichen Strahlentherapie, von Infektepisoden, der klinischen Ansprechrate und der Anwendung von G-CSF erhoben.

Jeder Patient und jede Patientin haben am Anfang der Untersuchung sein bzw. ihr Einverständnis schriftlich erklärt, dass Blutproben und Daten für die Forschung und Veröffentlichung verwendet werden dürfen (Patienteninformation und Einverständniserklärung im Anhang). Die Studie wurde von dem lokalen medizinischen Ethikkomitee der Universitätsklinik Augsburg (Referenznummer BKF 2016/09) genehmigt (Ethikvotum im Anhang). Die ethischen Grundsätze der Deklaration von Helsinki und die internationalen Leitlinien in Bezug auf klinische Studien mit Patienten wurden zu jedem Zeitpunkt eingehalten.

3.2 Gewinnung der Blutproben

Vor Beginn der Chemotherapie und 12 Wochen danach wurde jedem Patienten 2,7 Milliliter venöses Blut anhand einer Safety-Multifly-Kanüle der Firma Sarstedt, umgangssprachlich auch Butterfly-Kanüle genannt, mit einem Durchmesser von 21 G (Gauge) in einem kleinen EDTA-Blutentnahmeröhrchen der Firma Sarstedt (S-Monovette mit 2,7 ml Nennvolumen) peripher abgenommen (siehe Abbildung 6). EDTA-Salz als Antikoagulans diente dazu, Absolutzählungen bei der Analyse durchführen zu können (61).



Abb. 6: EDTA-Monovette und Safety-Multifly-Kanüle
(Quelle: eigene Grafik)

Die Patientenrekrutierung und Probenmessungen wurden von Herrn PD Dr. Andreas Rank und Frau Dr. Johanna Waidhauser betreut.

3.3 Antikörper und Fluorochrome

Neben den Blutproben wurden für die Messungen mittels Durchflusszytometrie die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper benötigt.

Jede Zellart und deren Subpopulationen besitzen spezifische Moleküle (Antigene) auf ihrer Oberfläche, die sie charakterisieren. Dabei handelt es sich meist um Glykoproteine, die als CD-Moleküle bezeichnet werden (62). Um die Anzahl einer spezifischen Zelle mit einem bestimmten Oberflächenmarker untersuchen zu können, müssen folgende Schritte erfolgen:

1. Das CD-Molekül muss von einem Antikörper spezifisch gebunden werden (62).
2. Dieser Antikörper wird mittels direkter, primärer Immunfluoreszenz an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (61).
3. Das Fluorochrom sendet bei Kontakt mit einer Lichtquelle, z.B. Laser, eine bestimmte Wellenlänge aus, die detektiert wird.
4. Über das wahrgenommene Fluoreszenzlichtsignal kann auf den Fluoreszenzfarbstoff, den Antikörper und damit auf das CD-Molekül sowie die spezifische Zelle geschlossen werden (61).

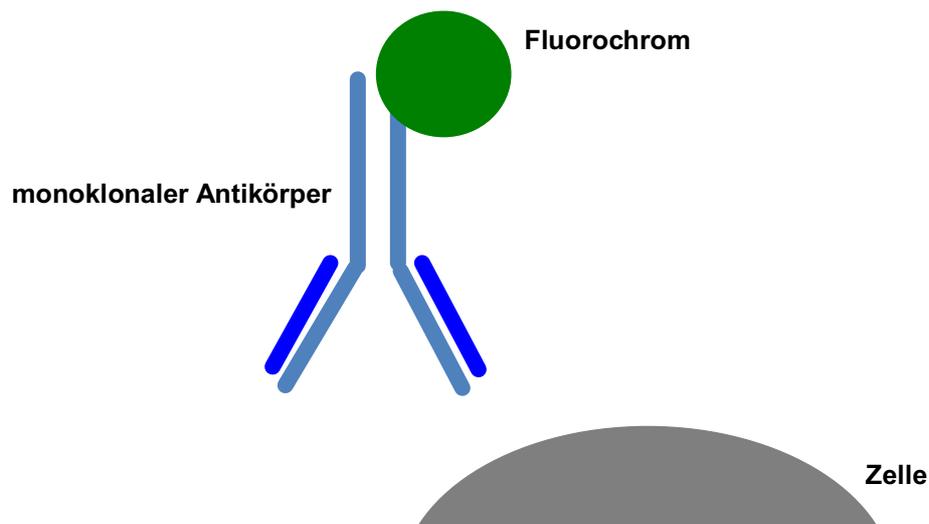


Abb. 7: Direkte (primäre) Immunfluoreszenz
(Anlehnung an: Universität Wien, 2019)

Im Gegensatz zur indirekten Immunfluoreszenz wird bei der direkten der Antikörper über einen unmittelbaren Kontakt, ohne einen weiteren Antikörper, mit dem Fluorochrom gekoppelt. Anschließend bindet er spezifisch an das Antigen der Zelle (siehe Abbildung 7) (61).

Für die Durchflusszytometrie werden monoklonale Antikörper verwendet. Dabei handelt es sich um Hybridome, mit Tumorzellen fusionierte, Antikörper bildende, B-Zellen. Diese Hybridomzellen können sich kontinuierlich teilen und einen bestimmten Antikörper produzieren (61) (63).

Zellpopulation	Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Beckman Coulter/ Biolegend Bestellnummer
B	IgD	FITC	IA6-2	IgG2a	B30652
B	CD24	PE	ALB9	IgG1	IM1428U
B, erschöpfte CD8-T	CD27	ECD	1A4CD27	IgG1	B26603
B	CD38	PC5	LS198-4-3	IgG1	A07780
B	CD19	PC7	J3-119	IgG1 kappa	IM3628
Gedächtnis-T	CD62L	FITC	DREG56	IgG1	IM1231U
Gedächtnis-T	CD45RO	PE	UCHL1	IgG2a	A07787
Gedächtnis-T, Tregs	CD45RA	ECD	2H4LDH11LDB9	IgG1	IM2711U
Gedächtnis-T, aktivierte T, Tregs, Th	CD4	PC5	13B8.2	IgG1	A07752
Gedächtnis-T, Tregs, erschöpfte T, aktivierte T	CD8	PC7	SFCI21Thy2D3	IgG1	737661
erschöpfte CD8-T	CD57	FITC	NC1	IgM	B49188
erschöpfte CD8-T	CD279	PE	PD1.3	IgG2b	B30634
erschöpfte CD8-T	CD28	PC5	CD28.2	IgG1	6607108
aktivierte T	HLA-DR	FITC	Immu-357	IgG1	IM1638U
aktivierte T	CD69	PE	TP1.55.3	IgG2b	IM1943U
Tregs	CD25	FITC	B1.49.9	IgG2a	IM0478U
Tregs	FoxP3	PE	Ab259D	IgG1 kappa	B46031
NK	CD56	PE	N901/NK-1	IgG1	A07788
NK	CD16	ECD	3G8	IgG1	A33098
NK	CD19	PC5	J3-119	IgG1	A07771

NK	CD3	PC7	UCHT1	IgG1	737657
Th	CD183 (CXCR3)	AF488	G025H7	IgG1	B68144
Th	CD194 (CCR4)	PE	L291H4	IgG1	359412
Th	CD195 (CCR5)	PE/Dazzle 594	J418F1	IgG2b	359126
Th	CD196 (CCR6)	PC7	B-R35	IgG2a	B68132

Tab. 4: Fluorochrom-Antikörper-Konjugate

(in Anlehnung an: Urbanowicz, 2010, S. 3 Tab. 2; Weit, 2016; Beckman Coulter, 2011, S. 2-49)

Tabelle 4 zeigt die verwendeten Fluorochrom-Antikörper-Konjugate. Außer den Verbindungen CD194-PE und CD195-PE/Dazzle 594, die von der Firma Biolegend (San Diego, Kalifornien, USA) stammen, sind die anderen von Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA) hergestellt. Alle wurden kommerziell erworben.

Jede der Fluoreszenz-Antikörper-Kombinationen kann bei einer Wellenlänge von 488 nm und damit von einem Argon-Laser angeregt werden (61).

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) ist ein gelbgrüner Farbstoff und wird am meisten eingesetzt, da ca. 50% der aufgenommenen Photonen als Fluoreszenzlicht abgegeben werden (64). Als Alternative zu FITC bei den T-Helferzellen und deren Subpopulationen dient Alexa-Fluor 488 (AF488) (64). Dieser Farbstoff zeichnet sich durch eine besondere Lichtstabilität und ein ähnliches Emissionsverhalten wie FITC aus (64). Phycoerythrin (PE) sorgt für den Transport von Lichtenergie zum Chlorophyll im Rahmen der Photosynthese und fungiert in der Durchflusszytometrie als eigenständiger Farbstoff oder in Kombination mit einem anderen Fluorochrom (64). Diese werden als Tandemkonjugate bezeichnet. Beispiele hierfür sind PC5 (PE-Cy5, Cy-Chrome, TriChrome, TriColor, Phycoerythrin-Cyanin-5), PC7 (PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanin-7) und ECD (PE-TexasRed, PE-TR, RED613) (64). Ein Äquivalent zu ECD stellt PE/Dazzle 594 für die Immunphänotypisierung bei T-Helferzellen und ihren Fraktionen dar (64).

Bei den Tandemkonjugaten erfolgt der Energietransfer auf die Weise, dass der erste Farbstoff angeregt wird und dessen freigesetzte Lichtenergie anschließend das zweite Fluorochrom zur Ausstrahlung bringt. Dies ist nur möglich, da die Wellenlänge des einen Farbstoffes für die Emission derjenigen des anderen für die Absorption entspricht (61) (65).

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Absorptions- und Emissionswellenlängen der eingesetzten Fluorochrome.

Fluorochrom	Absorption (nm)	Emission (nm)
FITC	488	519
AF488	495	519
PE	488	578
PC5	488	680
PC7	488	767
ECD	488	615
PE/Dazzle 594	566	610

Tab. 5: Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome (64)
(Anlehnung an: Sack, Tárnok, Rothe, 2007, S. 91, Tab. 6)

Die Sensitivität der Fluorochrome reicht von weniger als 300 MESF bei PE bis weniger als 600 MESF bei FITC. MESF ist die Abkürzung für molecules of equivalent soluble fluorochrome und gibt an, wie viele Fluoreszenzmoleküle benötigt werden, um das Messsignal einer Zelle auszulösen (66) (67).

3.4 Das verwendete Durchflusszytometer

Bei dem in dieser Studie verwendeten Durchflusszytometer handelt es sich um den Cytomics FC 500 der US-amerikanischen Firma Beckman Coulter mit Sitz in Krefeld, Deutschland. Sein Aufbau wird im Folgenden zusammen mit dem Prinzip der Durchflusszytometrie in Kapitel 3.6 erläutert.



Abb. 8: FACS-Durchflusszytometer FC 500 Cytoomics von Beckman Coulter am Institut für Labormedizin an der Universitätsklinik Augsburg
(Quelle: eigene Grafik)



Abb. 9: Spannungsspezifische Stromzufuhr
(Quelle: eigene Grafik)



Abb. 10: Multi-Karussell, Flusszelle und Laser
(Quelle: eigene Grafik)

3.5 Vorbereitung der Blutproben

Tabelle 6 zeigt das Immunstatuspanel, das von einer Mitarbeiterin der Firma Beckman Coulter Diagnostics (Krefeld, Deutschland) erstellt wurde. Es beschreibt die qualitative und quantitative Zusammensetzung der sieben Röhren (Tubes), die jeweils der durchflusszytometrischen Analyse einer Zellsubpopulation dienen.

Zell-population	Röhrchen					
		20 µl	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl
		FITC	PE	ECD	PC5	PC7
B-Zellen	1.	IgD	CD24	CD27	CD38	CD19
		B30652	IM1428U	B26603	A07780	IM3628
(no-wash)						
Gedächtnis-T-Zellen	2.	CD62L	CD45RO	CD45RA	CD4	CD8
		IM1231U	A07787	B49193	A07752	737661
(no-wash)						
erschöpfte CD8-T-Zellen	3.	CD57	CD279	CD27	CD28	CD8
		B49188	B30634	B26603	6607108	737661
(no-wash)						
aktivierte T-Zellen	4.	HLA-DR	CD69		CD4	CD8
		IM1638U	IM1943U		A07752	737661
(no-wash)						
T-/NK-Zellen	5.		CD56	CD16	CD19	CD3
			A07788	A33098	A07771	737657
(plus 100 µl Stem-Count)						
		10 µl	5 µl	5 µl	10 µl	10 µl
		AF488	PE	PE/ Dazzle 594	PC5	PC7
Th-Zellen	6.	CD183 (CXCR3)	CD194 (CCR4)	CD195 (CCR5)	CD4	CD196 (CCR6)
		B68144	359412	359126	A07752	B68132
Tregs	7.	CD25	FoxP3	CD45RA	CD4	CD8
		IM0478U	B46031	IM2711U	A07752	737661
(PerFix-nc kit)						

Tab. 6: 5-Farb-Panel
(Anlehnung an: Weit, 2016)

Die Gewinnung der Blutproben fand im Rahmen der Abnahme für das tägliche Routinelabor statt. Anschließend wurden sie durch Schwenken homogenisiert und bei einer Raumtemperatur von 18 bis 25 Grad vorübergehend gelagert. Da eine Kühlung aufgrund der Gefahr einer Aktivierung der Zellen durch Temperaturveränderungen nicht vorgenommen wurde und die Proben nicht eingefroren oder chemisch stabilisiert wurden, mussten sie innerhalb von 24 Stunden verarbeitet werden (67).

Bevor eine Analyse stattgefunden hat, wurden zunächst die Fluorochrom-Antikörper-Reagenzien in sieben Röhrchen pipettiert. Auf ein Vorwaschen mit PBS-Puffer (phosphate buffered saline bzw. Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4) des Blutes wurde verzichtet. Dies wäre nötig gewesen, wenn die Anzahl der Leukozyten pro Mikroliter (μl) über 20×10^3 gewesen wäre und die Probe damit verdünnt hätte werden müssen.

Röhrchen 1 diente der Untersuchung von B-Zellen, 2 den Gedächtnis-T-Zellen, 3 den erschöpften CD8-T-Zellen, 4 den aktivierten T-Zellen, 5 den Natürlichen Killer-Zellen und Natürlichen Killerzellen ähnlichen T-Zellen (NKT-Zellen), 6 den T-Helferzellen und 7 den regulatorischen T-Zellen.

In dem ersten bis fünften wurden jeweils 10 bzw. 20 μl der entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörper hinzugefügt. Im sechsten kamen, mit Ausnahme von vier Konjugaten mit jeweils zwei anderen Fluoreszenzfarbstoffen AF488 und PE/Dazzle 595, die gleichen Reagenzien, aber nur jeweils 5 bzw. 10 μl hinzu. Das Pipettiermuster für Röhrchen 7 wird später erklärt.

Zu diesen Antikörpern erfolgte eine Zugabe von jeweils 100 μl peripheres Blut (PB) aus dem EDTA-Röhrchen für die Tubes 1 bis 5 und von jeweils 50 μl für 6 und 7.

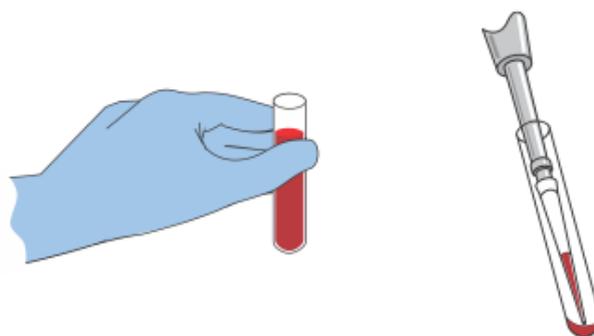


Abb. 11:

Pipettiervorgang der Blutmenge und der Fluorochrom-Antikörper-Konjugate in ein Röhrchen
(Beckman Coulter Inc., 2004, S. 4-2)

Danach wurden die Antikörper mit dem Blut in den Röhren 1 bis 6 mit Hilfe des Vortexgerätes Heidolph REAX 2000 (Schwabach, Deutschland) leicht durchgemischt und für 15 Minuten inkubiert.

Als Nächstes kamen die Röhren mit je 1 ml VersaLyse™ (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien) für weitere 15 Minuten in den Inkubator.

Nach 15 Minuten Pause wurden die Röhren 1, 2, 3, 4 und 6 jeweils mit PBS-Puffer ohne FCS (fetal calf serum, fötales Kälberserum) aufgefüllt und 5 Minuten bei einer Drehbeschleunigung von 360 g bzw. 1500 rpm (revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute) gewaschen. Daraufhin wurde der Überstand abgekippt und erneut PBS ohne FCS ergänzt.

Für Röhren 5 ist kein Waschen mit PBS vorgesehen, so dass es nach Zugabe der Lyse sofort verschlossen wurde und 100 µl Stem-Count™ Beads aus dem Stem-Kit mit einem Kalibrationsfaktor von 1000 dazu kamen.

Eine Ausnahme stellt Röhren 7 dar. Hierfür gibt es eine spezielle Pipettiervorlage mit dem Perfix no centrifuge assay kit (PerFix-nc kit). Dabei wurde zu den 50 µl peripheres Blut zunächst 5 µl des Puffers 1 als Fixativ-Reagenz gegeben. Tube 7 gelangte in den Vortex und für 15 Minuten in den Inkubator. Danach wurden jeweils 5 bzw. 10 µl der im Studienpanel angegebenen Antikörper-Fluorochrom-Konjugate in einem separaten 4 ml Röhren zusammengegeben. Anschließend wurde das fixierte periphere Blut in das Vortexgerät gegeben, mit 300 µl des Puffers 2, einem Permeabilisierungs-Reagenz, versetzt, erneut in den Vortex gestellt und zu den Antikörpern hinzugefügt. Es folgten ein weiterer Vortex-Vorgang und eine Inkubation für 60 bis 120 Minuten. Daraufhin wurden 3 ml PBS-Puffer ohne FCS beigelegt. Nach einer anschließenden Zentrifugation mit einer Drehbeschleunigung von 500 g und damit 1770 rpm für 5 Minuten fand eine Absaugung des Überstandes statt, wobei maximal ein Tropfen erhalten blieb. Aus Puffer 3 der Final 10x Solution wurde anschließend eine 4 ml verdünnte Lösung aus einer Mischung von 0,4 ml Puffer-Konzentration und 3,6 ml Aqua dest. (destilliertes Wasser) hergestellt. 3 ml von diesem Puffer kamen zum Röhren dazu. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 Minuten bei 500 g wurde der Überstand wieder aspiriert und der Zellrückstand mit 500 µl des verdünnten Puffers 3 erneut gelöst.

Diese Schritte liefen für jedes Röhren bei jedem Patienten nach dem gleichen Schema nacheinander ab. Alle 7 Röhren wurden in einen Behälter des Durchflusszytometers, dem Multikarussell (Multi-Carousel, MCL) genannt, eingesetzt. Der Cytomics FC500 hat Platz für 32 Röhren sowie eine Einzelzustellungsposition mit Vortex (67).

Die Inkubationen erfolgten lichtgeschützt und bei einer Raumtemperatur zwischen 18 und 25 Grad.

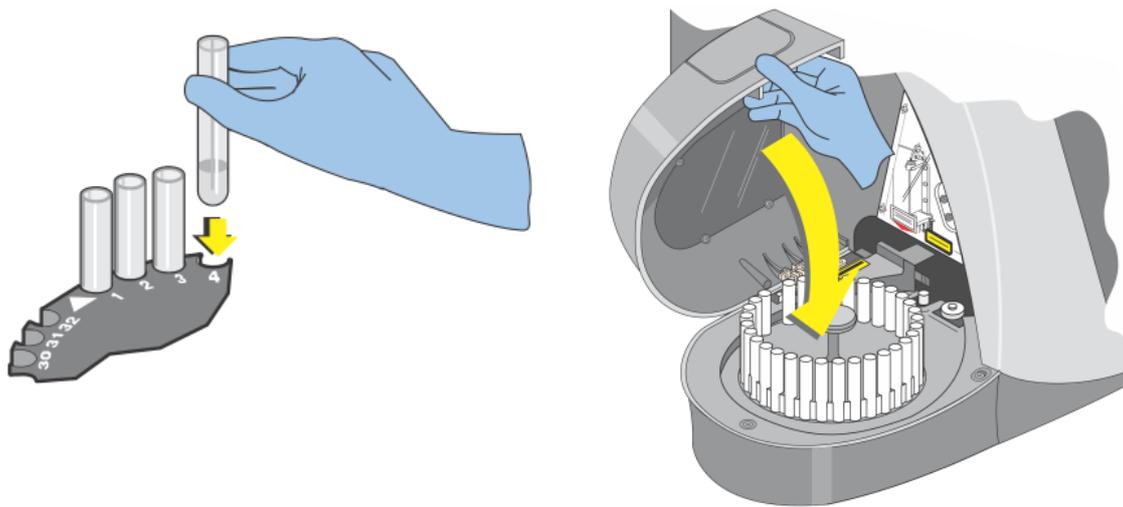


Abb. 12:

Einsatz des Röhrchens in das Karussell (MCL) (links), das rechts vollständig zu sehen ist
(Beckman Coulter Inc., 2004, S. 4-2, 4-3)

VersaLyse™ (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien) kann bei allen Durchflusszytometern und mit oder ohne Vorwaschen verwendet werden (67) (68). Dabei besteht das Reagenz aus einem zyklischen Amin, das bei Kontakt mit der Carboanhydrase in den Erythrozyten zur Lyse dieser führt (68). Hierbei wird die niedrige osmotische Resistenz der Erythrozyten ausgenutzt (67). Da es die Zellzahl und Leukozytenverteilung nicht zu stören scheint, ist es bisher für die Vorbereitung von Blutproben zur Messung mittels Durchflusszytometrie optimal (68) (69). Allerdings wird kontrovers diskutiert, ob VersaLyse™ auch Granulozyten und Monozyten, vor allem des Liquors, auf ähnliche Art und Weise wie Erythrozyten lysiert (70).

Beim Stem-Kit (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien) handelt es sich um eine effiziente und sensitive Methode, um die relative und absolute Anzahl von hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen indirekt zu identifizieren (71) (72). Es beinhaltet zwei murine monoklonale Antikörper, CD45-FITC- (mAb J33) und CD34-PE-Antikörper (mAb 518), einen isoklonalen Kontroll-Antikörper CD45-FITC/CD34, den Viabilitätsfarbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD), ein Lysereagenz (10x NH₄Cl-Lösung) und Stem-Count™ Fluorospheres (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) (73) (74). Bei diesen handelt es sich um KG1aZellen mit der gleichen Dichte an 581/CD34 und J33/CD45 Epitopen wie bei normalen CD34+ hämatopoetischen Zellen (67) (71) (72) (73).

Dies kann mittels folgender Formel berechnet werden (71):

$$\text{Anzahl der Zellen}/\mu\text{l} = \frac{(\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Konzentration der Beads})}{(\text{Anzahl der gezählten Beads})}$$

Dafür wird eine bestimmte Menge an Stem-Count™ Beads zu einem definierten Volumen Blutzellen dazugegeben (74). Die Mischung wird in das Vortexgerät gegeben und bis zur Analyse im Dunkeln aufbewahrt. Ein anderes Röhrchen fungiert durch die Addition von CD45-FITC/CD34 als isoklonalem Antikörper zur Kontrolle (74). Es findet kein Waschvorgang der Zellen vor ihrer Zugabe statt, aber die Erythrozyten des peripheren Blutes werden durch Ammoniumchloridlösung lysiert (74). Deshalb trägt diese Technik die Bezeichnung Lyse-no-wash-Methode (67). Da sich 7-AAD bei beschädigter Zellmembran zwischen die Basenpaare der DNS Guanin und Cytosin einfügen kann, kann in diesem Prozess auch zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen unterschieden werden (67) (74).

Die Berechnung des Volumens und damit die direkte Absolutzählung in der Probe mittels Mikropartikel werden als Single-Platform-Methode bezeichnet (75). Im Gegensatz zum Dual-Platform-Verfahren wird hierbei kein hämatologischer Analysator benötigt, weil durch die Verwendung der Lyse-no-wash-Technik eine Zentrifugation und damit eine Volumenveränderung vermieden werden (67). Die Single-Platform-Methode kann auch bei einem volumenkalibrierten Durchflusszytometer angewandt werden (67) (72) (75).

PerFix-nc kit ist eine Kombination aus drei verschiedenen Puffern, die als ein Fixativ- und ein Permeabilisierungsreagenz sowie eine zehnfach verdünnte Lösung fungieren (76). Es dient dazu, Erythrozyten zu lysieren und die Zelloberfläche von Leukozyten zu zerstören, um Zugang zu deren zytoplasmatischer Membran zu bekommen (76). Dadurch wird es ermöglicht, dass die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörper zum Zellkern vordringen und sowohl intra- als auch extrazelluläre Antigene mittels Färbung dargestellt werden können (76).

3.6 Durchflusszytometrie

3.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, von verschiedenen einzelnen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom physikalische oder chemische Eigenschaften zu messen (77).

Da FACS mittlerweile die hauptsächliche Anwendung darstellt, wird es heutzutage meist als Synonym verwendet. FACS ist die Abkürzung für fluorescence-activated cell sorting und stellt einen Markennamen von Becton, Dickinson and Company (BD) dar (77). Bei FACS handelt es sich um eine Methode, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben, wie z.B. Antikörpern oder Rezeptoren von Zellen, deren Lichtstreuungs- und Fluoreszenzcharakteristika zu analysieren und damit Wissen über ihre Merkmale zu gewinnen (77).

Daneben können auch weitere Informationen, beispielsweise über ihren Aktivitäts- oder Phosphorylierungszustand, ihre Zellzyklusphase, intrazelluläre Zytokinproduktion oder Herkunft gesammelt werden (78).

Die Durchflusszytometrie zeichnet sich durch eine sehr große Messgeschwindigkeit, Sensitivität und Reproduzierbarkeit aus (78) (79) (80).

Für ihre Analysen können unterschiedliche Zellarten verwendet werden, z.B. des Blutes, Knochenmarks, Liquors oder anderer Körperflüssigkeiten. Voraussetzung ist jedoch, dass die Zellen in einer Suspension vorliegen (67).

Ein Durchflusszytometer stellt ein geschlossenes System dar, das aus drei funktionellen Komponenten besteht:

1. aus einem Flüssigkeitssystem für den Transport der Zellen,
2. für die optische Umsetzung aus einem Laser oder mehreren Lasern und unterschiedlichen Detektoren wie einer Photodiode, Photoverstärkern und Filtern,
3. und einem Computer, der die elektrischen Signale konvertiert und die Daten speichert (81) (82).

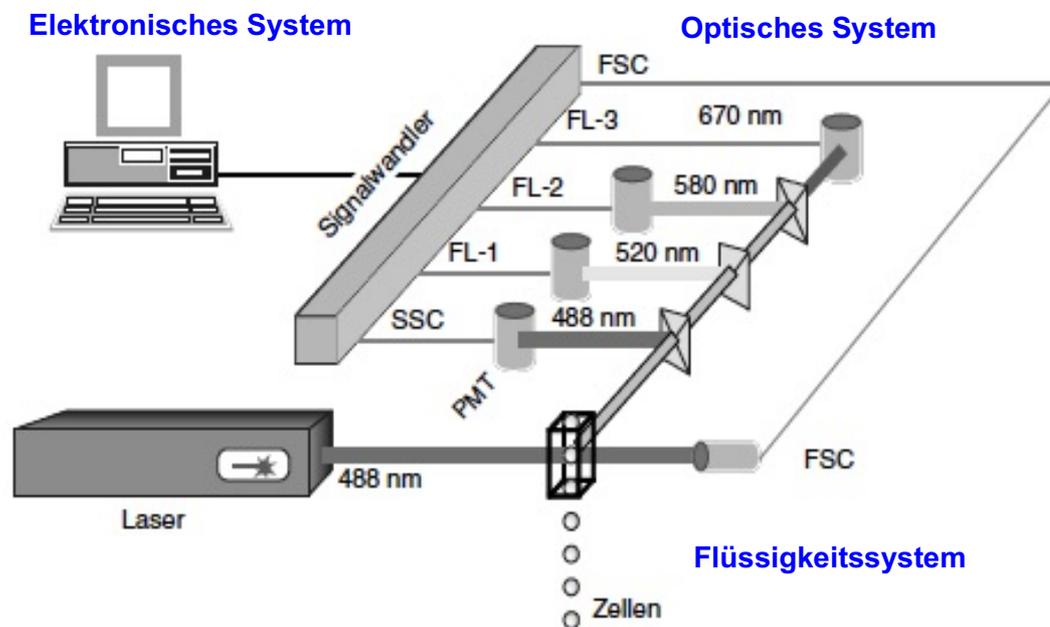


Abb. 13: Überblick über den Aufbau eines Durchflusszytometers (82)
(bearbeitet; Sack, Tárnok, Rothe, 2007, S. 30 Abb. 2)

3.6.2 Das Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem besteht aus einer Flusszelle (Flow-Cell, Flow-Chamber, Messzelle), dem sample (Probenstrom), der die Zellen in Suspension darstellt, und dem sheath fluid (Mantelstrom) (82). Die Zellen können zwischen 0,2 und 20 μm groß sein und die Hüllflüssigkeit setzt sich meist aus Puffer- und Kochsalzlösungen, zum Teil mit Mikrobioziden, zusammen (82) (84). Die Zellen als Probenflüssigkeit werden dem Mantelstrom zugeführt und fließen am Ende der Flow-Cell durch eine Küvette (82).

Dabei ist es wichtig, dass der Probenstrom unter laminaren Strömungsbedingungen (Reynoldszahl (Re) < 2300) und einer Beschleunigung von wenigen cm/Sekunde auf ca. 6 cm/Sekunde fließt und sich dabei im Zentrum befindet, ohne sich mit der Sheath-Flüssigkeit zu vermischen (82) (83). Bei diesem Vorgang handelt es sich um die sogenannte hydrodynamische Fokussierung, weshalb die Zellen einzeln nacheinander die Flusszelle verlassen (83). Begünstigt wird dies auch dadurch, dass sich die Öffnung der Flow-Through-Cuvette verengt (82) (83).

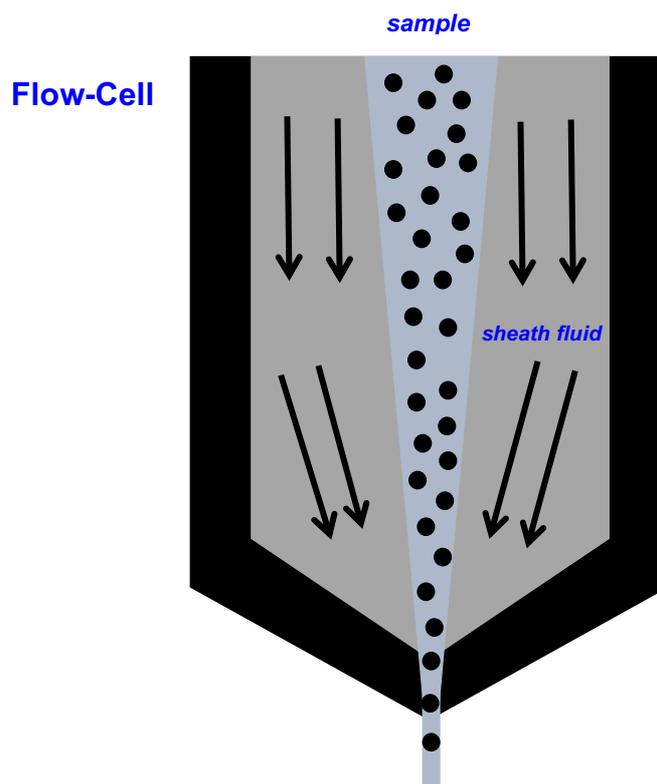


Abb. 14:

Im Flüssigkeitssystem fließen die Zellen in der Messzelle und passieren im Rahmen der hydrodynamischen Fokussierung einzeln die Küvettenöffnung und treffen auf den Laserstrahl (82) (84).

(Anlehnung an: Sack, Tárnok, Rothe, 2007, S. 30 Abb. 1; Willheim, S. 19)

Der Fließvorgang wird durch ein Druckdifferenz- oder ein Volumen-Injektions-System ermöglicht (82). Cytomics FC500 besitzt die Technik der Druckdifferenz, bei dem die Probenflüssigkeit aus einer Spritze mit einem stets identischen Druck durch Luft oder ein anderes Gas entleert wird (82). Der Druck kann dabei reguliert werden und definiert die Durchflussrate der Probenflüssigkeit, d.h. das Volumen an Zellen pro Minute (82). Diese kann dadurch auf eine kleine Stufe (low) bei 12 $\mu\text{l}/\text{min}$, eine mittlere (medium) bei 35 $\mu\text{l}/\text{min}$ und eine große (high) bei 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt werden (82). Bei dem in dieser Studie eingesetzten Durchflusszytometer wurden die Zellen mit 3300 Ereignissen pro Sekunde und daher mit der höchsten Geschwindigkeit zugeführt (82).

Die Durchflussrate der Sheath-Fluid ist in der Regel niedriger als die des Probenstroms (84). Da sie meist bei etwa 5 ml/min konstant bleibt und die Geschwindigkeit der einzelnen Zelle bestimmt, fließt diese immer mit der gleichen Schnelligkeit (82).

Bei geringem Druck des Probenstroms strömen wenige Partikel durch. Deshalb trifft der Laser jede Zelle am gleichen Punkt und die Ergebnisse erweisen sich als genauer (82).

3.6.3 Das optische System

Das optische System ist ein komplexes Konstrukt aus Laser, verschiedenen Detektoren sowie Interferenzspiegeln, auch Filter genannt (82).

Wenn eine einzelne Zelle die Flusskammer verlässt, wird sie an einer bestimmten Messstelle, der Sensing Area, von dem Laserstrahl getroffen. Laser, die Abkürzung für Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, regt Elektronen an und hebt sie auf ein höheres Energieniveau. Nach Emission der Lichtenergie in Form von Photonen fallen die Elektronen auf ihr Ausgangsniveau zurück (67) (82).

Cytomics FC500 besitzt als Lichtquelle einen Argonlaser (JDS Uniphase Argon mit einer Leistung von 20 mW) mit einer Wellenlänge von 488 nm, der fünf Farbsignale aufnehmen und durch einen roten Dioden-Laser (Red Solid-State Diode, mit einer Leistung von 25 mW) mit einer Wellenlänge von 635 nm oder einem Helium-Neon-Laser kollinear addiert werden kann (85) (86).

Wenn der Strahl des Lasers auf die Zelle stößt, wird dieser in verschiedene Richtungen verteilt und es entstehen im Rahmen der oben erklärten Funktionsweise einerseits Streu- und andererseits Fluoreszenzlicht (82) (84).

Die Lichtmenge, die gegenüber der Laserquelle in einem Winkel von 0,5 bis 10 Grad gestreut wird, heißt Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht, FSC) und ein FS-Detektor nimmt es auf (84). Seine Auflösung beim verwendeten Durchflusszytometer beträgt 0,5 μm (82) (84). Da sich das

Vorwärtsstreulicht durch Beugung an der Oberfläche der Zelle bildet, können dadurch die Größe und die äußere Form der Zelle bestimmt werden (82) (84).

Bei dem Anteil des Laserlichts, der in einem Winkel von 90 Grad auf einen Sensor trifft, handelt es sich um den Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht, SSC) und das Fluoreszenzlicht (84). Da der SSC, wie der Laser selbst, eine Wellenlänge von 488 nm besitzt, kann er mittels eines 488 nm Filter zum SS-Detektor abgelenkt werden (82) (84). Der Rest des Lichtes tritt durch den Filter durch und stellt das Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen dar (82) (84). Die Auflösung des SSC beim Cytomics FC500 beträgt weniger als 0,5 μm (82) (84). Das Seitwärtsstreulicht definiert die Granularität, die Membranfaltung, die Größe des Zellkerns und die innere Form der Zelle, weil sich das Licht an Membranen und Vesikeln sowie dem Zellkern beugt (82) (84).

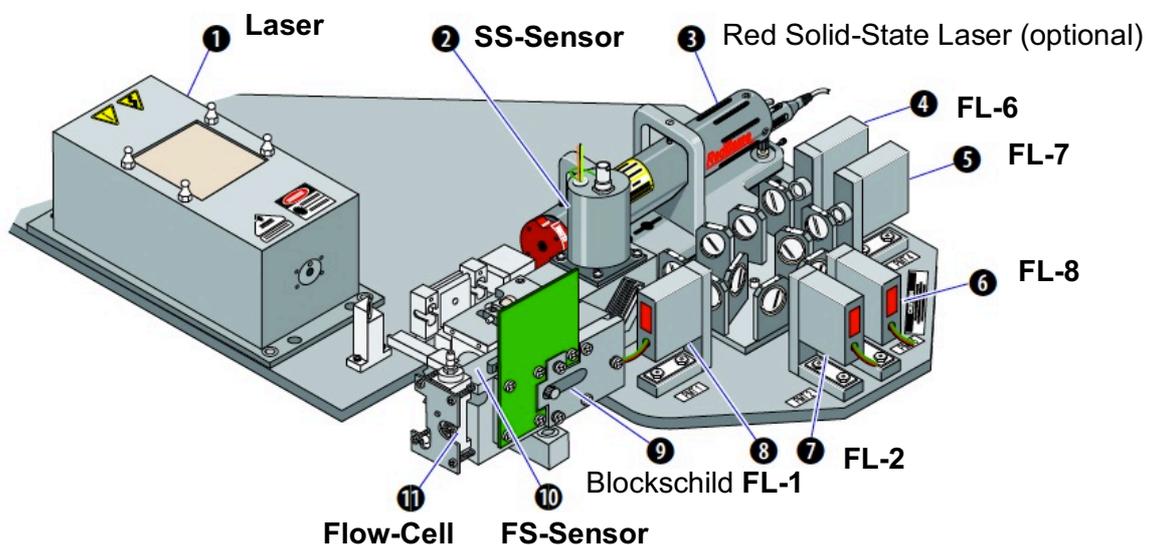


Abb. 15: Optisches System des Cytomics FC 500 (Beckman Coulter)
(Beckman Coulter Inc., 2004, S. 5-5)

Bei dem 488 nm Filter vor dem SS-Sensor handelt es sich um einen dichroitischen Langpass-Interferenzfilter (488 DLP) (84) (86). Das in der Studie verwendete Durchflusszytometer ist mit einem Konstrukt aus verschiedenen Interferenzspiegeln ausgestattet (siehe Abbildung 15) (84) (86). Dazu zählen Short- (SP), Longpass- (LP) und Bandbreitenfilter (BP) (87): Kurzpassspiegel transmittieren vor allem kurze, Langpassspiegel dagegen lange Wellenlängen (87). Der Rest wird reflektiert. Hier werden dichroitische, d.h. für zwei Wellenlängen bestimmte, Shortpassfilter für 615 oder 645 nm, und für eine Wellenlänge ein solcher für 620 nm verwendet (84) (86) (87). Longpassfilter gibt es für 500 nm und für zwei Wellenlängen jeweils für 488, 550, 600 und 710 nm (82) (84) (86). Durch diese Filter gelangt das Licht entsprechend der Wellenlänge zu dem jeweiligen Fluoreszenzdetektor (84). Das kurzwellige Licht wird deshalb dem SSC-Sensor zugeführt, die langwelligeren Lichtsignale den

FL-Kanälen (87). Vor den einzelnen Fluoreszenzkanälen FL1 bis FL3 sind zusätzlich Bandpassfilter eingebaut, die das Spektrum noch weiter eingrenzen: 525 BP für FITC 525, 575 BP für PE, 620 BP für ECD, 675 BP für PC5 und 755 BP für PC7 (86) (87) (88) (89) (90). Diese sind nach zunehmender Wellenlänge angeordnet. Abbildung 16 präsentiert die Ausstattung des Durchflusszytometers mit den verschiedenen Filtern.

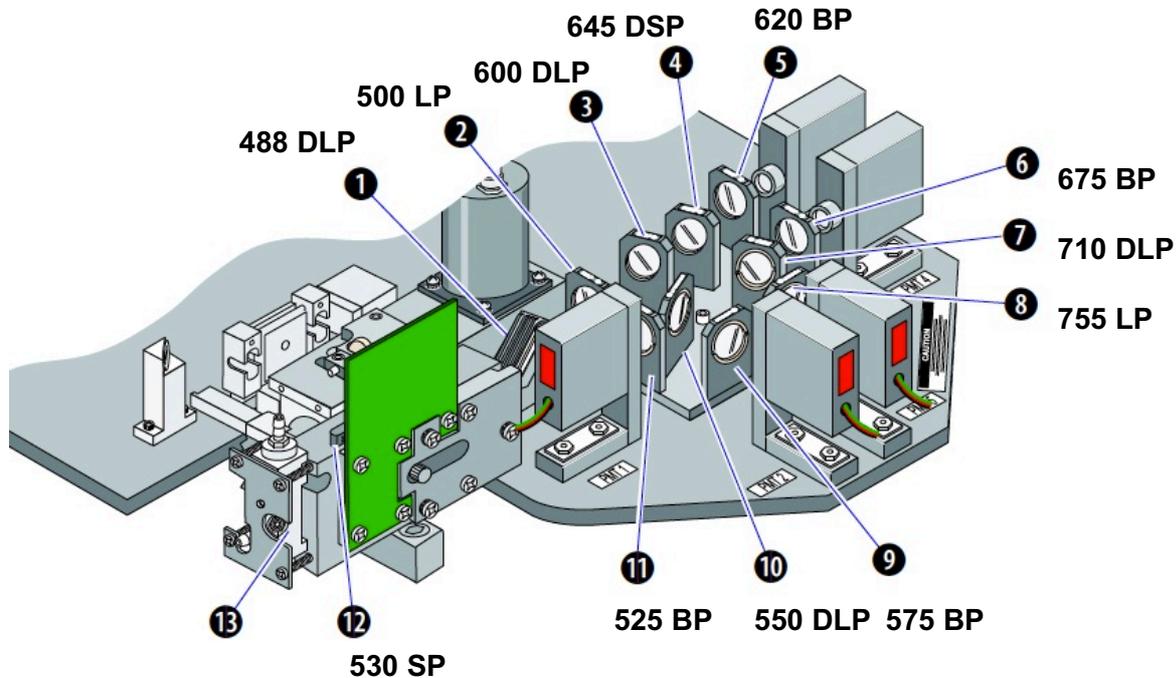


Abb. 16: Übersicht über die verwendeten Filter bei Cytomics FC 500 (Beckman Coulter)
(Beckman Coulter Inc., 2004, S. 5-6)

Da die abgegebene Energie der Fluorochrome sich in Wärme und Licht aufteilt, ist laut der Stokes'schen Regel das abgestrahlte Fluoreszenzlicht immer langwelliger, also energieärmer als das Anregungslicht (82) (83). Die Verschiebung der Abstrahlungs- zur Anregungswellenlänge beträgt etwa 20 bis 50 nm (82). Der Unterschied zwischen den Wellenlängen wird als Stokes-Differenz oder Stokes-Shift bezeichnet (82) (83) (90).

Die Helligkeit der Fluoreszenzsignale entspricht dabei in Abhängigkeit von der Färbung z.B. der Menge gebundener Antikörper oder den biochemischen Eigenschaften der Zelle (81). Der SS-Sensor sowie die Fluoreszenzkanäle zählen zu den Photomultiplier Tubes (Photoröhren, PMT) (82) (84). Sie sorgen für die Transduktion des ausgesendeten Lichts in ein Spannungssignal (82) (84). Die PMT können nicht zwischen den Wellenlängen des Lichts differenzieren, dafür dienen ausschließlich die sich davor befindenden Spiegel bzw. Filter. Eine Ausnahme stellt der FS-Sensor dar (82) (84). Da Vorwärtsstreulicht eine höhere Lichtintensität besitzt, benötigt es eine weniger sensitive Photodiode ohne externe Spannungsquelle. Die Spannung reguliert die Sensitivität der verschiedenen PMT (82) (84).

3.6.4 Das elektronische System

Passiert eine Zelle den Laserstrahl, wird das emittierte Licht am Detektor als Spannungssignal umgesetzt. Dabei kann es linear oder logarithmisch gespeichert werden (84). Bei der Lichtstreuung kommt meist eine lineare Verstärkung zum Einsatz (82). Sie weist allerdings keinen größeren Nutzen gegenüber einer logarithmischen Verarbeitung auf (84). Bei der linearen Aufnahme lassen sich Zellen mit einer bestimmten Größe oder Granularität häufig nicht eindeutig bestimmen (84). Da es sich um zwischen ein oder mehrere 1000 Fluoreszenzsignale handelt, erfolgt meist eine logarithmische Darstellung der Messungen (82). Die gesamte Menge des vorhandenen fluoreszierenden Materials eines Partikels kann mit der pulse height, dem höchsten Lichtsignal, dargestellt werden (82). Dieses Signal ist jedoch nur bei Zellen, die während der Passage vollständig durch den Laser ausgeleuchtet werden, zur Fluoreszenz der Zelle proportional (82). Bei großen Zellen wird daher das Integral der Lichtsignale, die Pulsfläche (pulse area), benötigt (82) (84). Als „peak“ wird der höchste Punkt der Kurve und damit der gemessene Wert bezeichnet (78) (82) (87).

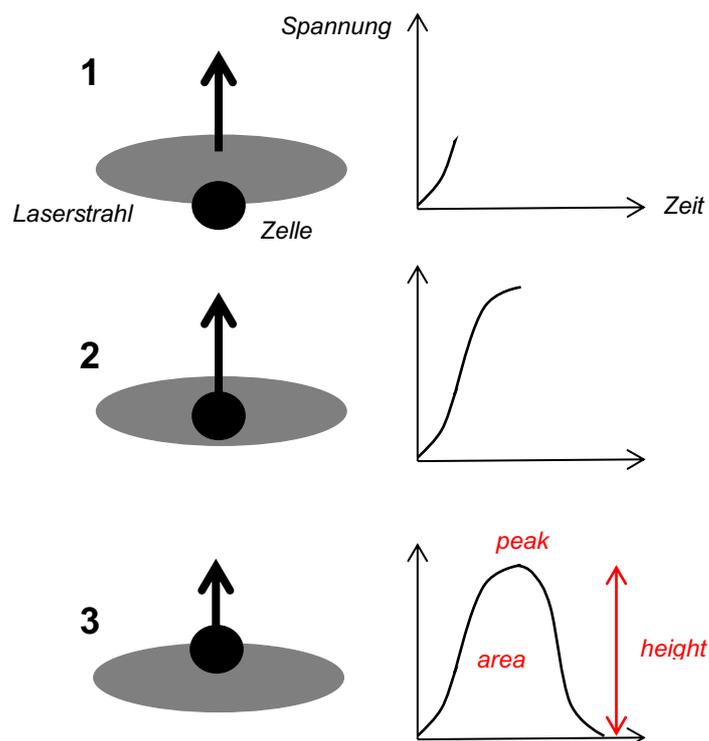


Abb. 17: Signalumwandlung. Das Lichtsignal wird in ein Spannungssignal konvertiert. Die Fläche unter der Kurve (*area*) oder der Gipfel (*peak*) zeigen den Messwert an (82).

(Beckman Coulter Inc., 2004, S. 5-10; Bushnell, 2015, Abb. 2)

Die von den Detektoren gemessenen Signale wurden für jede einzelne Zelle nacheinander als Listmode Daten (list mode data (LMD), correlated data, Listenmodusdateien) in einem standardisierten Datei-Format, dem Flow Cytometry Standard Format FCS 3.0, in der FCX 3.1 CXP Software für Windows abgespeichert und standen zur Auswertung bereit (82) (84).

3.6.5 Das Phänomen des Spillovers

Da Fluoreszenzen Licht einer Wellenlänge absorbieren, aber das von verschiedenen Wellenlängen aussenden, können sich die Emissionsspektren von Fluorochromen überlagern (siehe Abbildung 18) (61). Dies wird als „Spillover“ bezeichnet und muss durch spektrale Kompensation bzw. elektronische Subtraktion der sich überlappenden Fluoreszenzanteile korrigiert werden (61) (82). Sie kann auf Hardware-Ebene bei der Datenaufnahme oder mit einer Software danach durchgeführt werden (61) (84). Durch die inzwischen eingeführte Automatisierung der Kompensation mittels Software ist es möglich, ein größeres Spektrum an Färbungen zu verwenden und gleichzeitig mehr als fünf Fluoreszenzen zu detektieren (84). Das Ausmaß der erforderlichen Korrektur hängt stark von der Vorverstärkung, d.h. der Spannung, der PMT ab. Ist die Kompensation erfolgt, darf die Spannung nicht mehr verändert werden (78) (82) (89).

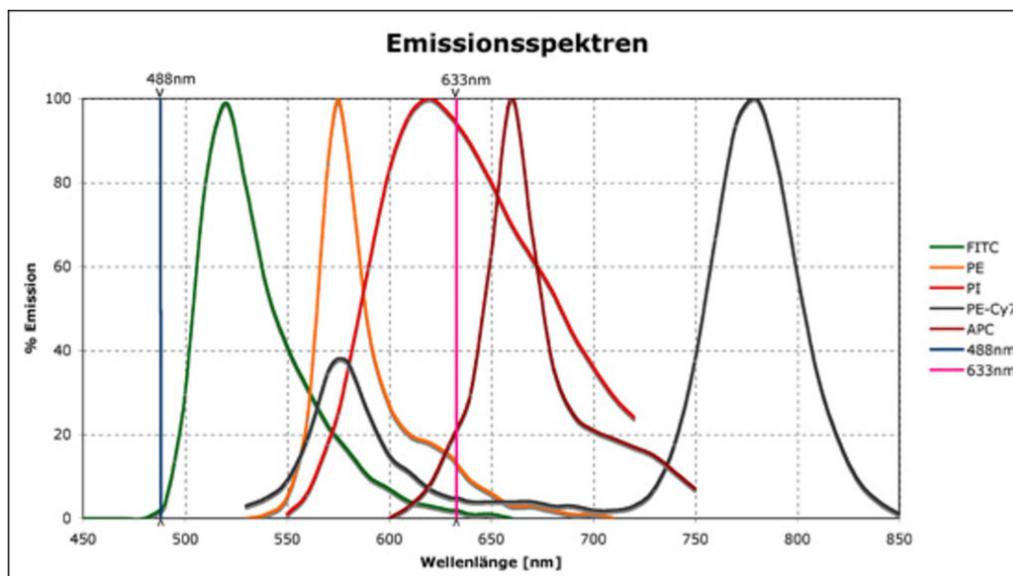


Abb. 18: Überlappende Emissionsspektren
(Hegemann, 2019, Abb. 2)

3.6.6 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die mittels Durchflusszytometrie gemessenen Ergebnisse können unterschiedlich dargestellt werden. Eine Möglichkeit ist das Histogramm, bei dem auf der x-Achse die Lichtintensität und auf der y-Achse die Anzahl der Zellen aufgetragen werden (87). Daneben stehen Dot-Plots zur Verfügung (Punktwolkendarstellung, bivariate displays, Zweiparameter-Punkthistogramm), bei denen sich auf der x- und der y-Achse die Intensitäten von zwei verschiedenen Messparametern befinden, z.B. der Forward Scatter und der Sideward Scatter (87). Jede Zelle wird als Punkt (dot) an der x- und y-Position anhand ihrer Intensitäten eingezeichnet (87). Dadurch kann herausgefunden werden, ob die Variablen miteinander korrelieren und eine Diagonale bilden oder unabhängig voneinander positioniert sind (87).

Um Unterschiede zwischen großen Populationen verbessert abzubilden, werden in seltenen Fällen Contour-Plots verwendet (88). Sie enthalten auch eine x- und y-Achse wie beim Dot-Plot, aber die Anzahl der Zellen stellt sich, wie in topographischen Bergkarten, in Form von Höhenlinien dar (88). Bei einem Density-Plot, zur Dichtedarstellung, eine Art des Contour-Plots, werden die Linien so festgelegt, dass die dazwischen liegenden Flächen eine definierte Anzahl an Zellen enthalten (88). Sie wurden in der vorliegenden Arbeit zeitweise als Hilfestellung zur Analyse der regulatorischen T-Zellen eingesetzt. Abbildung 19 zeigt ein Beispiel hierfür.

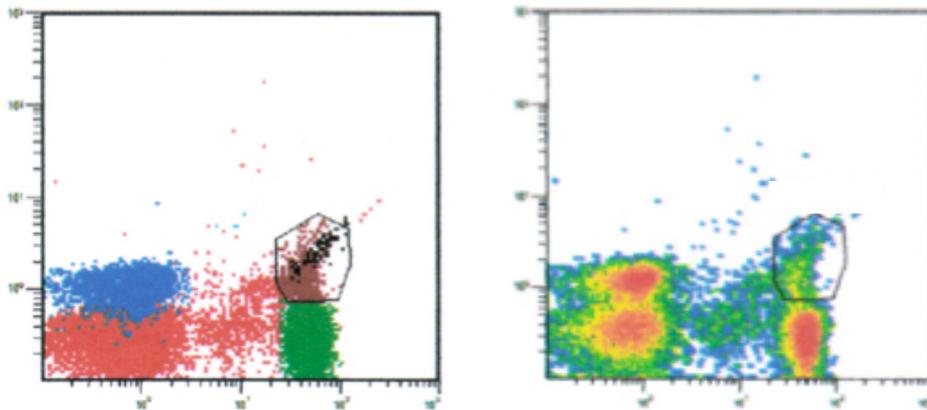


Abb. 19: Beispiel für einen Dot-Plot (links) und seinen entsprechenden Contour-Plot (rechts)
(Quelle: eigene Grafik)

3.7 Gating-Strategien

Um die Verteilung der einzelnen Zellen darzustellen, wurden in dieser prospektiven Studie vorwiegend Dot-Plots verwendet. Daneben kamen Gating-Strategien zum Einsatz. Sie sind weitgehend standardisiert und ermöglichen es, eine Zellgruppe auszuwählen, sie einzugrenzen und dann in einem neuen Dot-Plot anhand ihrer Fluoreszenzen zu charakterisieren (91).

Solche Gates werden um jede einzelne Fraktion automatisiert gesetzt und dann bei weiterer Unterteilung als Regionen mit R1, R2, R3, etc. bezeichnet (88). Anschließend erhalten diese entsprechend den Zellen ihre Bezeichnungen.

Abbildung 20 zeigt die Verteilung der Leukozyten in der Durchflusszytometrie. Sie wurden mittels ihrer FSC- und SSC-Eigenschaften aufgeteilt: Lymphozyten, die klein sind und wenig Granula besitzen, Monozyten, groß und mit wenig Granula, und die großen Granulozyten (88).

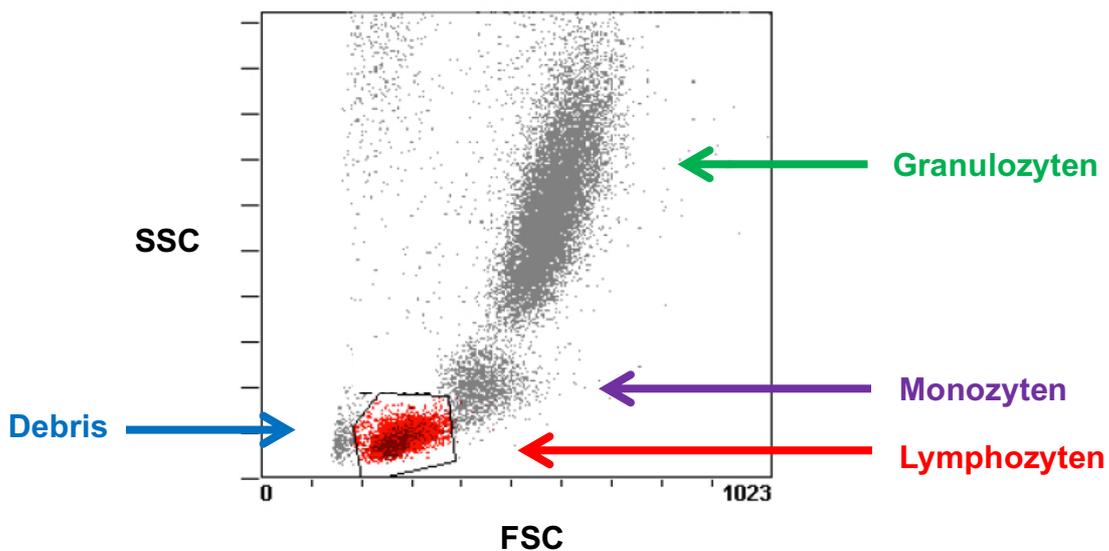


Abb. 20:

Verteilung der Leukozyten entsprechend den Eigenschaften des FSC und SCC in einem Dot-Plot (Beispiel)

(in Anlehnung an: Sack, 2007, S. 52 Abb. 13)

Daneben wurde sichergestellt, dass ausschließlich Leukozyten in die Messungen eingeschlossen werden. Daher wurden der Schwellenwert im FSC und die Gates so gesetzt, dass Zellen mit geringerer Partikelgröße wie z.B. Erythrozyten, Thrombozyten oder abgestorbene Zellen nicht gezählt werden (84).

Daneben wurde eine Darstellung der Regionen mit Fehlfarben gewählt. Diese sorgen dafür, dass jeder Region in jedem Dot-Plot eine feste, zur Interpretation auffallende Farbe zugeordnet wird (88).

Die Auswertung erfolgte anhand von Prozentzahlen der Zellen innerhalb eines Gates in Bezug auf die Gesamtzahl der gemessenen Zellen oder der Zellzahl eines übergeordneten Gates.

Da die Lymphozyten von größtem Interesse sind, wurde im Dot-Plot, wie in Abbildung 21 gezeigt, um sie ein Gate gesetzt. Außerdem wurden die Lymphozyten in einem separaten Punktdiagramm abgebildet und in der weiteren Analyse war es möglich, die Lymphozyten anhand verschiedener Oberflächenmarker zu testen.

In den folgenden Dot-Plots werden die Strategien und die verschiedenen gesetzten Gates für die Lymphozyten präsentiert. Bei den Abbildungen handelt es sich um Beispiele aus der vorliegenden Arbeit.

3.7.1 B-Lymphozyten und deren Subpopulationen

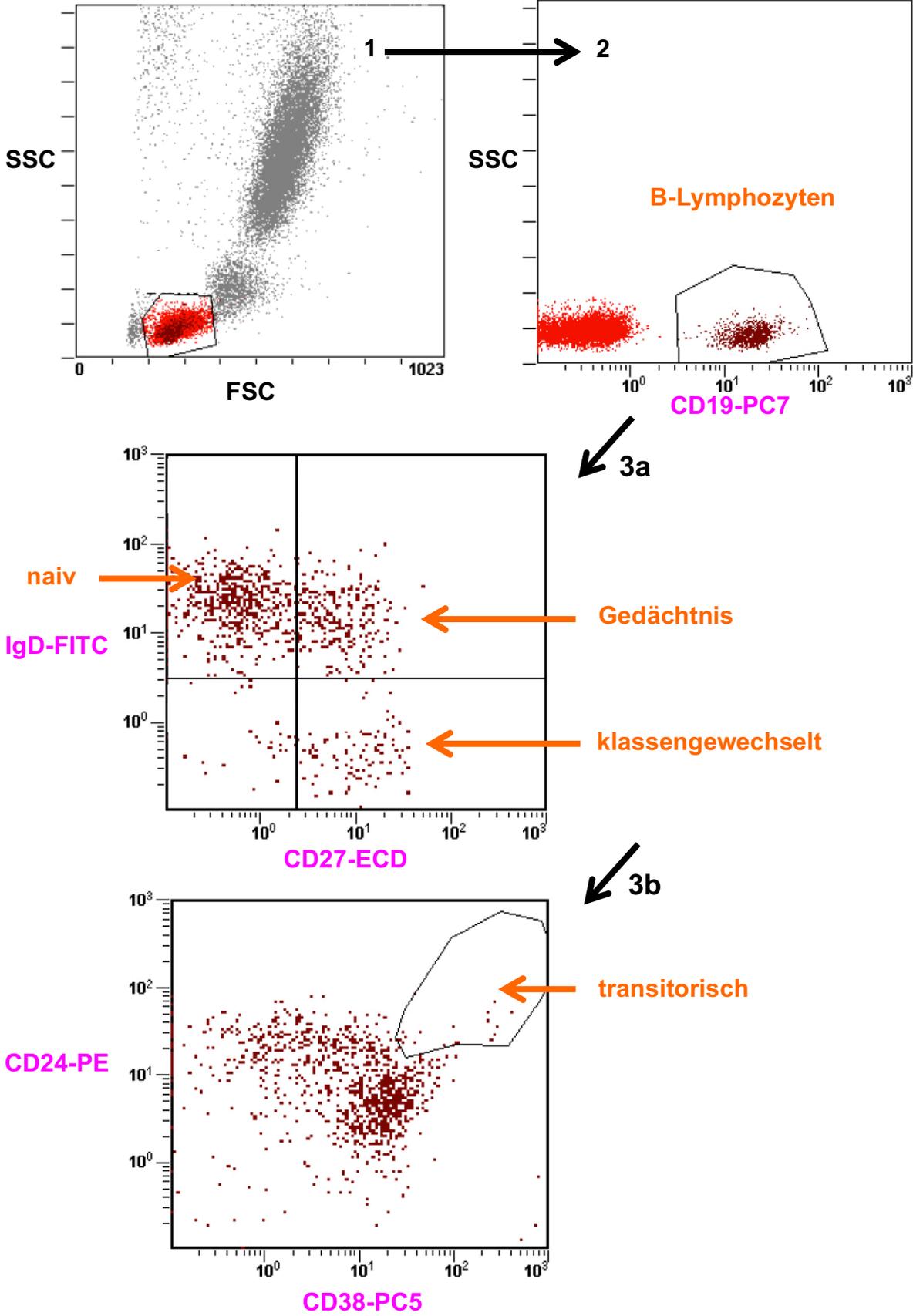


Abb. 21: Gating-Strategie bei B-Lymphozyten
(Quelle: eigene Grafik)

Wenn die Lymphozyten mittels SSC und FSC gegatet worden sind (Schritt 1), werden sie anhand des Oberflächenmarkers CD19 (mit PC7 markiert) in einer weiteren Punktwolkendarstellung analysiert. Dadurch können B-Zellen in einem weiteren Gate differenziert werden (Schritt 2). Die B-Lymphozyten wurden anschließend in zwei weiteren Dot-Plots mittels den Oberflächenmarkern IgD-FITC und CD27-ECD als naive in Region B1, Gedächtnis- in Region B2 und klassengewechselte B-Zellen in Region B3 definiert (Schritt 3a). Außerdem wurden die B-Zellen auf das Vorhandensein von CD24-PE und CD38-PE geprüft (Schritt 3b). Die für beide Oberflächenmarker positiven werden als transitorische B-Zellen bezeichnet.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die von den jeweiligen Zellen exprimierten Antigene (61) (92) (93).

Zellpopulation	Expressionseigenschaften
B-Lymphozyten	CD19+
Naive B-Lymphozyten	CD19+, IgD+ CD27-
Gedächtnis B-Lymphozyten	CD19+, IgD+ CD27+
Klassengewechselte B-Lymphozyten	CD19+, IgD- CD27+
Transitorische B-Lymphozyten	CD19+, CD24hi CD38hi

Tab. 7: Expressionseigenschaften der B-Zellen und ihrer Populationen (18) (93)
(Quelle: eigene Grafik)

Hi als Abkürzung für „high expression“ bedeutet eine besonders starke Positivität für die entsprechenden Oberflächenmerkmale.

3.7.2 T-Lymphozyten und deren Subpopulationen

Die gegateten Lymphozyten als Ausgangspunkt (Schritt 1) wurden den Oberflächenmarkern CD8-PC7 und CD4-PC5 gegenübergestellt, um die Differenzierung zu den T-Zellen zu überprüfen. Das liegt daran, dass T-Lymphozyten anhand der Positivität für CD8 oder CD4 definiert werden (Schritt 2) (93). Um die CD4- und CD8-T-Zellen wurden jeweils Gates gesetzt, die entsprechend CD45-RO-PE und CD45-RA-ECD in verschiedene Regionen aufgeteilt wurden. Gedächtnis T-Zellen (CD4+ CD45RA- CD45RO+ bzw. CD8+ CD45RA- CD45RO+) stellen dabei Region A1 bzw. B1 dar. Diese wiederum bildeten jeweils einen neuen Dot-Plot mit weiteren Regionen mittels CD62L-FITC. Hier ließen sich zusätzlich naive, zentrale Gedächtnis, Effektor-Gedächtnis und Effektor-Gedächtnis RA+ T-Zellen (EMRA) differenzieren (61) (92) (93).

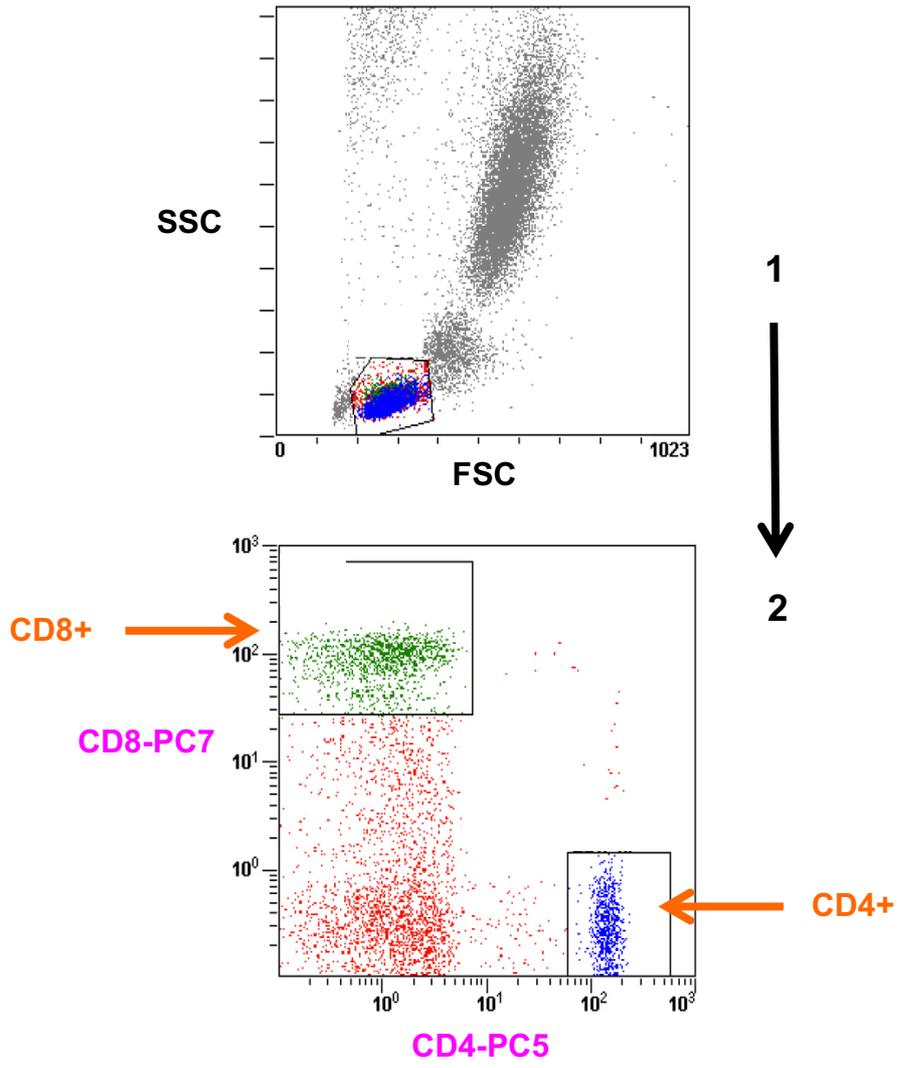
Zellpopulation	Expressionseigenschaften
CD8-positive T-Lymphozyten	CD8+
CD4-positive T-Lymphozyten	CD4+
Gedächtnis CD8+ T-Lymphozyten	CD8+, CD45RA- CD45RO+
Naive CD8+ T-Lymphozyten	CD8+, CD62L+ CD45RA+
Zentrale Gedächtnis CD8+ T-Lymphozyten	CD8+, CD45RA- CD45RO+
Effektor-Gedächtnis CD8+ T-Lymphozyten	CD8+, CD62L- CD45RA-
EMRA CD8+ T-Lymphozyten	CD8+, CD62L- CD45RA+
Gedächtnis CD4+ T-Lymphozyten	CD4+, CD45RA- CD45RO+
Naive CD4+ T-Lymphozyten	CD4+, CD62L+ CD45RA+
Zentrale Gedächtnis CD4+ T-Lymphozyten	CD4+, CD45RA- CD45RO+
Effektor-Gedächtnis CD4+ T-Lymphozyten	CD4+, CD62L- CD45RA-
EMRA CD4+ T-Lymphozyten	CD4+, CD62L- CD45RA+

Tab. 8:

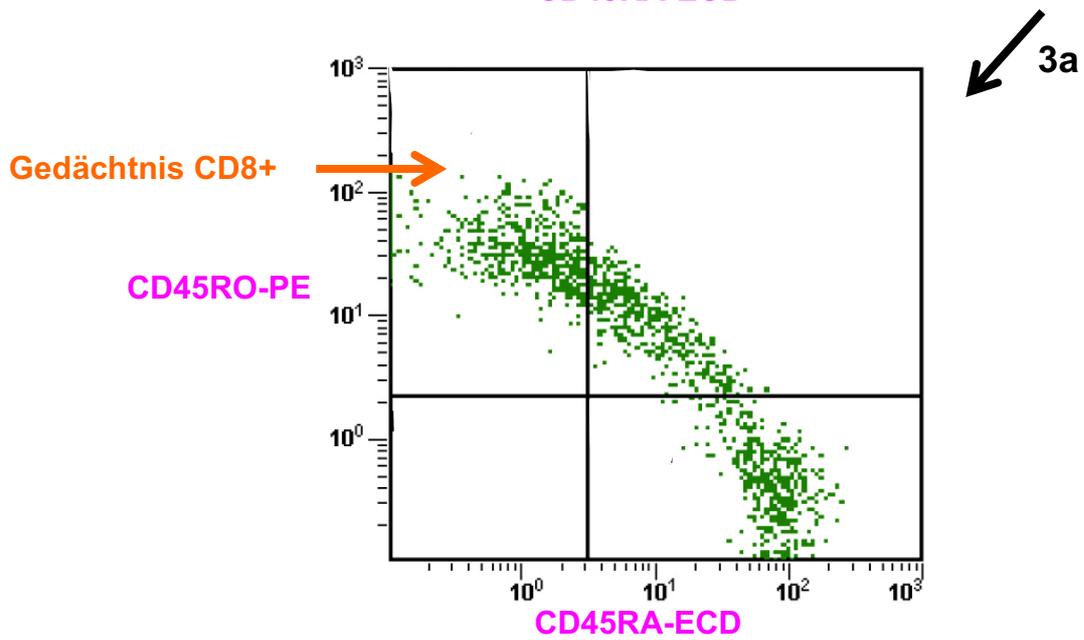
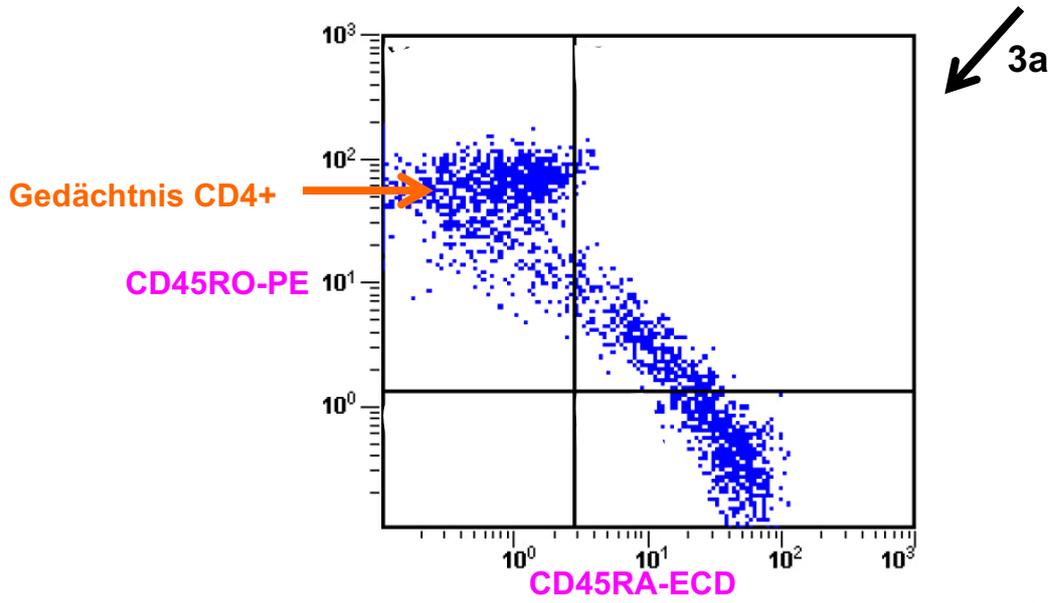
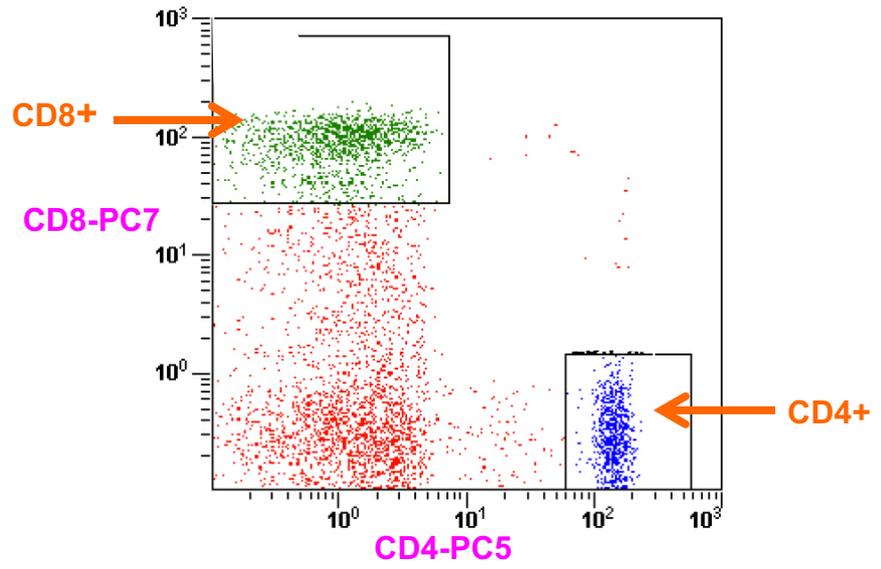
Expressionseigenschaften der CD8+ und CD4+ T-Zellen und ihrer Populationen (18) (93)

(Quelle: eigene Grafik)

A



B



C

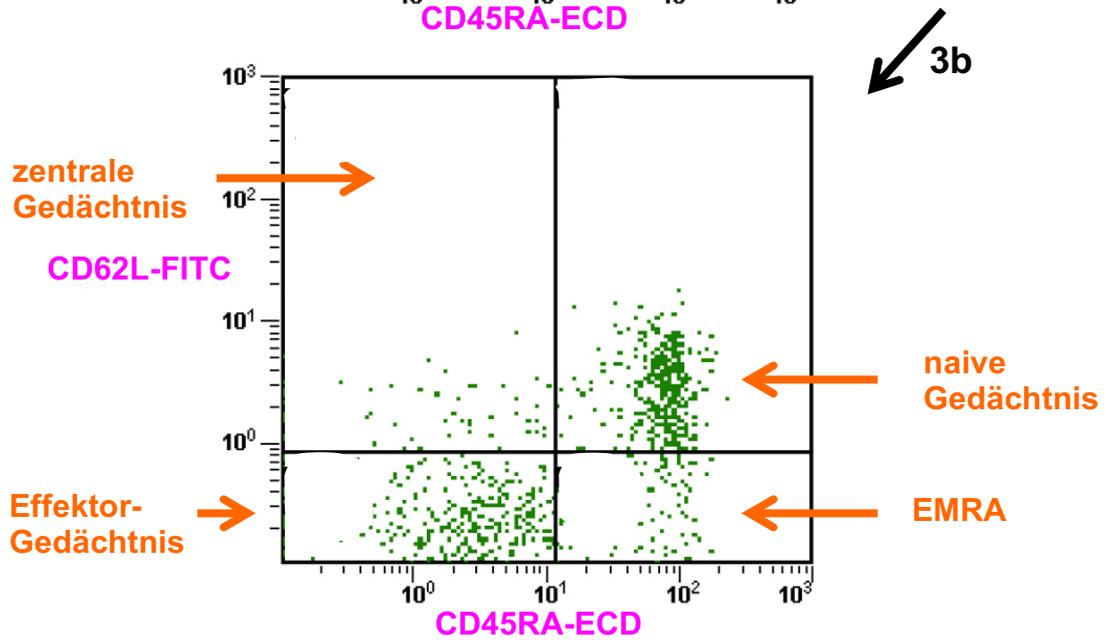
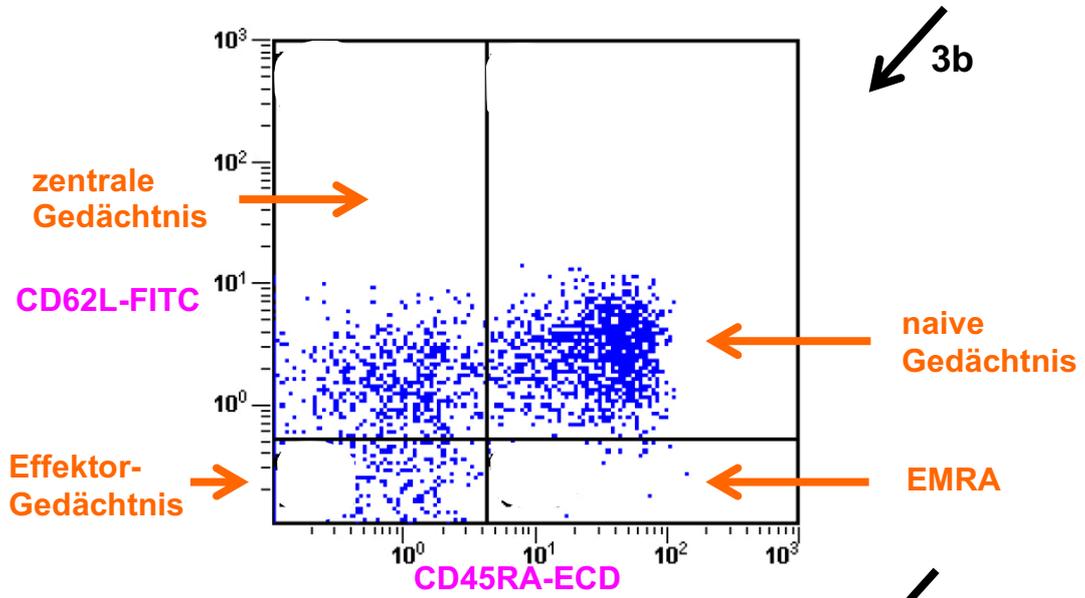
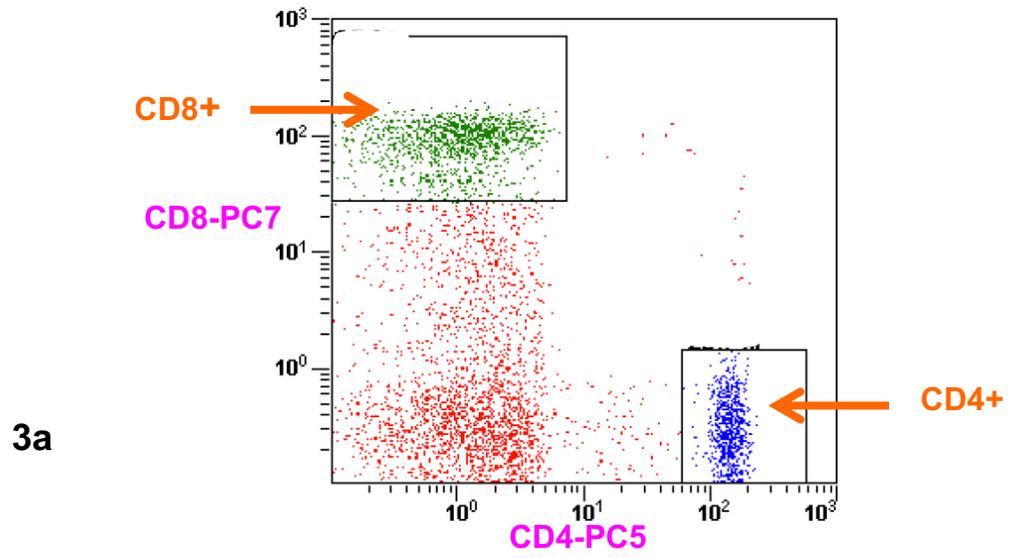


Abb. 22: Gating-Strategien bei den Gedächtnis T-Lymphozyten

(Quelle: eigene Grafik)

Aufteilung in die Dot-Plots A, B und C zur Übersichtsdarstellung:

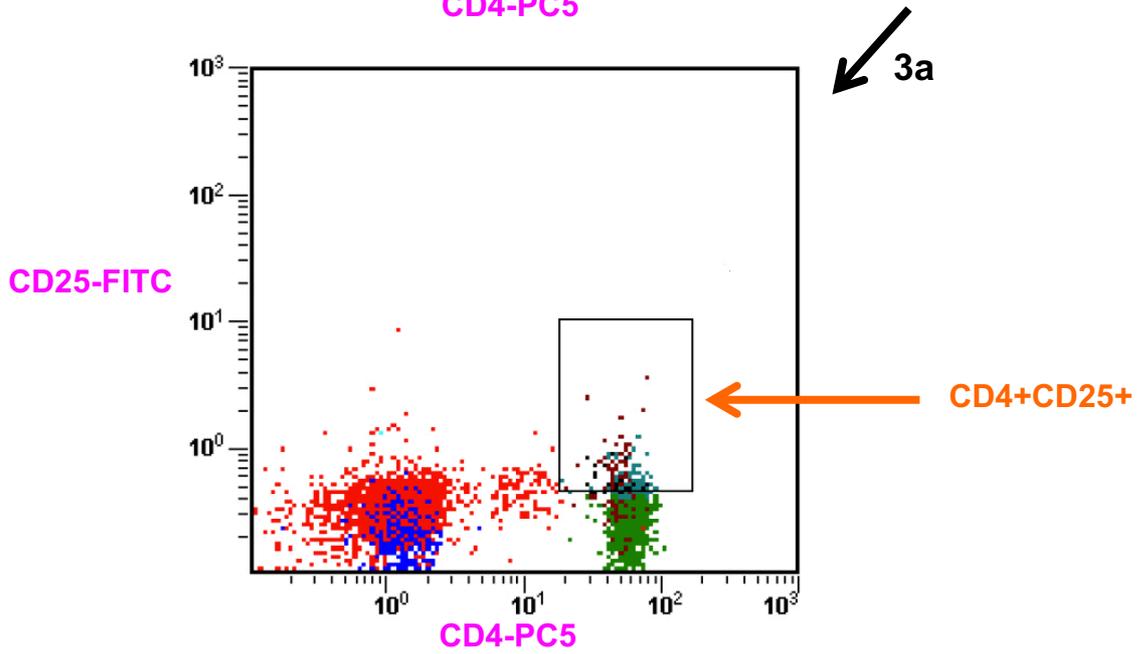
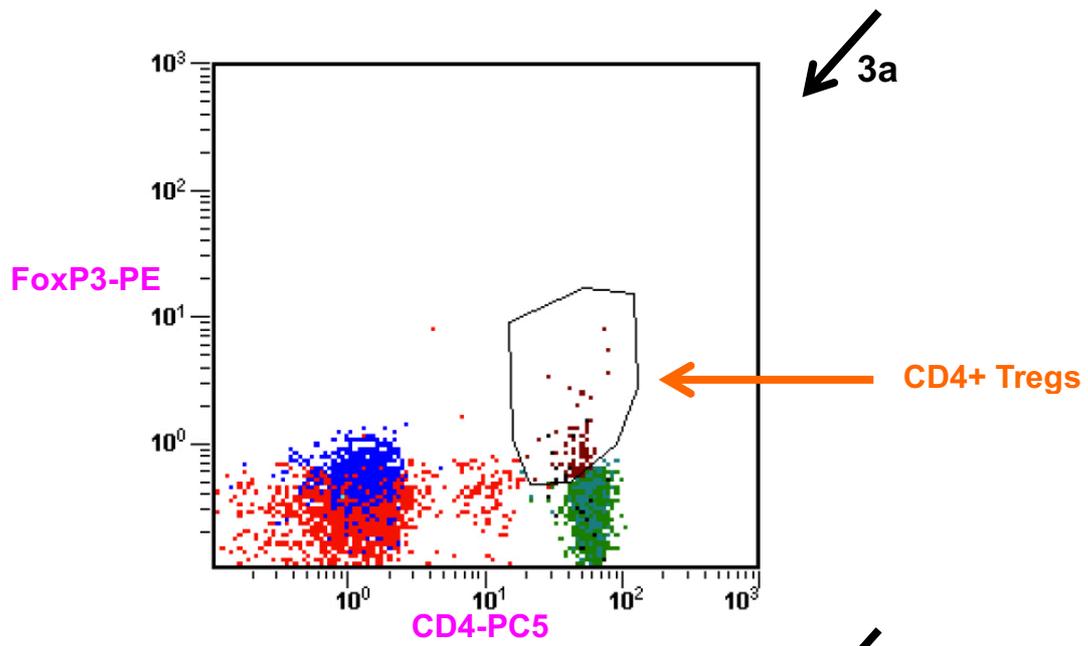
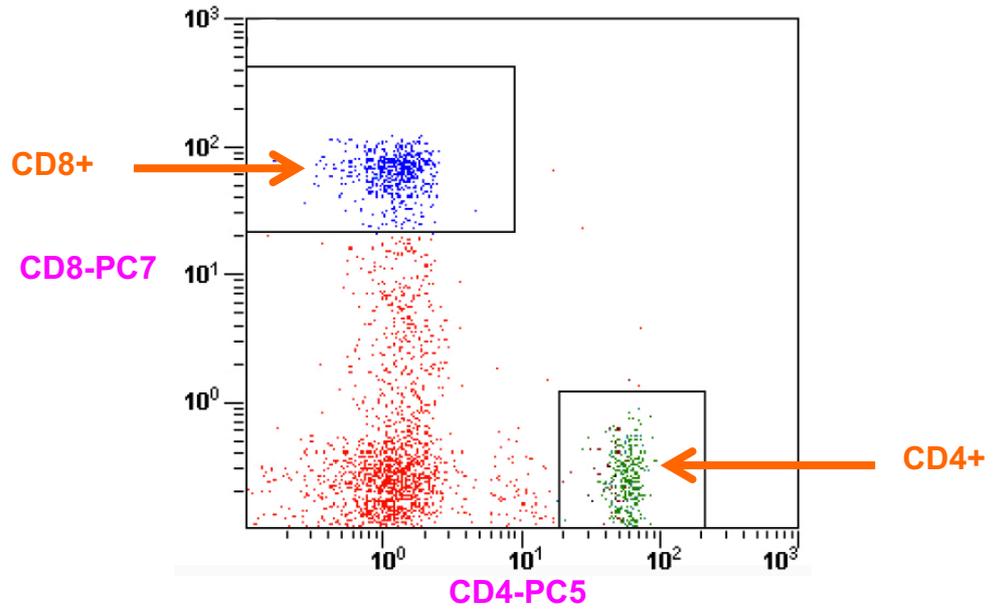
A Differenzierung von CD8⁺ (grün) und CD4⁺ T-Zellen (blau) aus den Lymphozyten

B Aufteilung der CD4⁺ (grün) bzw. CD8⁺ T-Zellen (blau) in die Regionen der jeweiligen Gedächtnis T-Lymphozyten

C Die Regionen C1/D1 stellen die zentralen Gedächtnis T-Zellen dar, C2/D2 die naiven Gedächtnis T-Zellen, C3/D3 die Effektor-Gedächtnis T-Zellen und C4/D4 die Effektor-Gedächtnis RA⁺ T-Zellen. Je nach Farbe handelt es sich um die Subpopulationen der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen.

Aufbauend auf dem Dot-Plot mit den Gates der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen werden in jeweils zwei weiteren Diagrammen CD4⁺ bzw. CD8⁺ regulatorische T-Zellen als FoxP3-positiv (FoxP3-PE) und CD4⁺CD25⁺ bzw. CD8⁺CD25⁺ T-Zellen als CD25 positiv (CD25-AF488) bezeichnet (61) (92) (93). Schritt A ist dabei der Gleiche wie oben beschrieben.

B



C

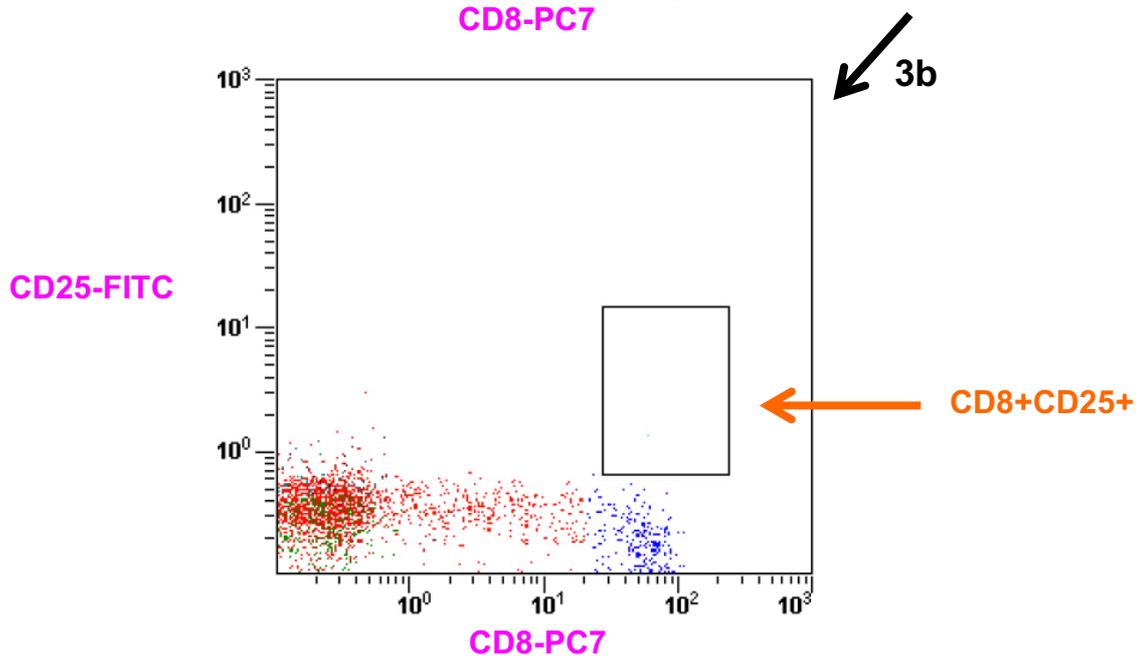
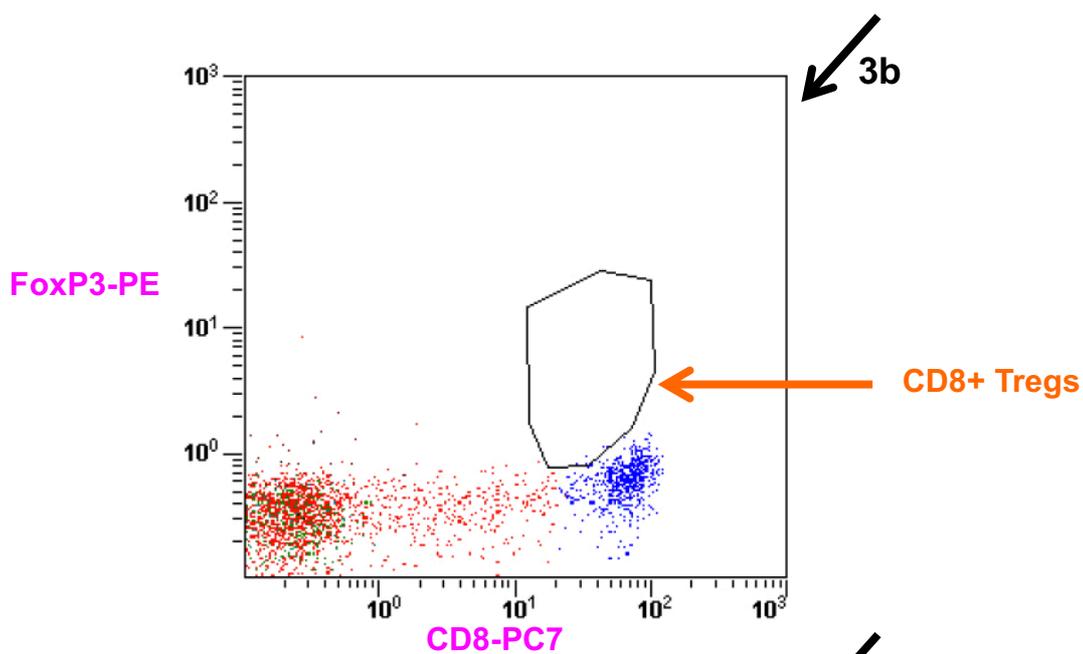
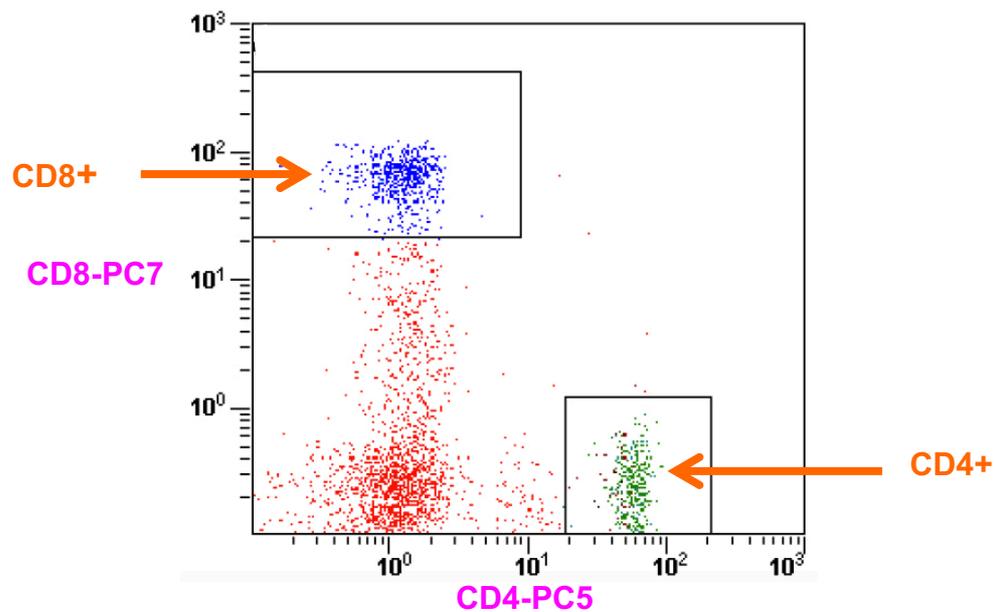


Abb. 23: Gating-Strategie bei regulatorischen T-Zellen

(Quelle: eigene Grafik)

Aufteilung in die Dot-Plots B und C zur Übersichtsdarstellung, A siehe oben:

A Differenzierung von CD8⁺ (grün) und CD4⁺ T-Zellen (blau) aus den Lymphozyten

B Aufteilung der CD4⁺ T-Zellen (grün) in regulatorische CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

C Aufteilung der CD8⁺ T-Zellen (blau) in regulatorische CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺CD25⁺ T-Zellen

Zellpopulation	Expressionseigenschaften
Regulatorische CD4 ⁺ T-Lymphozyten	CD4 ⁺ , FoxP3⁺
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten	CD4 ⁺ , CD25⁺
Regulatorische CD8 ⁺ T-Lymphozyten	CD8 ⁺ , FoxP3⁺
CD8 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten	CD8 ⁺ , CD25⁺

Tab. 9: Expressionseigenschaften der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen (18) (93)

(Quelle: eigene Grafik)

CD8-positive T-Lymphozyten wurden auch einerseits den Oberflächenmarkern CD28-PC5 und CD27-ECD sowie andererseits CD57-FITC und CD279-PE gegenübergestellt. Hier zeigten sich diejenigen im einem frühen Zustand CD28 und CD27 positiv, im intermediären CD28 negativ und CD27 positiv und im späten CD28 und CD27 negativ. Die erschöpften CD8-Zellen sind CD279 positiv, während die terminalen Effektor-Zellen eine Negativität für CD279 negativ und eine Positivität für CD57 aufweisen (61) (92) (93).

Zellpopulation	Expressionseigenschaften
CD8 ⁺ T-Zellen im frühen Status	CD8 ⁺ , CD28⁺ CD27⁺
CD8 ⁺ T-Zellen im intermediären Status	CD8 ⁺ , CD28⁻ CD27⁺
CD8 ⁺ T-Zellen im späten Status	CD8 ⁺ , CD28⁻ CD27⁻
CD8 ⁺ T-Zellen im erschöpften Status	CD8 ⁺ , CD279⁺ CD57⁻
Terminale Effektor-T-Zellen	CD8 ⁺ , CD279⁻ CD57⁺

Tab. 10: Expressionseigenschaften der CD8⁺ T-Zellpopulation (18) (93)

(Quelle: eigene Grafik)

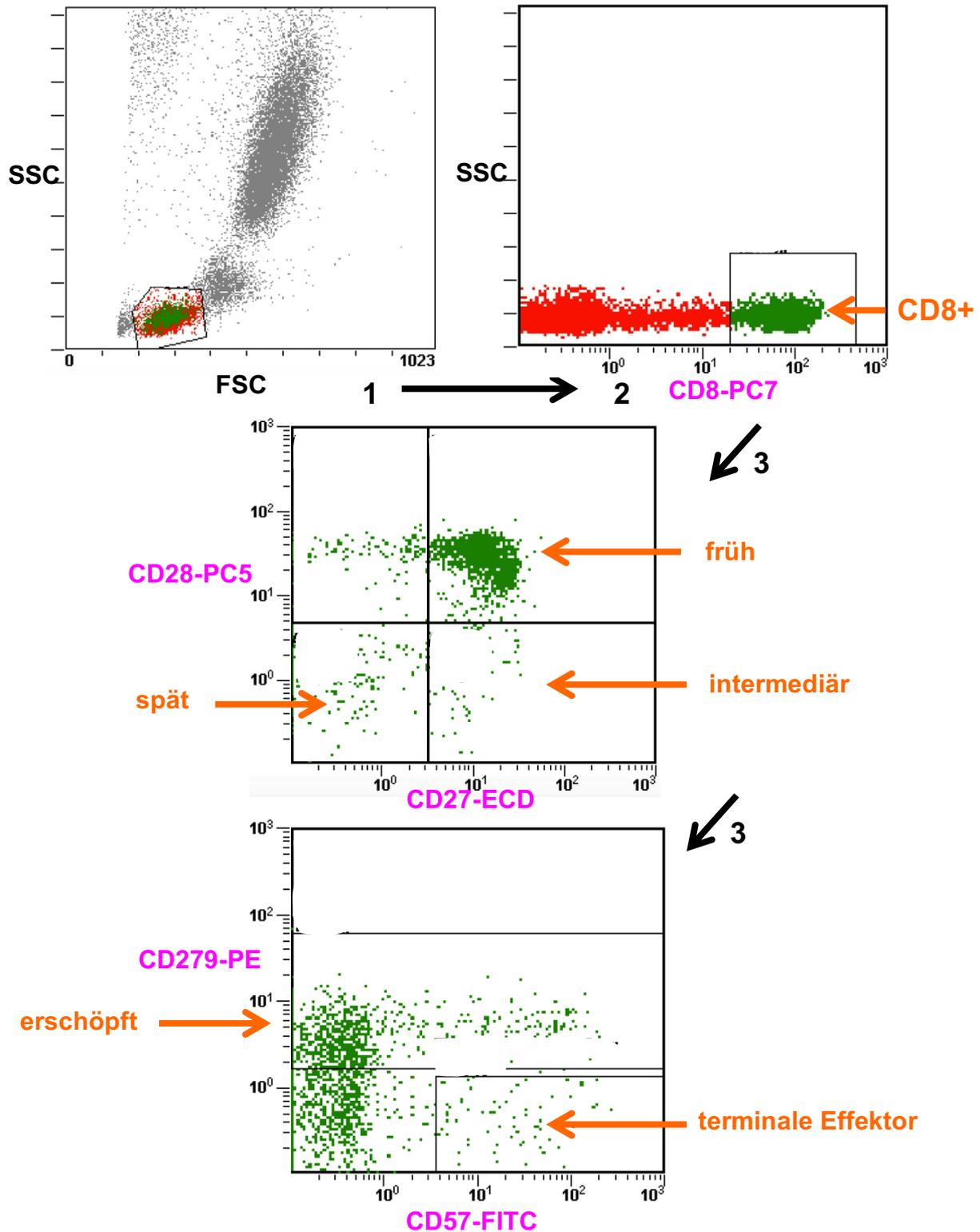


Abb. 24: Gating-Strategie bei CD8+ T-Zellen
(Quelle: eigene Grafik)

Außerdem werden Typ 1, 2 und 17 CD4+ T-Helferzellen mittels der fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CXCR3 (CD183-FITC), CCR4 (CD194-PE), CCR5 (CD195-PE/Dazzle 594) und CCR6 (CD196-PC7) festgelegt. Aus dem Gate der CD4+ T-Lymphozyten werden Th1-Zellen als CD4+ CXCR3+ CCR4- CCR5+ CCR6- definiert, Th2-Zellen als CD4+ CXCR3-

CCR4+ CCR5- CCR6-, und Th17-Zellen als CD4+ CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6+ (74) (75) (76). Th1-Zellen werden dementsprechend in den Regionen A4 und B1 beschrieben, Th2-Zellen in B4 und B3 und Th17-Zellen in B4 und A1.

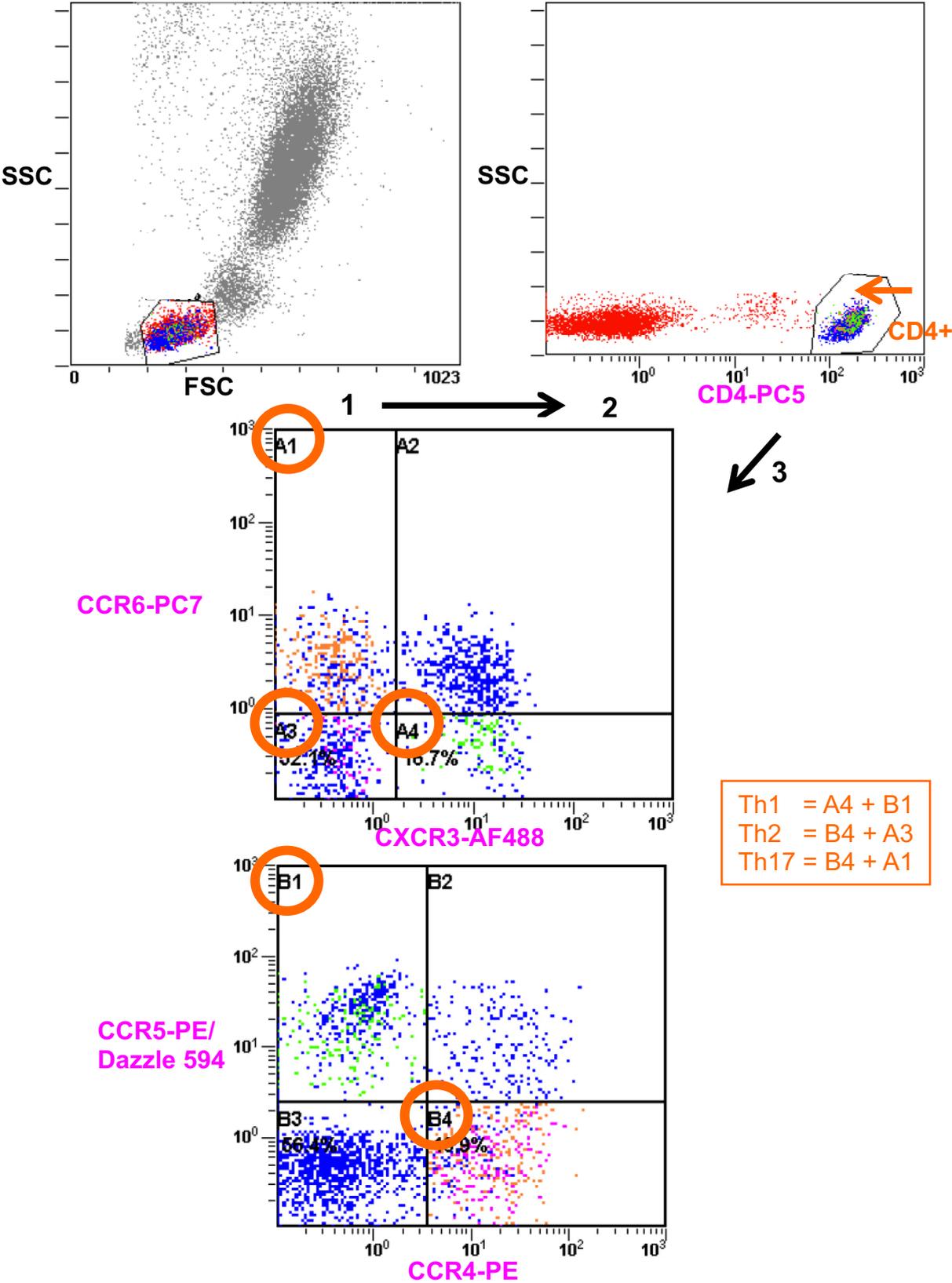


Abb. 25: Gating-Strategie bei T-Helferzellen
(Quelle: eigene Grafik)

Zellpopulation	Expressionseigenschaften
Th1-Zellen	CD4+ CXCR3+ CCR4- CCR5+ CCR6-
Th2-Zellen	CD4+ CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6-
Th17-Zellen	CD4+ CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6+

Tab. 11: Expressionseigenschaften der CD4+ T-Helferzellen (18) (93)

(Quelle: eigene Grafik)

Neben T- und B-Zellen werden NKT-Zellen anhand von CD56-PE und CD3-PC7 charakterisiert. Sie sind CD3 positiv und CD56 positiv (92) (93) (siehe Tab. 12 und Abb. 26).

3.7.3 NK-Lymphozyten und deren Subpopulationen

Wie NKT-Zellen werden Natürliche Killerzellen auch anhand von CD56-PE, CD16-ECD und CD3-PC7 charakterisiert. Daneben gibt es verschiedene NK-Zellen, die CD56bright CD16dim, CD56+CD16+ und CD56dim CD16+ sind (92) (93). Dim und bright sind Zusatzbezeichnungen, um zwischen schwacher bzw. starker Expression der Merkmale auf der Zelloberfläche zu unterscheiden. Die Dot-Plots werden in Abbildung 26 gezeigt.

Zellpopulation	Expressionseigenschaften
NKT-Zellen	CD3+ CD56+
CD56bright CD16dim NK-Zellen	CD56bright CD16dim
CD56+ CD16+ NK-Zellen	CD56+ CD16+
CD56dim CD16+ NK-Zellen	CD56dim CD16+

Tab. 12: Expressionseigenschaften der NKT- und NK-Zellen (18) (93)

(Quelle: eigene Grafik)

Des Weiteren wurden aktivierte T-Zellen untersucht. Anhand von HLA-DR-FITC und CD8-PC7 bzw. CD4-PC5 sowie CD69-PE und CD8-PC7 bzw. CD4-PC5 konnten aktivierte Helfer-Zellen und aktivierte zytotoxische T-Zellen differenziert werden (61) (92) (93).

Die Dot-Plots sind in Abbildung 27 sichtbar.

Zellpopulation	Expressionseigenschaften
Aktivierte CD4+ T-Helferzellen	CD4+, HLA-DR+
Aktivierte CD8+ T-Helferzellen	CD8+, HLA-DR+
Aktivierte zytotoxische CD4+ T-Zellen	CD4+, CD69+
Aktivierte zytotoxische CD8+ T-Zellen	CD8+, CD69+

Tab. 13: Expressionseigenschaften von aktivierten T-Zellen (18) (93)

(Quelle: eigene Grafik)

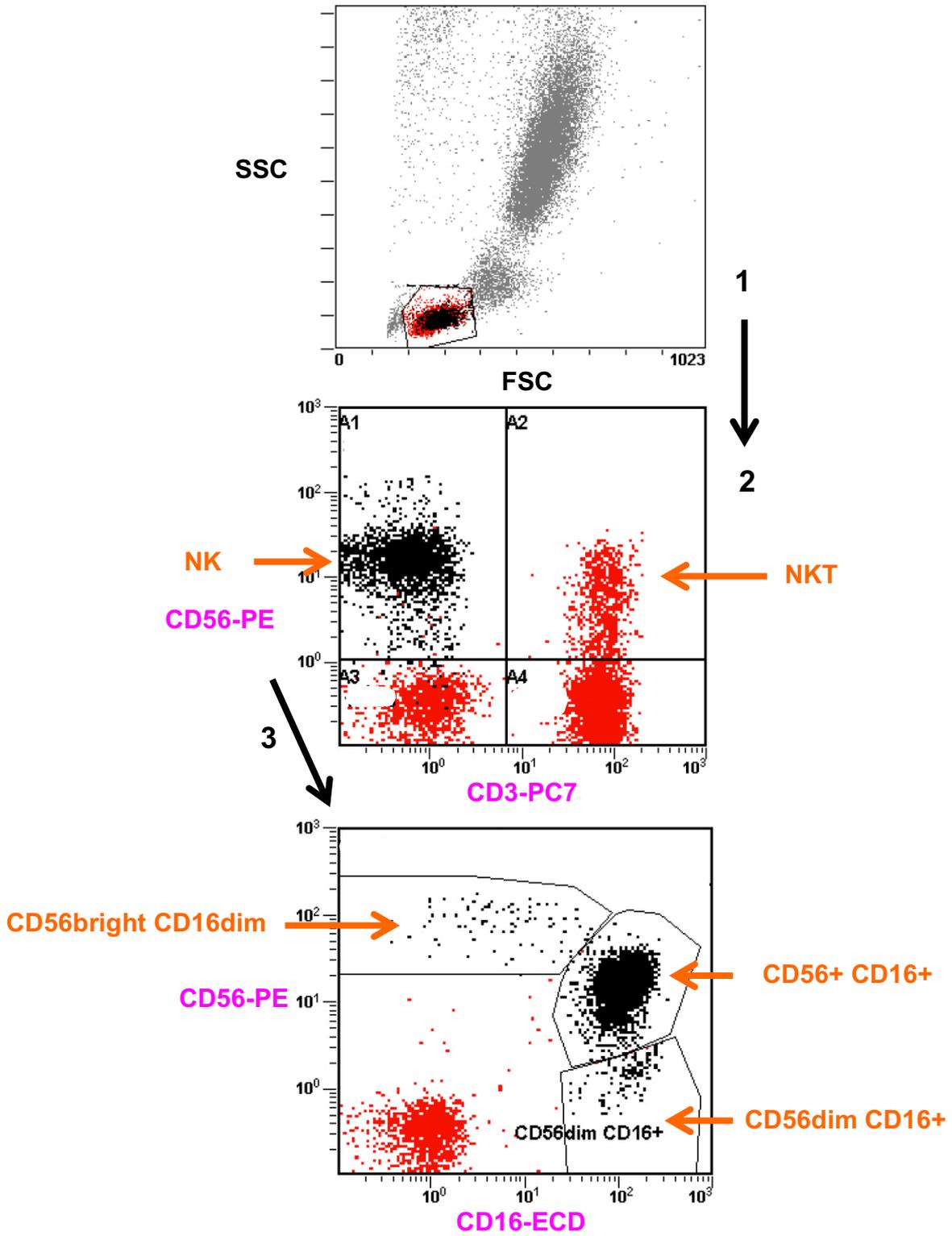
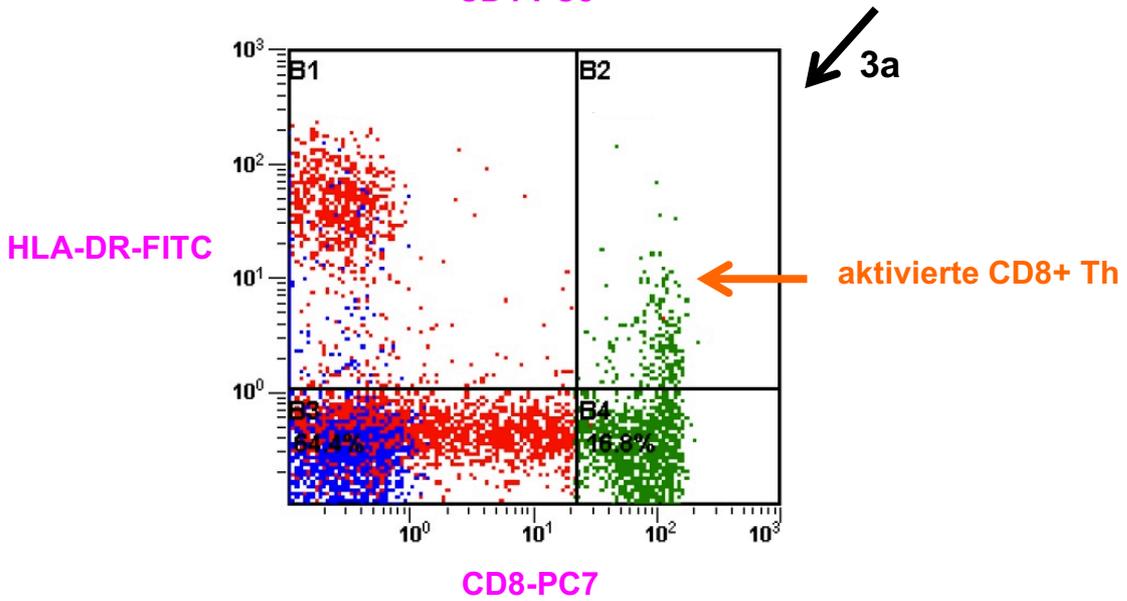
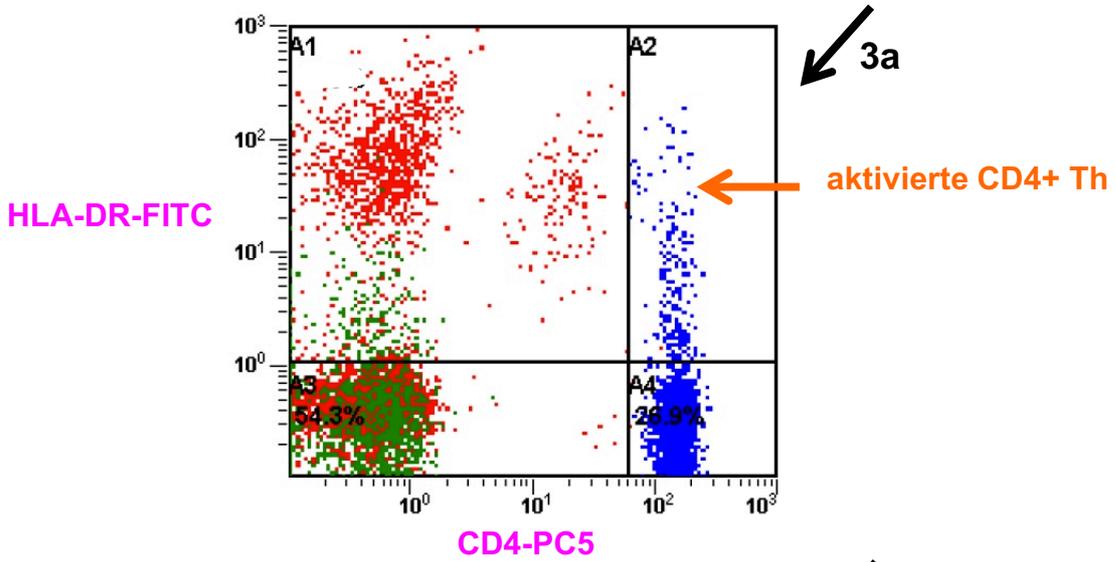
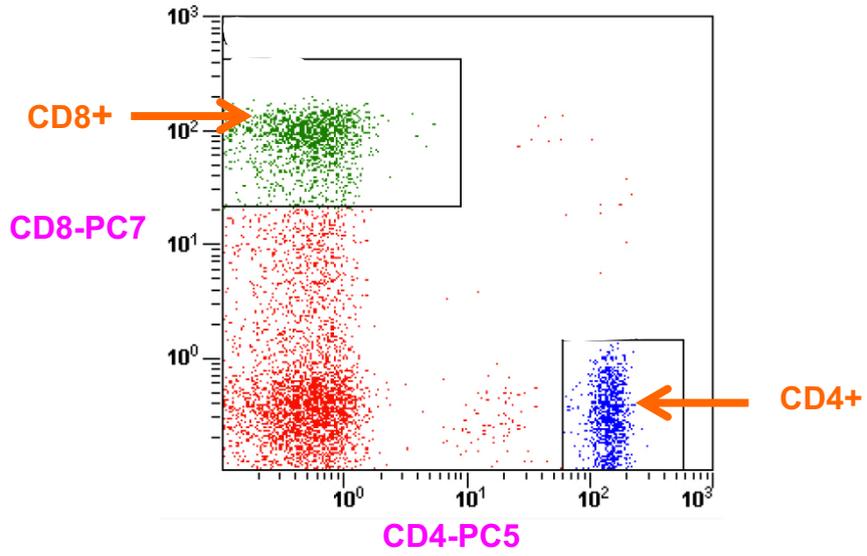


Abb. 26: Gating-Strategie bei NK-ähnlichen T-Zellen und NK-Zellen
(Quelle: eigene Grafik)

A



B

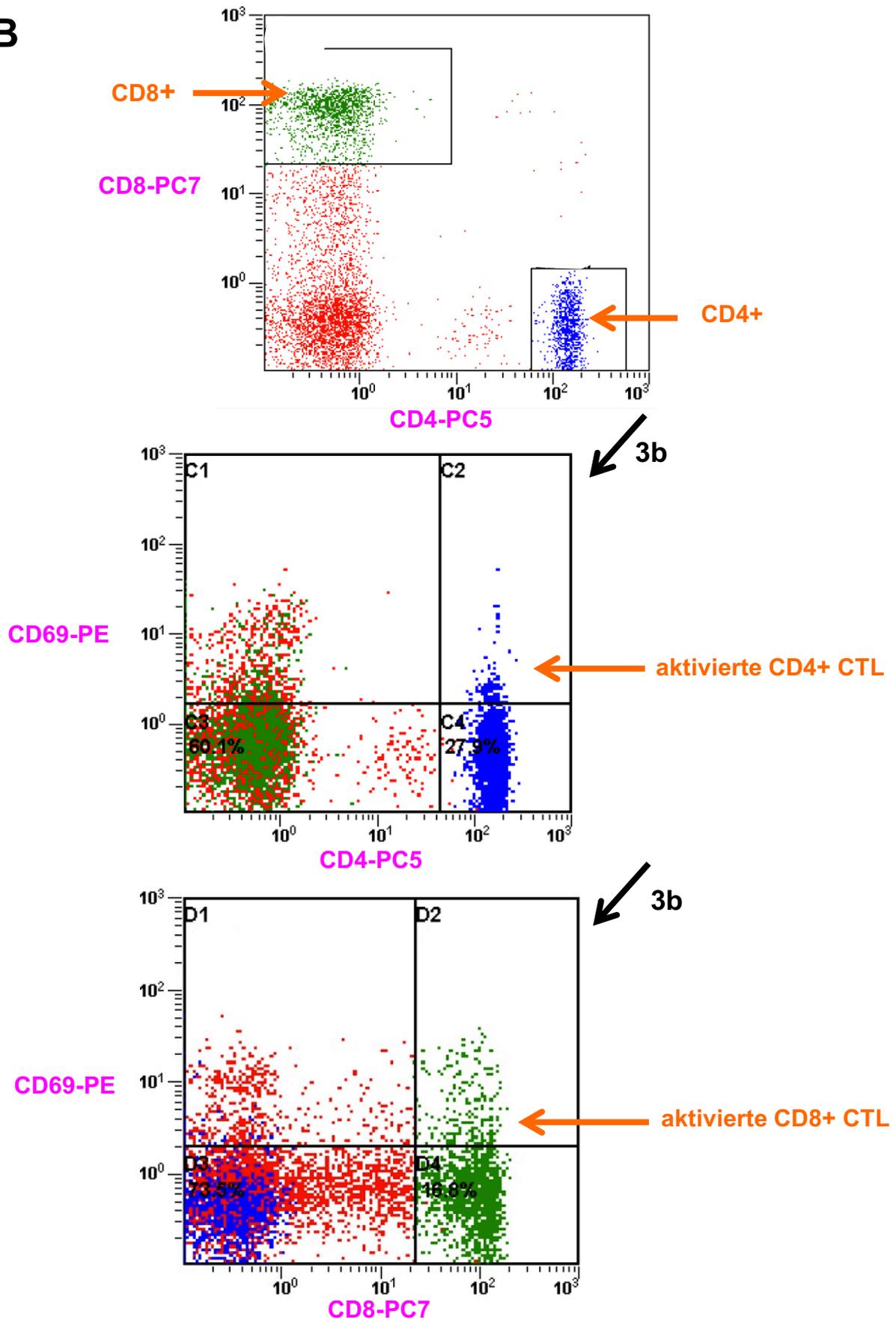


Abb. 27: Gating-Strategie bei aktivierten T-Zellen
(Quelle: eigene Grafik)

3.8 Statistik

Unter den verschiedenen Populationen der Lymphozyten, die in dieser Studie untersucht wurden, stehen grundsätzlich CD4+ und CD8+ Lymphozyten im Mittelpunkt der patienteneigenen Immunität gegenüber soliden Tumorerkrankungen.

Die Datensammlung und die Erstellung der statistischen Abbildungen erfolgten mit Microsoft® Excel®, Microsoft® PowerPoint® und Microsoft® Word® für Mac 2011 (Microsoft®, Redmond, Washington, USA). Die statistische Auswertung wurde neben Microsoft® Excel® mit Hilfe des IBM® SPSS® Programms für Windows (IBM Statistical Package for Social Science Statistics 24, IBM Corporation, Armonk, New York, USA) durchgeführt.

Für diese Studie fand eine statistische Berechnung der Fallzahl statt. Dafür wurden CD4+ und CD8+ Zellen als primäre Zielmarker ausgewählt. Auch wenn die Abschätzung dieser Fallzahl sowohl für CD4+ als auch für CD8+ Zellen separat ablief, wurden jedoch die Zahlenwerte am Ende des Vorhabens gemeinsam ausgewertet. Dies liegt daran, dass für beide Zellpopulationen keine Unterschiede im longitudinalen Verlauf nachgewiesen werden konnten. Sofern nicht anders aufgeführt, sind die Ergebnisse als mediane Werte mit interquartilen Abständen für die deskriptive Analyse angegeben. Der Wilcoxon-Test für die entsprechenden Proben wurde für alle zweiseitigen statistischen Tests verwendet, um die unterschiedliche Anzahl an Lymphozyten und deren Subpopulationen vor und nach Chemotherapie zu detektieren.

Die Berechnung der jeweiligen Fallzahl für CD4+ und CD8+ Lymphozyten erfolgte für verbundene Stichproben mit einem Signifikanzniveau von 0,05 und einer Power von 80%.

Bei der Testung von multiplen Hypothesen diente die Bonferroni-Methode der Korrektur, weshalb die Signifikanzniveaus am Ende niedriger festgelegt wurden. p-Werte kleiner als 0.022 wurden demnach als statistisch signifikant betrachtet. Aufgrund von Voranalysen wurde für die CD8+ Zellpopulation ein mittlerer Zahlenwert von 250 μ l +/- 100 μ l und für die CD4+ Zellpopulation einer von 550 μ l +/- 200 μ l erwartet. Eine Reduktion der mittleren Zellzahl um mindestens 25% in beiden Lymphozyten-Fraktionen wurde als nachzuweisender Unterschied definiert. Mit Hilfe des online verfügbaren Statistikprogramms <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx> errechneten sich aus diesen Annahmen eine Fallzahl von n=20 für die CD8+ Zellpopulation bzw. von n=16 für die CD4+ Zellpopulation. Bei einer angenommenen dropout-Rate von 50% bis zum Ende des Vorhabens sollten nach dieser Berechnung 72 Patienten rekrutiert werden. In Anbetracht von unberücksichtigten Unwägbarkeiten wurden zusätzlich 10% mitkalkuliert. Deshalb war die Intention dieser Studie, maximal 80 Patienten einzuschließen.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der Studienpopulation

Zu Beginn waren 69 Patienten in die Studie eingeschlossen, 43 männliche und 26 weibliche. Allerdings konnte eine zweite Blutprobe, nach der Chemotherapie, nur bei 26 Probanden erfolgen. Dies hat verschiedene Gründe: 13 Menschen sind in dem Zeitraum zwischen der ersten und der zweiten Blutabnahme verstorben, ein Patient entschied sich kurzfristig gegen die Chemotherapie und einer brach die Behandlung ab. Die anderen 28 Studienteilnehmer wurden bis zum zweiten Blutabnahmezeitpunkt nicht mehr am Universitätsklinikum Augsburg weiterbetreut.

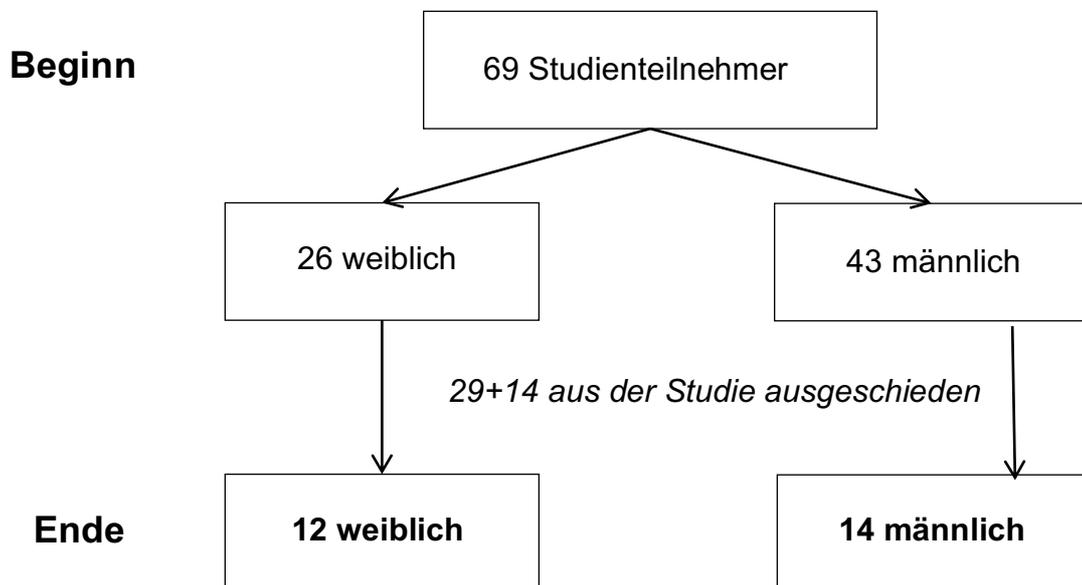


Abb. 28: Übersicht über den Verlauf der Anzahl der Studienteilnehmer
(Quelle: eigene Grafik)

Unter den 26 Probanden, die zweimal eine Blutuntersuchung erhielten, befanden sich 14 Männer und 12 Frauen zwischen 48 und 80 Jahren (der Altersmedian betrug 63 Jahre). Es waren diejenigen eingeschlossen, bei denen eine solide Tumorerkrankung diagnostiziert und dafür bisher keine antineoplastische Therapie durchgeführt wurde. Ausgeschlossen wurden Menschen mit chronischen Erkrankungen, insbesondere Hepatitis oder HIV, hereditärer oder erworbener Immundefizienz, einer Autoimmunerkrankung oder einer vorherigen anderen zytotoxischen Behandlung.

Größen		Patienten Anzahl (%)	Kontrollprobanden Anzahl (%)
<i>medianes Alter in Jahren</i>		63 (48-80)	58 (43-80)
Geschlecht	weiblich	12 (46)	6 (50)
	männlich	14 (54)	6 (50)
Histologie	NSCLC	9 (35)	
	SCLC	2 (8)	
	Darm	4 (15)	
	Pankreas	2 (8)	
	Sarkom	2 (8)	
	Andere	7 (27)	
Stadium	metastasiert	18 (69)	
	nicht-metastasiert	8 (31)	
Chemotherapie	mit Platin	20 (77)	
	ohne Platin	6 (23)	
	Carboplatin, Etoposid	5 (19)	
	FOLFIRI	3 (12)	
	Cisplatin, Pemetrexed	3 (12)	
	Carboplatin, Pemetrexed	3 (12)	
	FOLFIRINOX	2 (8)	
	FLOT	1 (4)	
	Cisplatin, 5-FU	1 (4)	
	Paclitaxel	1 (4)	
	Cisplatin, Gemcitabin	1 (4)	
	Carboplatin, Gemcitabin	1 (4)	
	Gemcitabin, Paclitaxel	1 (4)	
	Cisplatin, Vinorelbin	1 (4)	
	Cisplatin, Paclitaxel	1 (4)	
	Doxorubicin, Cyclophosphamid	1 (4)	
	Doxorubicin	1 (4)	
Ansprechen	CR	4 (15)	
	PR	7 (27)	
	SD	9 (35)	
	PD	6 (23)	
G-CSF	ja	16 (62)	
	nein	10 (38)	
Radiatio	ja	8 (31)	
	nein	18 (69)	
Infektion	ja	9 (35)	
	nein	17 (56)	

Tab. 14: Informationen zu den Patienten, deren Tumorerkrankung und zur Kontrollgruppe
(Quelle: eigene Grafik)

Bei der Mehrheit der Patienten wurde ein Lungentumor diagnostiziert, wovon neun an einem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (non-small cell lung cancer, NSCLC) und zwei an kleinzelligem Lungenkrebs (small cell lung cancer, SCLC) erkrankt sind. Darüber hinaus nahmen vier Menschen mit kolorektalem Krebs (KRK), zwei mit Pankreastumoren, zwei mit Sarkomen und sieben mit anderen Neoplasien, wie z.B. weiteren Malignomen des Gastrointestinaltrakts, der Nasennebenhöhlen, der Mamma und der Harnblase, an der Studie teil. Dabei erhielten sie eine Chemotherapie entweder mit oder ohne Platin. 18 Patienten wiesen bereits eine Metastasierung der Tumoren auf.

Als Probanden der Kontrollgruppe stellten sich 12 gesunde Mitarbeiter und deren Angehörige, sechs Frauen und sechs Männer, freiwillig zur Verfügung. Der Altersmedian betrug in dieser Gruppe 58 Jahre (zwischen 43 und 80 Jahre).

Das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie wurde nach vier bis sechs Zyklen beurteilt. 11 Patienten erreichten eine komplette oder partielle Remission ihrer Krankheit. Bei neun Studienteilnehmern stabilisierte sich der Verlauf der Tumorerkrankung und bei sechs schritt diese fort.

15 Patienten wurde G-CSF verabreicht, um das Risiko einer febrilen Neutropenie (FN) zu reduzieren. Des Weiteren haben acht Probanden eine zusätzliche Bestrahlung erhalten und neun litten unter einer Infektion während der Chemotherapie. Sowohl die spezifischen Chemotherapeutika, die verwendet wurden, als auch Informationen zu den Patienten, deren Erkrankungen und zu den gesunden Studienteilnehmern werden in Tabelle 14 gezeigt.

4.2 Lymphozytenzahlen - Patienten vs. gesunde Kontrollprobanden

Die Anzahl der analysierten Lymphozyten und deren Subpopulationen von Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe werden in den Tabellen 15 A bis C wiedergegeben. Bei den Zahlen handelt es sich um Werte pro Nanoliter und die interquartilen Abstände befinden sich in den eckigen Klammern. p-Werte <0.022 gelten als signifikant, p-Werte >0.022 als nicht signifikant (n.s.).

Wie in Tabelle 15 A dargestellt zeigen unbehandelte Tumorpatienten Chemotherapie im Vergleich mit den Kontrollprobanden bei den B-Zellen (Patienten: $76/\mu\text{l}$ vs. Kontrolle $230/\mu\text{l}$; $p=0.00$) signifikant geringere Werte. Es wurden keine deutlichen Unterschiede in der Anzahl der CD8+ T-Zellen (Patienten: $214/\mu\text{l}$ vs. Kontrolle: $275/\mu\text{l}$), der CD4+ T-Zellen (Patienten: $587/\mu\text{l}$ vs. Kontrolle: $595/\mu\text{l}$), und der NK-Zellen (Patienten: $131/\mu\text{l}$ vs. Kontrolle: $240/\mu\text{l}$) beobachtet.

Wenn die Werte der einzelnen Fraktionen bei Patienten den Ergebnissen der Kontrolle gegenübergestellt werden, zeigen die meisten B-Subpopulationen sowie verschiedene CD8+

und CD4+ T-Zell- sowie NK-Zell-Fractionen signifikant verminderte Werte bereits vor Chemotherapie: bei den B-Zellen naive (Patienten: 49/ μ l vs. Kontrolle: 115/ μ l, p=0.002), klassengewechselte (Patienten: 11/ μ l vs. Kontrolle: 30/ μ l, p=0.001), und transitorische B-Zellen (Patienten: 2/ μ l vs. Kontrolle: 6/ μ l, p=0.005); bei den CD8+ T-Zellen Effektor-Gedächtnis Zellen (Patienten: 54/ μ l vs. Kontrolle: 121/ μ l, p=0.007), EMRA (Patienten: 50/ μ l vs. Kontrolle: 140/ μ l, p=0.003), T-Lymphozyten im intermediären (Patienten: 10/ μ l vs. Kontrolle: 26/ μ l, p=0.001) und erschöpften Zustand (Patienten: 55/ μ l vs. Kontrolle: 140/ μ l, p=0.006); bei den CD4+ T-Zellen ebenfalls Effektor-Gedächtnis (Patienten: 119/ μ l vs. Kontrolle: 273/ μ l, p=0.010) und EMRA T-Lymphozyten (Patienten: 8/ μ l vs. Kontrolle: 50/ μ l, p=0.001); bei den NK-Zellen CD56+CD16+ (Patienten: 36/ μ l vs. Kontrolle: 160/ μ l, p=0.000), CD56bright CD16dim (Patienten: 3/ μ l vs. Kontrolle: 14/ μ l, p=0.000), CD56dim CD16bright (Patienten: 4/ μ l vs. Kontrolle: 19/ μ l, p=0.020).

Signifikante erhöhte Ergebnisse bei Gegenüberstellung zu den gesunden Probanden lassen sich dagegen bei CD8+ zentralen Gedächtnis (Patienten: 28/ μ l vs. Kontrolle: 4/ μ l, p=0.000), CD8+ naiven (43/ μ l vs. Kontrolle: 5/ μ l, p=0.001) und aktivierten CD8+ HLA-DR+ (Patienten: 66/ μ l vs. Kontrolle: 7/ μ l, p=0.000) erkennen. Auch bei CD4+ T-Zellen weisen zentrale Gedächtnis (Patienten: 220/ μ l vs. Kontrolle: 79/ μ l, p=0.007), aktivierte HLA-DR+ (Patienten: 58/ μ l vs. Kontrolle: 18/ μ l, p=0.001) und regulatorische CD25+ (Patienten: 8/ μ l vs. Kontrolle: 3/ μ l, p=0.000) erhöhte Werte auf.

	Patienten vor Chemotherapie	Patienten nach Chemotherapie	p-Wert	gesunde Kontrollgruppe	p-Wert (P vs. K)
B-Zellen					
naiv	0.076 [0.039; 0.160]	0.049 [0.024; 0.106]	0.001	0.230 [0.173; 0.270]	0.000
Gedächtnis	0.049 [0.021; 0.111]	0.025 [0.013; 0.056]	0.001	0.115 [0.087; 0.189]	0.002
klassengew.	0.003 [0.002; 0.008]	0.002 [0.000; 0.004]	0.001	0.005 [0.004; 0.065]	n.s.
transitorisch	0.011 [0.006; 0.020]	0.006 [0.003; 0.012]	0.011	0.030 [0.023; 0.042]	0.001
	0.002 [0.000; 0.005]	0.000 [0.000; 0.002]	n.s.	0.006 [0.003; 0.006]	0.005

Tab. 15 A: Veränderungen der B-Lymphozyten während Chemotherapie
(P = Patienten, K = Kontrolle; klassengew. = klassengewechselt)
(Quelle: eigene Grafik)

	Patienten vor Chemotherapie	Patienten nach Chemotherapie	p-Wert	gesunde Kontrollgruppe	p-Wert (P vs. K)
CD8+ T-Zellen	0.214 [0.122; 0.374]	0.233 [0.120; 0.319]	n.s.	0.275 [0.212; 0.415]	n.s.
CD4+CD8+	0.005 [0.002; 0.013]	0.003 [0.002; 0.012]	n.s.	0.006 [0.001; 0.009]	n.s.
Gedächtnis zentr. Ged.	0.059 [0.040; 0.126]	0.086 [0.034; 0.128]	n.s.	0.101 [0.051; 0.137]	n.s.
naiv	0.028 [0.015; 0.062]	0.025 [0.016; 0.048]	n.s.	0.004 [0.002; 0.014]	0.000
Eff.-Ged.	0.043 [0.017; 0.091]	0.034 [0.016; 0.066]	n.s.	0.005 [0.002; 0.015]	0.001
EMRA	0.054 [0.037; 0.110]	0.067 [0.030; 0.119]	n.s.	0.121 [0.074; 0.172]	0.007
früh	0.050 [0.023; 0.110]	0.068 [0.031; 0.120]	n.s.	0.140 [0.106; 0.187]	0.003
intermediär	0.082 [0.048; 0.168]	0.078 [0.052; 0.174]	n.s.	0.176 [0.087; 0.262]	n.s.
spät	0.010 [0.006; 0.185]	0.014 [0.008; 0.030]	n.s.	0.026 [0.013; 0.045]	0.001
erschöpft	0.044 [0.024; 0.117]	0.054 [0.024; 0.126]	n.s.	0.081 [0.033; 0.151]	n.s.
term. Effektor	0.055 [0.034; 0.107]	0.068 [0.036; 0.118]	n.s.	0.140 [0.078; 0.266]	0.006
HLA-DR+	0.033 [0.021; 0.114]	0.037 [0.015; 0.101]	n.s.	0.026 [0.013; 0.092]	n.s.
CD69+	0.066 [0.031; 0.131]	0.076 [0.032; 0.153]	n.s.	0.007 [0.003; 0.025]	0.000
Tregs	0.037 [0.018; 0.065]	0.043 [0.022; 0.773]	n.s.	0.054 [0.036; 0.070]	n.s.
CD25+	0.000 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.002]	n.s.	0.000 [0.000; 0.001]	n.s.
CD25+	0.001 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	n.s.	0.000 [0.000; 0.001]	n.s.

	Patienten vor Chemotherapie	Patienten nach Chemotherapie	p-Wert	gesunde Kontrollgruppe	p-Wert (P vs. K)
CD4+ T-Zellen	0.587 [0.367; 0.802]	0.443 [0.236; 0.679]	n.s.	0.595 [0.442; 1.128]	n.s.
Gedächtnis zentr. Ged.	0.317 [0.226; 0.547]	0.301 [0.157; 0.376]	n.s.	0.333 [0.258; 0.512]	n.s.
naive	0.220 [0.141; 0.331]	0.178 [0.103; 0.270]	n.s.	0.079 [0.061; 0.193]	0.007
Eff.-Ged.	0.193 [0.065; 0.330]	0.104 [0.035; 0.272]	n.s.	0.216 [0.106; 0.365]	n.s.
EMRA	0.119 [0.068; 0.203]	0.099 [0.068; 0.198]	n.s.	0.273 [0.200; 0.385]	0.010
HLA-DR+	0.008 [0.002; 0.020]	0.005 [0.002; 0.016]	n.s.	0.050 [0.036; 0.088]	0.001
CD69+	0.058 [0.043; 0.082]	0.046 [0.037; 0.085]	n.s.	0.018 [0.008; 0.030]	0.001
Th1	0.049 [0.027; 0.117]	0.035 [0.021; 0.071]	n.s.	0.034 [0.020; 0.039]	n.s.
Th2	0.042 [0.018; 0.069]	0.030 [0.012; 0.060]	n.s.	0.025 [0.011; 0.063]	n.s.
Th17	0.049 [0.025; 0.091]	0.042 [0.023; 0.076]	n.s.	0.040 [0.023; 0.071]	n.s.
Tregs	0.033 [0.020; 0.054]	0.031 [0.021; 0.050]	n.s.	0.049 [0.034; 0.071]	n.s.
CD25+	0.027 [0.015; 0.047]	0.012 [0.010; 0.033]	n.s.	0.017 [0.011; 0.026]	n.s.
CD25+	0.008 [0.005; 0.014]	0.009 [0.004; 0.014]	n.s.	0.003 [0.001; 0.003]	0.000
CD4/CD8	2.403 [1.685; 3.842]	1.824 [1.328; 3.482]	n.s.	2.276 [1.641; 3.390]	n.s.

Tab. 15 B: Veränderungen der T-Lymphozyten während Chemotherapie
(P = Patienten, K = Kontrolle; zentr. = zentral; Ged. = Gedächtnis; Eff. = Effektor; term. = terminal)
(Quelle: eigene Grafik)

	Patienten vor Chemotherapie	Patienten nach Chemotherapie	p-Wert	gesunde Kontrollgruppe	p-Wert (P vs. K)
NK-Zellen	0.131 [0.093; 0.240]	0.131 [0.073; 0.232]	n.s.	0.240 [0.153; 0.463]	n.s.
CD56+CD16+	0.036 [0.017; 0.083]	0.043 [0.012; 0.072]	n.s.	0.160 [0.108; 0.255]	0.000
CD56 ^{bright} CD16 ^{dim}	0.003 [0.001; 0.007]	0.003 [0.001; 0.006]	n.s.	0.014 [0.008; 0.027]	0.000
CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}	0.004 [0.002; 0.018]	0.006 [0.002; 0.010]	n.s.	0.019 [0.015; 0.026]	0.020
NKT	0.046 [0.025; 0.098]	0.053 [0.021; 0.083]	n.s.	0.005 [0.020; 0.135]	n.s.

Tab. 15 C: Veränderungen der NK-Lymphozyten und NKT während Chemotherapie
(P = Patienten, K = Kontrolle)
(Quelle: eigene Grafik)

4.3 Einfluss der Chemotherapie auf Lymphozyten der Tumorpatienten

Nach dem Vergleich der Lymphozytenzahlen zwischen Tumorpatienten und gesunden Kontrollprobanden wurden die Veränderungen von B-, T- und NK-Lymphozyten vor und nach Chemotherapie analysiert. Die Boxplots in den Abbildungen 29 bis 33 visualisieren jeweils die Ergebnisse, die Tabellen 16 A bis C zeigen die Werte.

4.3.1 B-Lymphozyten und deren Subpopulationen

Während des Zeitraumes der Chemotherapie verringerten sich die B-Lymphozyten signifikant von 76/ μ l auf 49/ μ l ($p=0.001$). Die Abnahme der B-Zellen nach Chemotherapie wurde auch in deren Fraktionen sichtbar: Es ergaben sich kleinere Zahlenwerte der naiven (vor Chemotherapie: 49/ μ l vs. nach Chemotherapie: 25/ μ l; $p=0.001$), Gedächtnis- (vor Chemotherapie: 3/ μ l vs. nach Chemotherapie: 2/ μ l; $p=0.001$) und klassengewechselten B-Zellen (vor Chemotherapie: 11/ μ l vs. nach Chemotherapie: 6/ μ l; $p=0.011$). Nur die transitorischen B-Lymphozyten wurden nicht reduziert.

Tabelle 16 A und Abbildungen 29 bis 33 stellen diese Veränderungen sowohl statisch als auch visuell dar.

	Patienten vor Chemotherapie	Patienten nach Chemotherapie	p-Wert	gesunde Kontrollgruppe	p-Wert (P vs. K)
B-Zellen					
naiv	0.076 [0.039; 0.160]	0.049 [0.024; 0.106]	0.001	0.230 [0.173; 0.270]	0.000
Gedächtnis	0.049 [0.021; 0.111]	0.025 [0.013; 0.056]	0.001	0.115 [0.087; 0.189]	0.002
klassengew.	0.003 [0.002; 0.008]	0.002 [0.000; 0.004]	0.001	0.005 [0.004; 0.065]	n.s.
transitorisch	0.011 [0.006; 0.020]	0.006 [0.003; 0.012]	0.011	0.030 [0.023; 0.042]	0.001
	0.002 [0.000; 0.005]	0.000 [0.000; 0.002]	n.s.	0.006 [0.003; 0.006]	0.005

Tab. 16 A: Veränderungen der B-Zell-Subpopulationen während Chemotherapie
(P = Patienten, K = Kontrolle; klassengew. = klassengewechselt)
(Quelle: eigene Grafik)

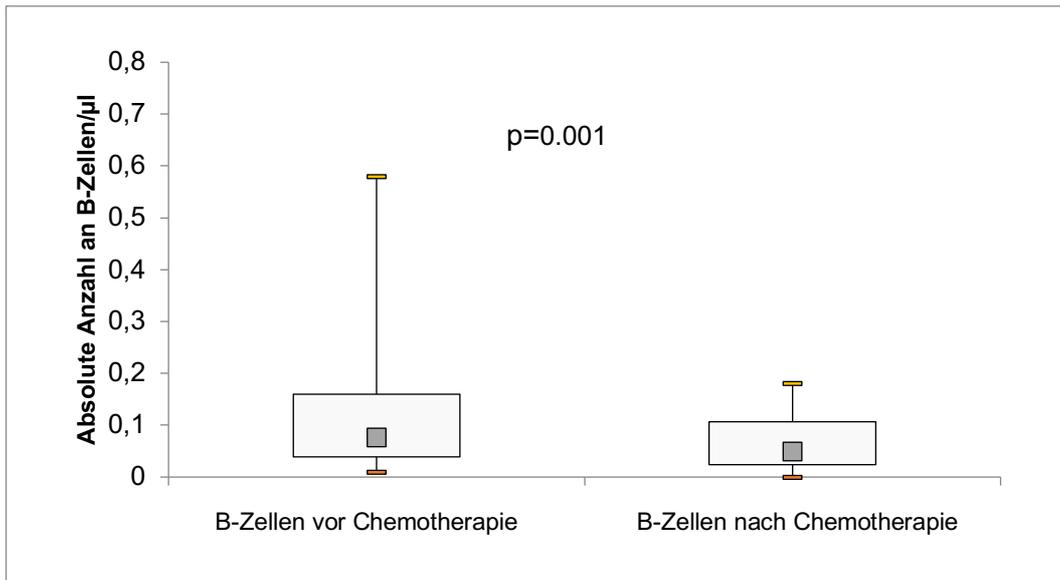


Abb. 29: Veränderung der B-Lymphozyten während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

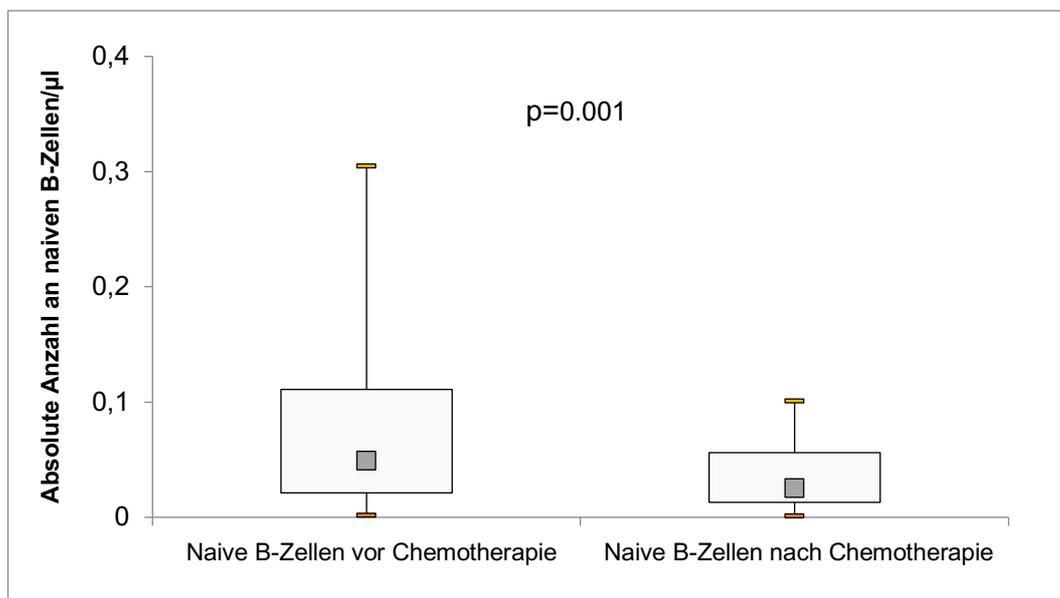


Abb. 30: Veränderung der naiven B-Lymphozyten während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

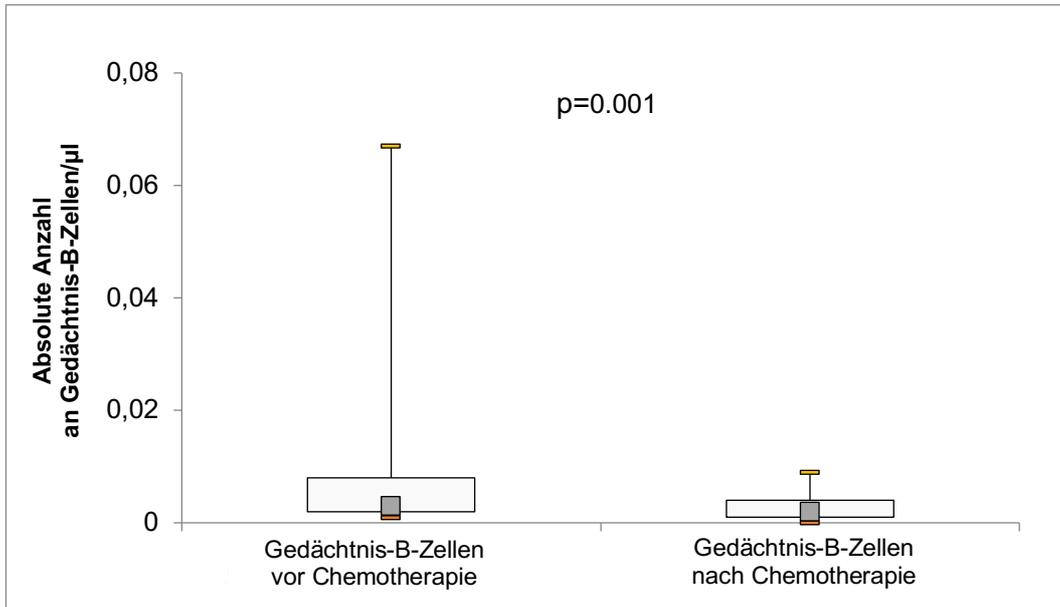


Abb. 31: Veränderung der Gedächtnis-B-Lymphozyten während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

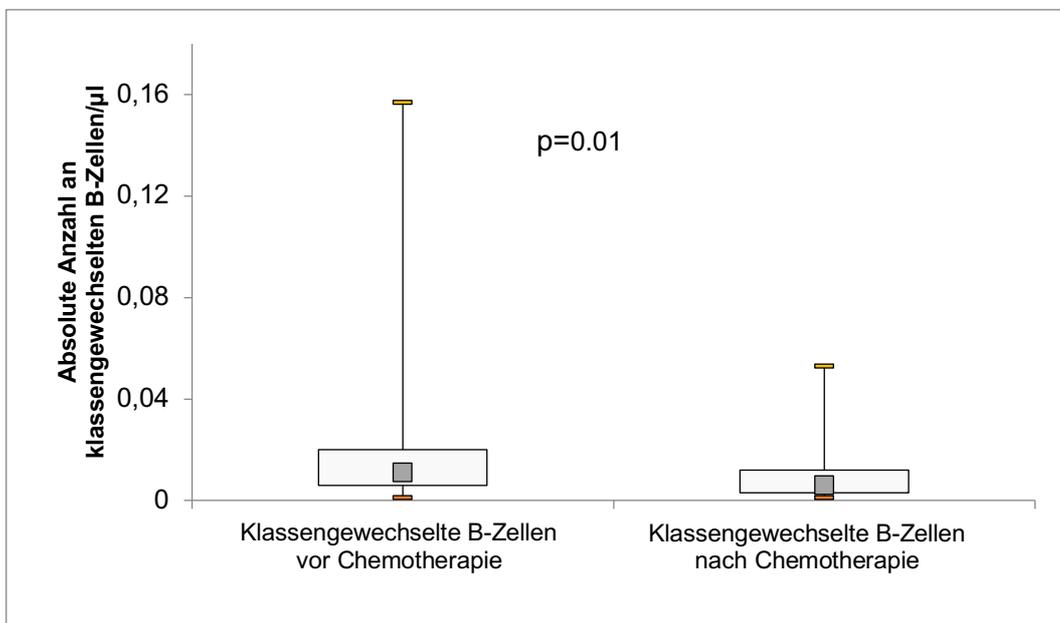


Abb. 32: Veränderung der klassengewechselten B-Lymphozyten während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

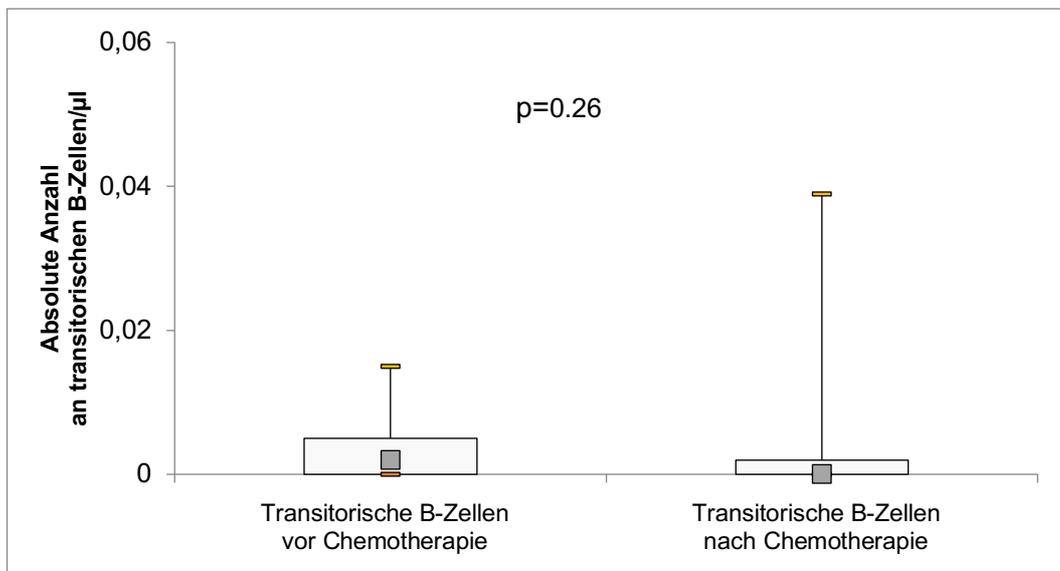


Abb. 33: Veränderung der transitorischen B-Lymphozyten während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

4.3.2 T-Lymphozyten und deren Subpopulationen

Im Gegensatz zu den B-Zellen wurden die Anzahl an CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten und an CD4+ CD8+ Lymphozyten sowie das CD4/CD8 Verhältnis durch Chemotherapie nicht beeinflusst (CD8+ Zellen: 214/µl vs. 233/µl; CD4+ Zellen: 587/µl vs. 443/µl).

Wie die T-Zellen selbst ließen sich keine signifikanten Unterschiede bei ihren jeweiligen Subpopulationen vor und nach Chemotherapie erkennen.

	Patienten vor Chemotherapie	Patienten nach Chemotherapie	p-Wert	gesunde Kontrollgruppe	p-Wert (P vs. K)
CD8+ T-Zellen	0.214 [0.122; 0.374]	0.233 [0.120; 0.319]	n.s.	0.275 [0.212; 0.415]	n.s.
CD4+CD8+	0.005 [0.002; 0.013]	0.003 [0.002; 0.012]	n.s.	0.006 [0.001; 0.009]	n.s.
Gedächtnis	0.059 [0.040; 0.126]	0.086 [0.034; 0.128]	n.s.	0.101 [0.051; 0.137]	n.s.
zentr. Ged.	0.028 [0.015; 0.062]	0.025 [0.016; 0.048]	n.s.	0.004 [0.002; 0.014]	0.000
naiv	0.043 [0.017; 0.091]	0.034 [0.016; 0.066]	n.s.	0.005 [0.002; 0.015]	0.001
Eff.-Ged.	0.054 [0.037; 0.110]	0.067 [0.030; 0.119]	n.s.	0.121 [0.074; 0.172]	0.007
EMRA	0.050 [0.023; 0.110]	0.068 [0.031; 0.120]	n.s.	0.140 [0.106; 0.187]	0.003
früh	0.082 [0.048; 0.168]	0.078 [0.052; 0.174]	n.s.	0.176 [0.087; 0.262]	n.s.
intermediär	0.010 [0.006; 0.185]	0.014 [0.008; 0.030]	n.s.	0.026 [0.013; 0.045]	0.001
spät	0.044 [0.024; 0.117]	0.054 [0.024; 0.126]	n.s.	0.081 [0.033; 0.151]	n.s.
erschöpft	0.055 [0.034; 0.107]	0.068 [0.036; 0.118]	n.s.	0.140 [0.078; 0.266]	0.006
term. Eff.	0.033 [0.021; 0.114]	0.037 [0.015; 0.101]	n.s.	0.026 [0.013; 0.092]	n.s.
HLA-DR+	0.066 [0.031; 0.131]	0.076 [0.032; 0.153]	n.s.	0.007 [0.003; 0.025]	0.000
CD69+	0.037 [0.018; 0.065]	0.043 [0.022; 0.773]	n.s.	0.054 [0.036; 0.070]	n.s.
Tregs	0.000 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.002]	n.s.	0.000 [0.000; 0.001]	n.s.
CD25+	0.001 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	n.s.	0.000 [0.000; 0.001]	n.s.

	Patienten vor Chemotherapie	Patienten nach Chemotherapie	p-Wert	gesunde Kontrollgruppe	p-Wert (P vs. K)
CD4+ T-Zellen	0.587 [0.367; 0.802]	0.443 [0.236; 0.679]	n.s.	0.595 [0.442; 1.128]	n.s.
Gedächtnis	0.317 [0.226; 0.547]	0.301 [0.157; 0.376]	n.s.	0.333 [0.258; 0.512]	n.s.
zentr. Ged.	0.220 [0.141; 0.331]	0.178 [0.103; 0.270]	n.s.	0.079 [0.061; 0.193]	0.007
naive	0.193 [0.065; 0.330]	0.104 [0.035; 0.272]	n.s.	0.216 [0.106; 0.365]	n.s.
Eff.-Ged.	0.119 [0.068; 0.203]	0.099 [0.068; 0.198]	n.s.	0.273 [0.200; 0.385]	0.010
EMRA	0.008 [0.002; 0.020]	0.005 [0.002; 0.016]	n.s.	0.050 [0.036; 0.088]	0.001
HLA-DR+	0.058 [0.043; 0.082]	0.046 [0.037; 0.085]	n.s.	0.018 [0.008; 0.030]	0.001
CD69+	0.049 [0.027; 0.117]	0.035 [0.021; 0.071]	n.s.	0.034 [0.020; 0.039]	n.s.
Th1	0.042 [0.018; 0.069]	0.030 [0.012; 0.060]	n.s.	0.025 [0.011; 0.063]	n.s.
Th2	0.049 [0.025; 0.091]	0.042 [0.023; 0.076]	n.s.	0.040 [0.023; 0.071]	n.s.
Th17	0.033 [0.020; 0.054]	0.031 [0.021; 0.050]	n.s.	0.049 [0.034; 0.071]	n.s.
Tregs	0.027 [0.015; 0.047]	0.012 [0.010; 0.033]	n.s.	0.017 [0.011; 0.026]	n.s.
CD25+	0.008 [0.005; 0.014]	0.009 [0.004; 0.014]	n.s.	0.003 [0.001; 0.003]	0.000
CD4/CD8	2.403 [1.685; 3.842]	1.824 [1.328; 3.482]	n.s.	2.276 [1.641; 3.390]	n.s.

Tab. 16 B1 und B2: Veränderungen der T-Zell-Subpopulationen während Chemotherapie (P = Patienten, K = Kontrolle; zentr. = zentral; Ged. = Gedächtnis; Eff. = Effektor; term. = terminal) (Quelle: eigene Grafik)

Tabellen 16 B1 und B2 sowie die Abbildungen 34 und 35 zeigen die Ergebnisse.

Auch für NK-ähnliche T-Zellen wurden keine signifikanten Veränderungen durch Chemotherapie sichtbar. Dies wird in Tabelle 16 C dargestellt.

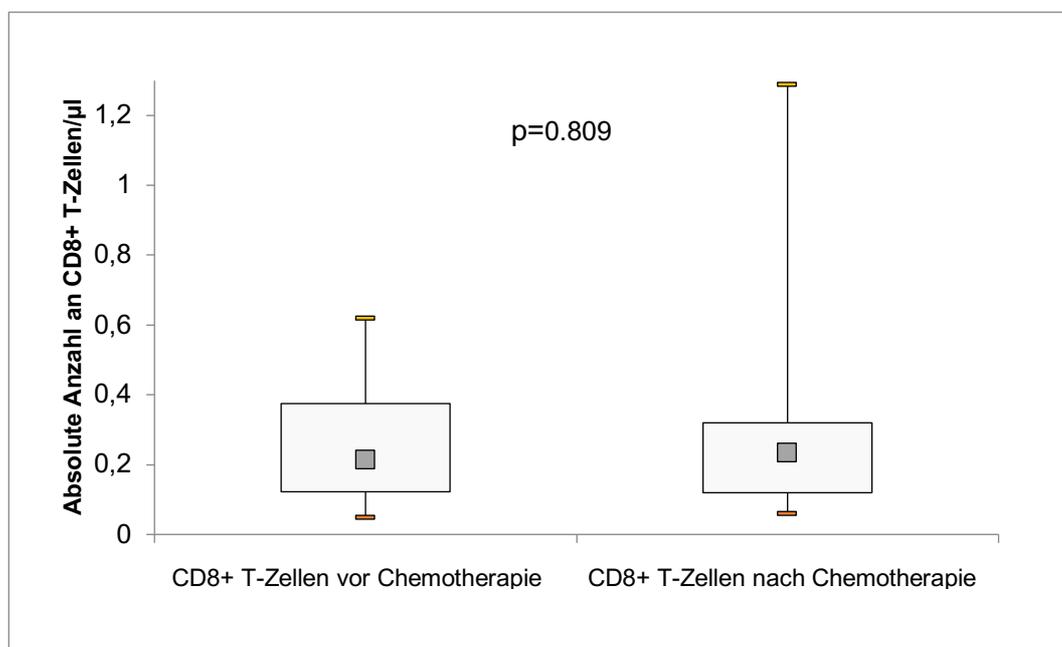


Abb. 34: Veränderung der CD8+ T-Lymphozyten während Chemotherapie (Quelle: eigene Grafik)

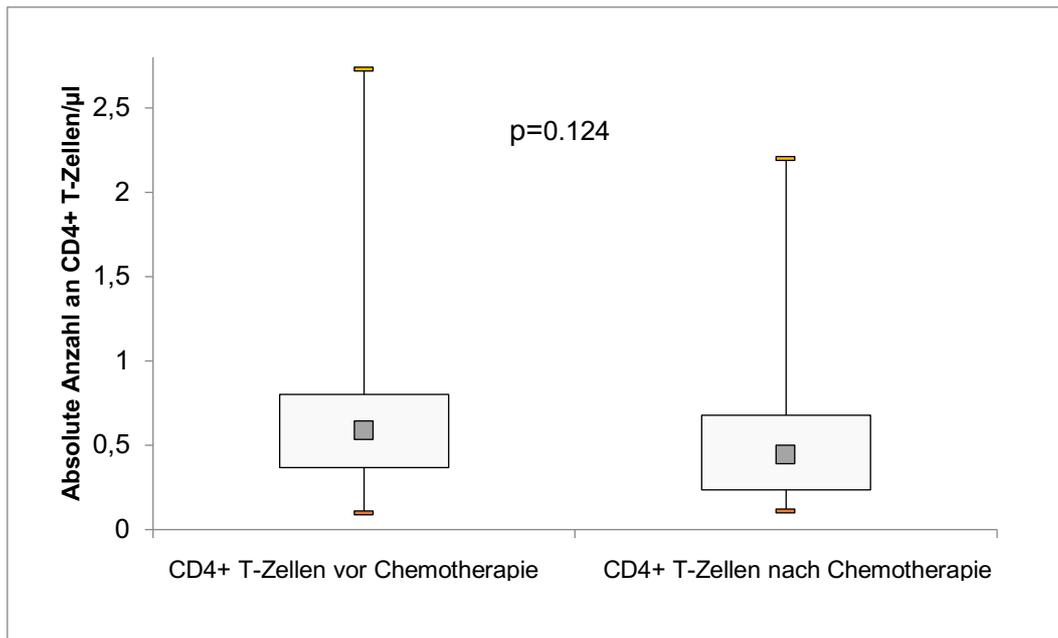


Abb. 35: Veränderung der CD4+ T-Lymphozyten während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

4.3.3 NK-Lymphozyten und deren Subpopulationen

Analog zu den T-Zellen blieben auch die NK-Lymphozyten vor und nach Chemotherapie konstant (131/µl vs. 131/µl). Wie die gesamte Anzahl an NK-Zellen ließen sich keine signifikanten Unterschiede bei ihren jeweiligen Subpopulationen vor und nach Chemotherapie auswerten (siehe Tabelle 16 C und Abbildung 36).

	Patienten vor Chemotherapie	Patienten nach Chemotherapie	p-Wert	gesunde Kontrollgruppe	p-Wert (P vs. K)
NK-Zellen	0.131 [0.093; 0.240]	0.131 [0.073; 0.232]	n.s.	0.240 [0.153; 0.463]	n.s.
CD56+CD16+	0.036 [0.017; 0.083]	0.043 [0.012; 0.072]	n.s.	0.160 [0.108; 0.255]	0.000
CD56 ^{bright} CD16 ^{dim}	0.003 [0.001; 0.007]	0.003 [0.001; 0.006]	n.s.	0.014 [0.008; 0.027]	0.000
CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}	0.004 [0.002; 0.018]	0.006 [0.002; 0.010]	n.s.	0.019 [0.015; 0.026]	0.020
NKT	0.046 [0.025; 0.098]	0.053 [0.021; 0.083]	n.s.	0.005 [0.020; 0.135]	n.s.

Tab. 16 C: Veränderungen der NK-Zell-Subpopulationen während Chemotherapie
(P = Patienten, K = Kontrolle)
(Quelle: eigene Grafik)

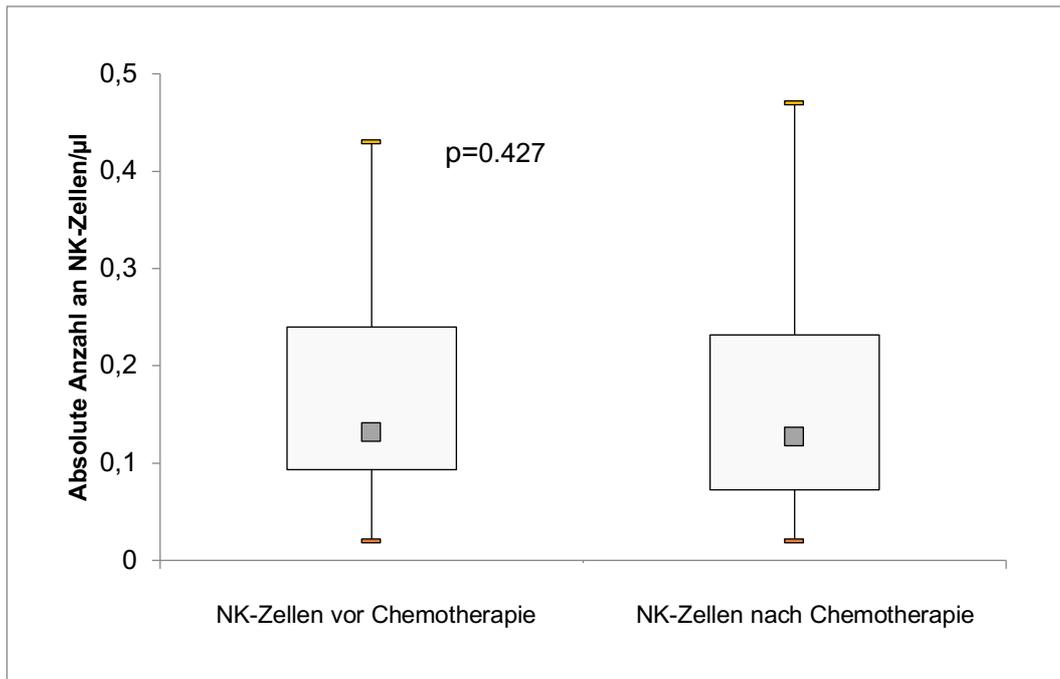


Abb. 36: Veränderungen der NK-Lymphozyten während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

4.4 Endogene und exogene Effekte auf Lymphozyten der Patienten

Neben dem Einfluss der Chemotherapie wurde auch untersucht, welche additiven Faktoren auf die Anzahl der B-, T- und NK-Zellen wirken. Dabei wurde zwischen Parametern, die die Tumorpatienten selbst betreffen, und denen, die von extern hinzukommen, unterschieden.

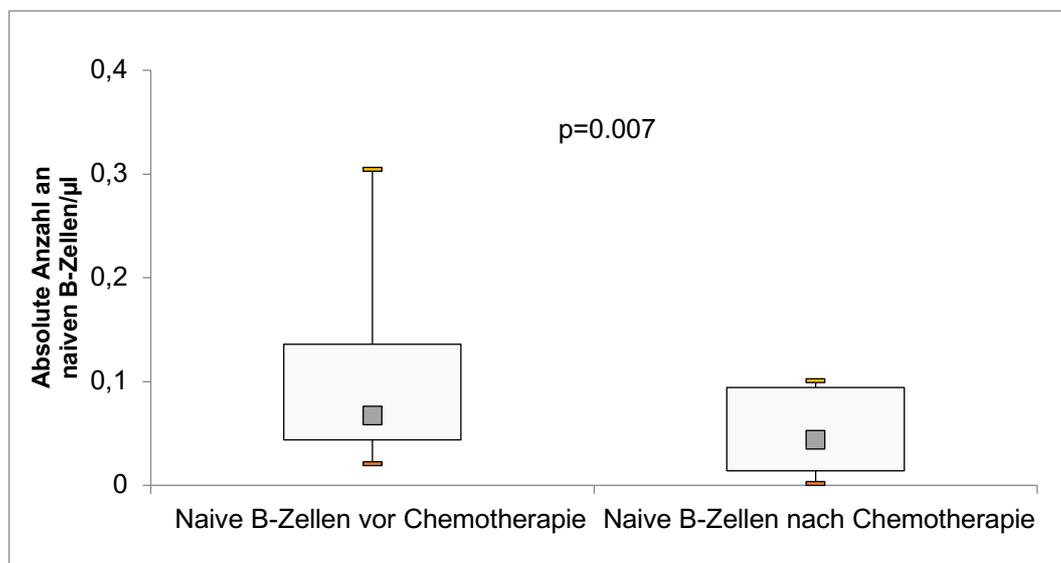
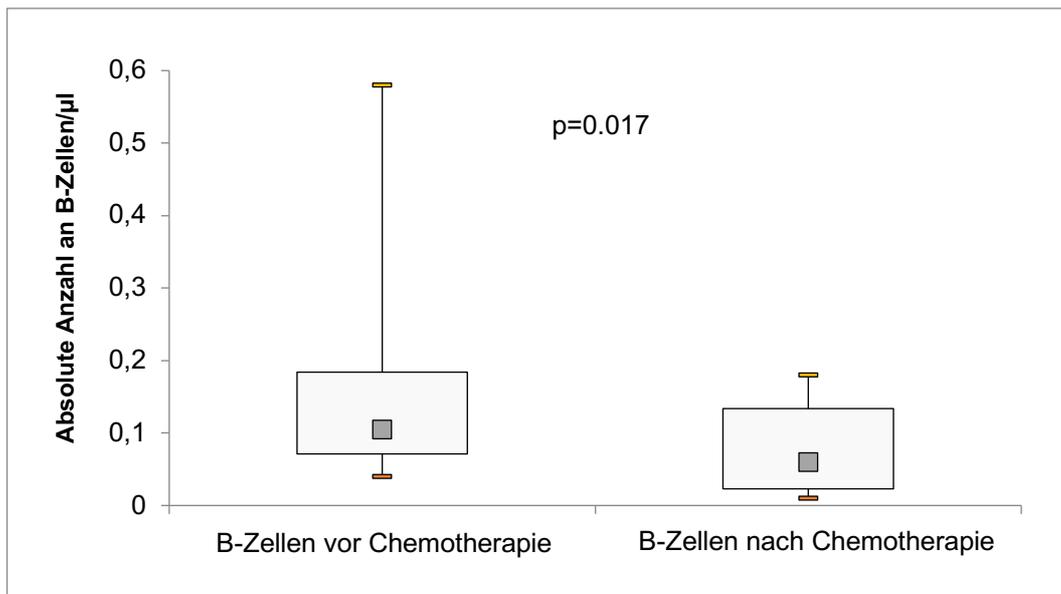
4.4.1 Patienteneigene Faktoren

Bei den endogenen Einflüssen auf die verschiedenen Lymphozyten wurden das Geschlecht, infektiologische Geschehen während der Chemotherapie und das klinische Ansprechen der Patienten auf eine zytostatische Behandlung betrachtet.

4.4.1.1 Die Rolle des Geschlechts

Zwischen männlichen und weiblichen Patienten ergaben sich Unterschiede bei den B-Lymphozyten. Während bei Männern die B-Zell-Subpopulationen nicht signifikant vermindert wurden, führte die Chemotherapie bei Frauen zu einem Abfall der gesamten B-Zellpopulation (105/µl vs. 60/µl; $p=0.017$), der naiven (67/µl vs. 44/µl; $p=0.007$) und der Gedächtnis B-Lymphozyten (6/µl vs. 3/µl; $p=0.005$).

Tabelle 1 im Anhang gibt einen Überblick über alle signifikanten Ergebnisse bei den B-Zellen. Abbildung 37 stellt den Zusammenhang der B-Zell-Veränderungen bei Frauen dar. Bei den T-Zellen und NK-Zellen zeigten sich im Hinblick auf das Geschlecht keine signifikanten Veränderungen.



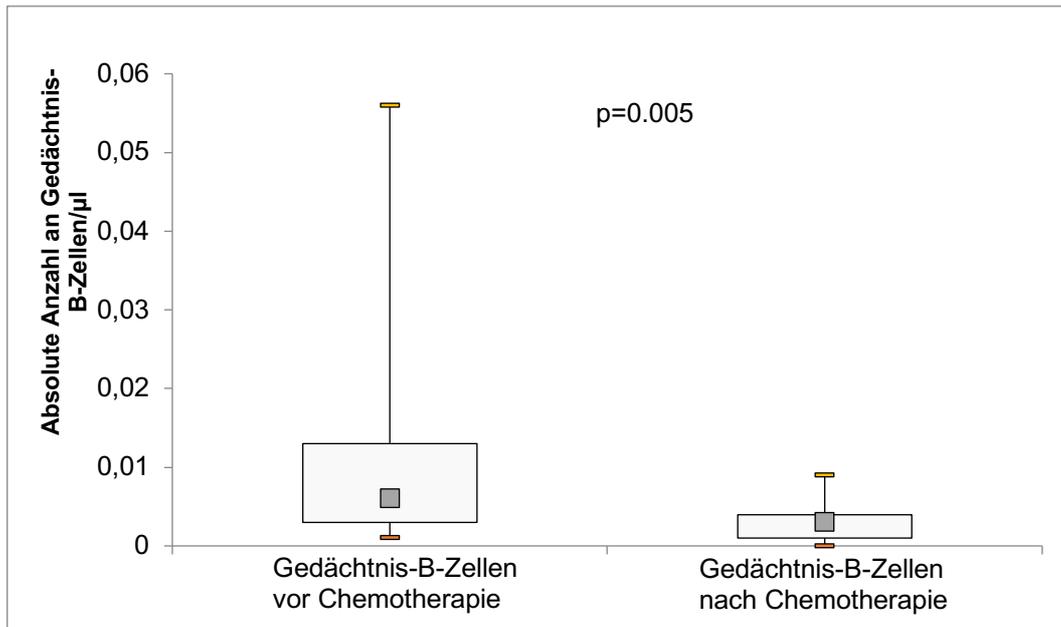
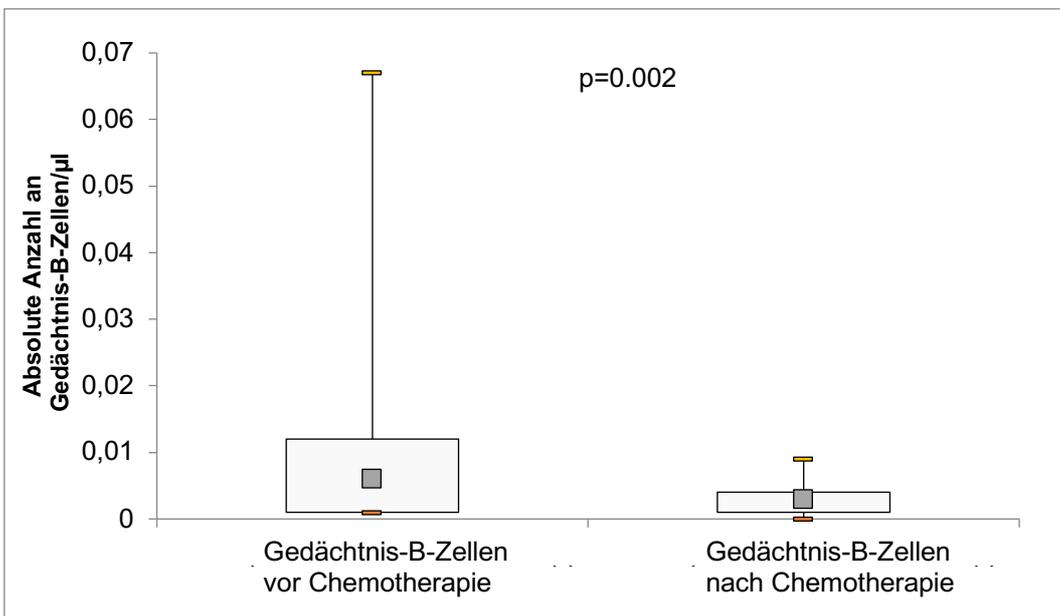
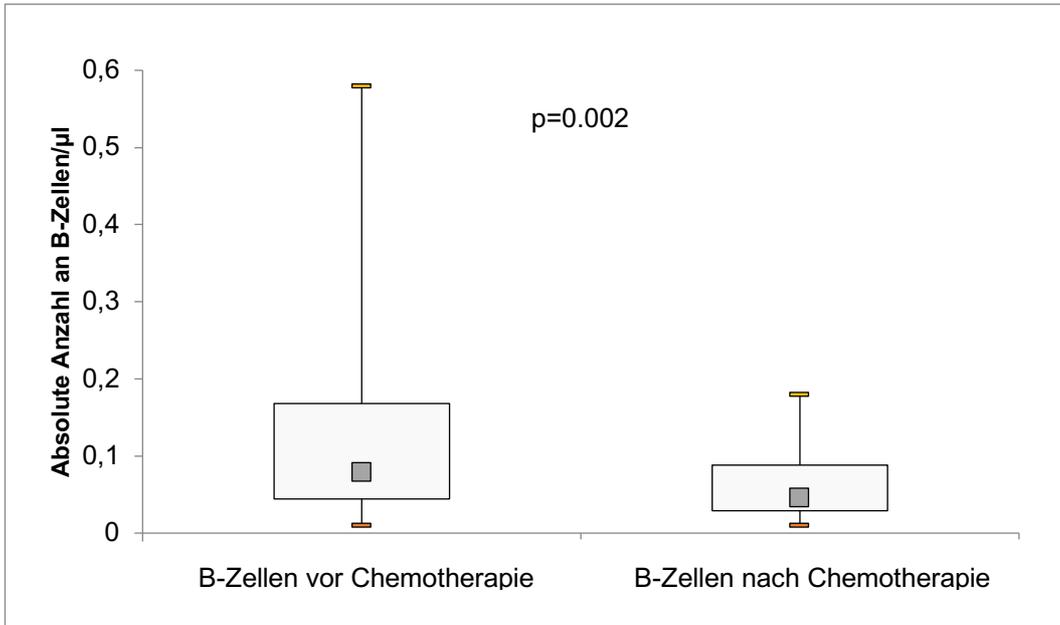


Abb. 37: Veränderungen der B-Zellen bei Frauen während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

4.4.1.2 Infektionen während Chemotherapie

Während Patienten mit einer Infektion während der Chemotherapie keine deutliche Abnahme der B-Lymphozyten zeigten, war bei denjenigen ohne infektiöse Komplikationen die Anzahl der B-Lymphozyten (79/µl vs. 46/µl; p=0.002), der naiven (45/µl vs. 23/µl; p=0.001), Gedächtnis- (6/µl vs. 3/µl; p=0.002) und der klassengewechselten (15/µl vs. 6/µl; p=0.009) B-Zellen nach Chemotherapie weniger.

Im Hinblick auf Infektionen ließen sich bei den T- und NK-Zellen keine signifikanten Veränderungen erkennen.



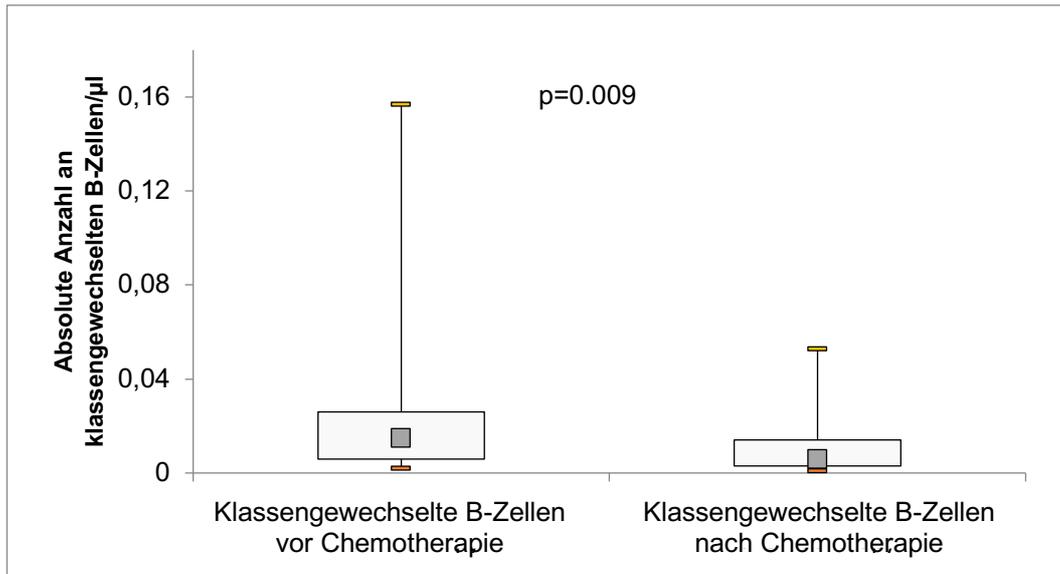
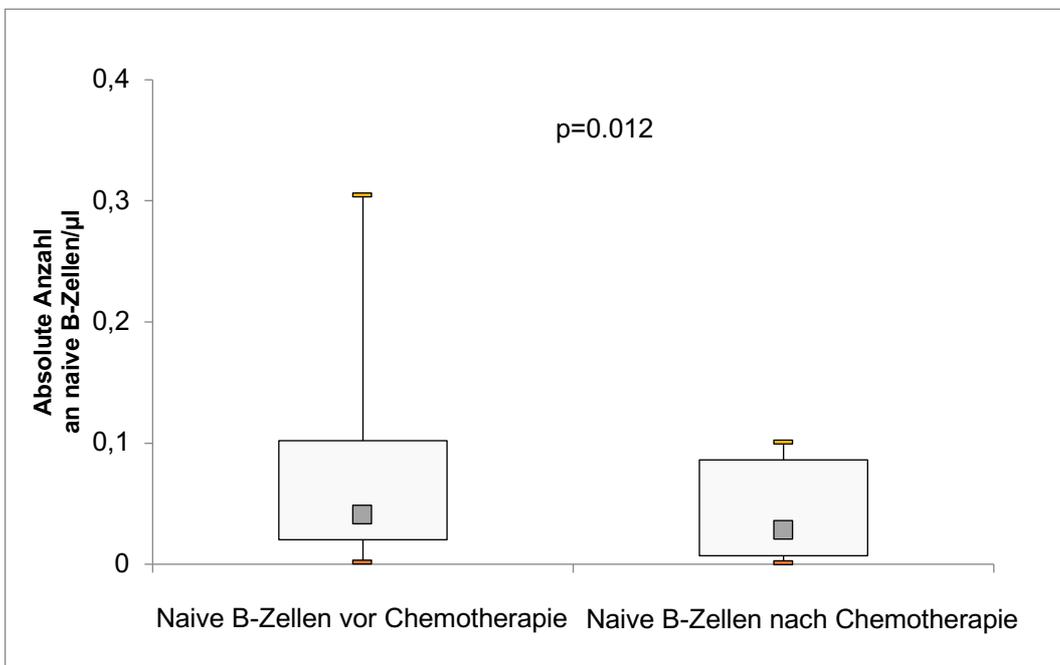
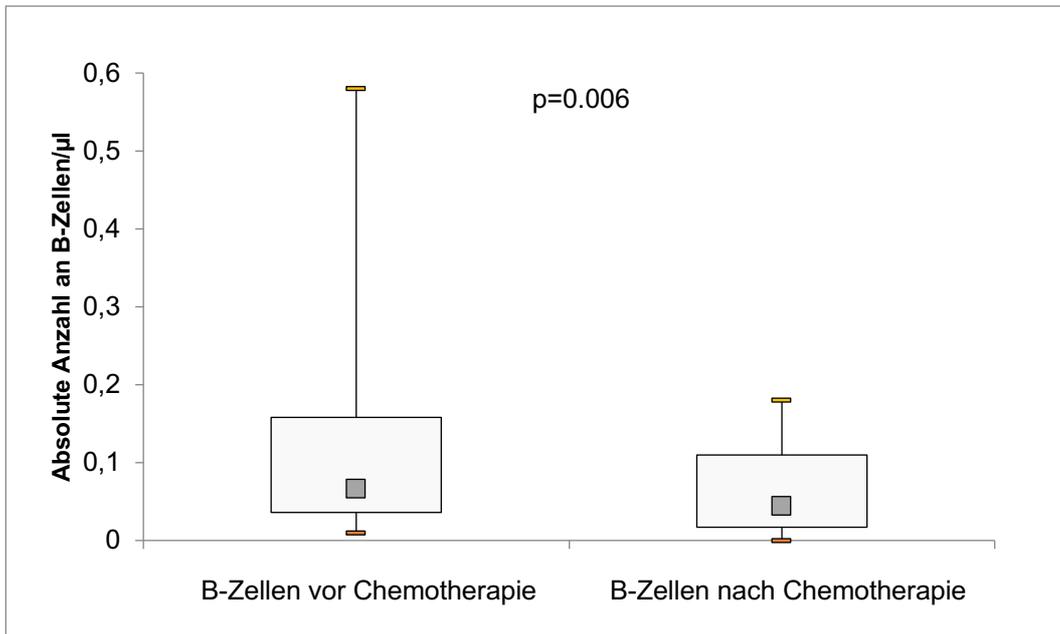


Abb. 38: Veränderungen der B-Zellen bei infektionsfreier Zeit während Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

4.4.1.3 Verlauf der Erkrankung

Bei Studienteilnehmern, die mindestens eine partielle Remission ihrer Krankheit erfuhren, kam es zu keinen Veränderungen der einzelnen B-Zell-Fractionen. Probanden mit einer stabilen oder fortschreitenden Erkrankung dagegen ließen in der Auswertung einen signifikanten Rückgang sowohl der B-Lymphozyten selbst (66/µl vs. 44/µl; $p=0.006$) als auch der naiven (41/µl vs. 28/µl; $p=0.012$), Gedächtnis- (3/µl vs. 1/µl; $p=0.005$) und klassengewechselten (8/µl vs. 4/µl; $p=0.012$) B-Zellen erkennen.

Des Weiteren ließ die Ansprechrate keine Assoziation zu signifikanten Veränderungen der T-Zell- und NK-Zell-Subpopulationen zu. Eine Ausnahme stellt die Abnahme der regulatorischen CD4+ T-Zellen (28/µl vs. 12/µl; $p=0.001$) bei Patienten mit stabiler oder progressiver Erkrankung dar.



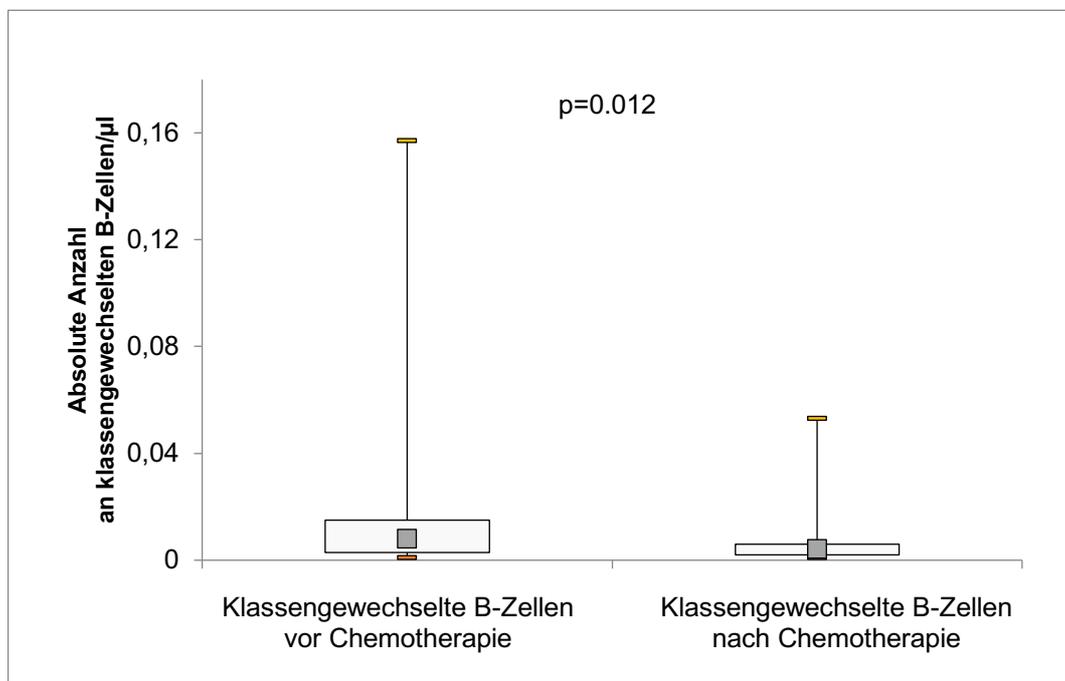


Abb. 39: Veränderungen der B-Zellen bei stabiler (SD) und progressiver Erkrankung (PD)
(Quelle: eigene Grafik)

4.4.2 Therapiebedingte Faktoren

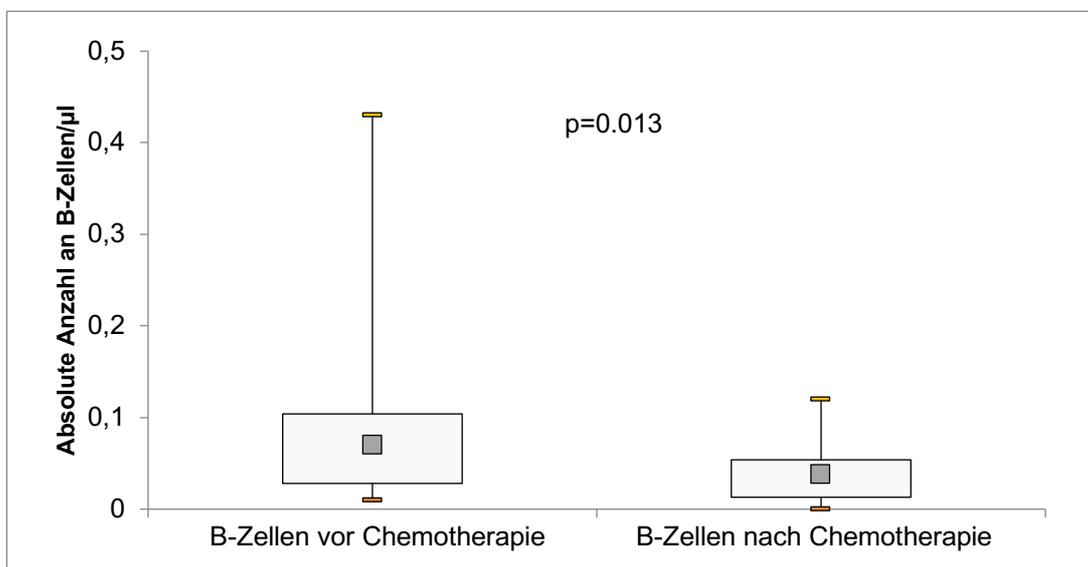
Neben den betrachteten endogenen Wirkungen wurden auch exogene Faktoren wie der Einsatz von G-CSF und Strahlentherapie sowie des Chemotherapeutikums Platin bei der Analyse der Anzahl von B-, T- und NK-Lymphozyten im Zeitraum von 12 Wochen miteingeschlossen.

4.4.2.1 Substitution von G-CSF

Eine Anwendung von G-CSF hatte grundsätzlich keinen Einfluss auf die Anzahl der Lymphozyten. Egal ob mit oder ohne G-CSF wurden naive (mit G-CSF: 41/ μ l vs. 21/ μ l; $p=0.019$ // ohne G-CSF: 84/ μ l vs. 53/ μ l; $p=0.017$) und Gedächtnis-B-Zellen (G-CSF: 3/ μ l vs. 2/ μ l; $p=0.019$ // ohne G-CSF: 6/ μ l vs. 4/ μ l; $p=0.013$) ähnlich verringert.

Daneben zeigten klassengewechselte und transitorische B-Lymphozyten mit oder ohne G-CSF keine Veränderung. Nur die Gesamtzahl an B-Zellen wurde bei Einsatz von G-CSF kleiner (70/ μ l vs. 38/ μ l; $p=0.013$). Abbildung 38 stellt die Differenzen unter G-CSF dar.

Auf die Anzahl von T- und NK-Zellen erzeugte die Gabe von G-CSF keinen signifikanten Effekt.



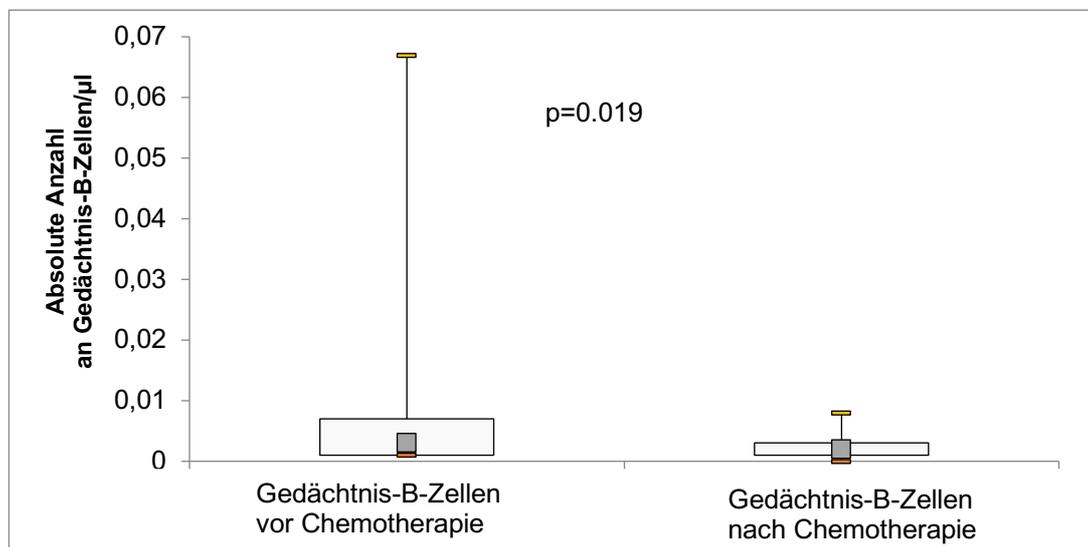
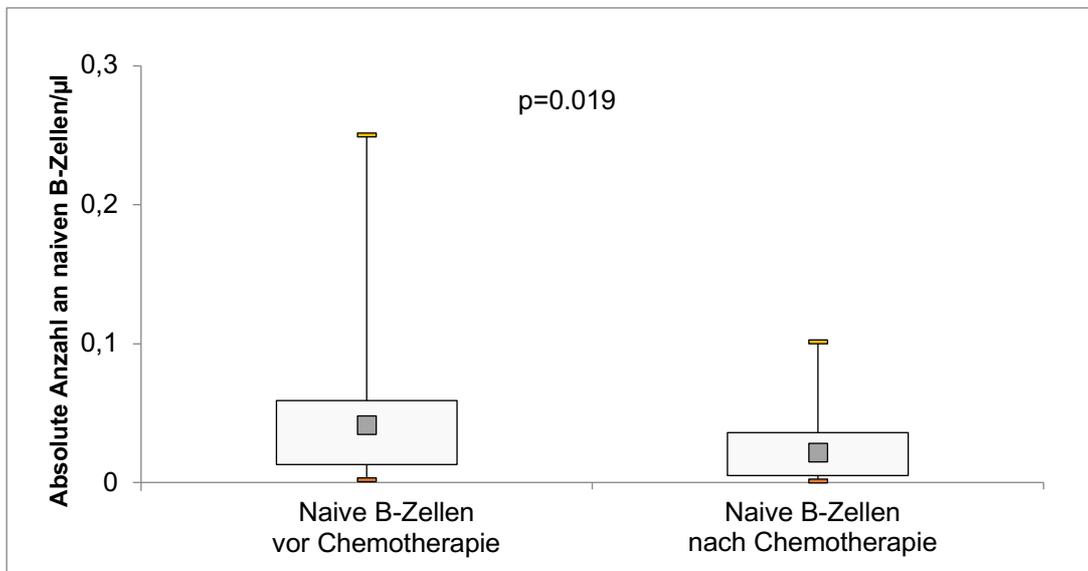


Abb. 40: Veränderungen der B-Zellen bei Anwendung von G-CSF
(Quelle: eigene Grafik)

4.4.2.2 Zusätzliche Therapie via Radiatio

Darüber hinaus stellte sich heraus, dass ohne zusätzliche Bestrahlungstherapie mehr Zellen auf Chemotherapie reagieren als mit. Ohne eine Radiatio ist die Anzahl der naiven (56/µl vs. 33/µl; $p=0.013$) und der Gedächtnis-B-Zellen (3/µl vs. 2/µl; $p=0.010$) gesunken, während mit Radiatio nur die Gruppe der klassengewechselten B-Zellen (13/µl vs. 4/µl; $p=0.018$) dezimiert wurde.

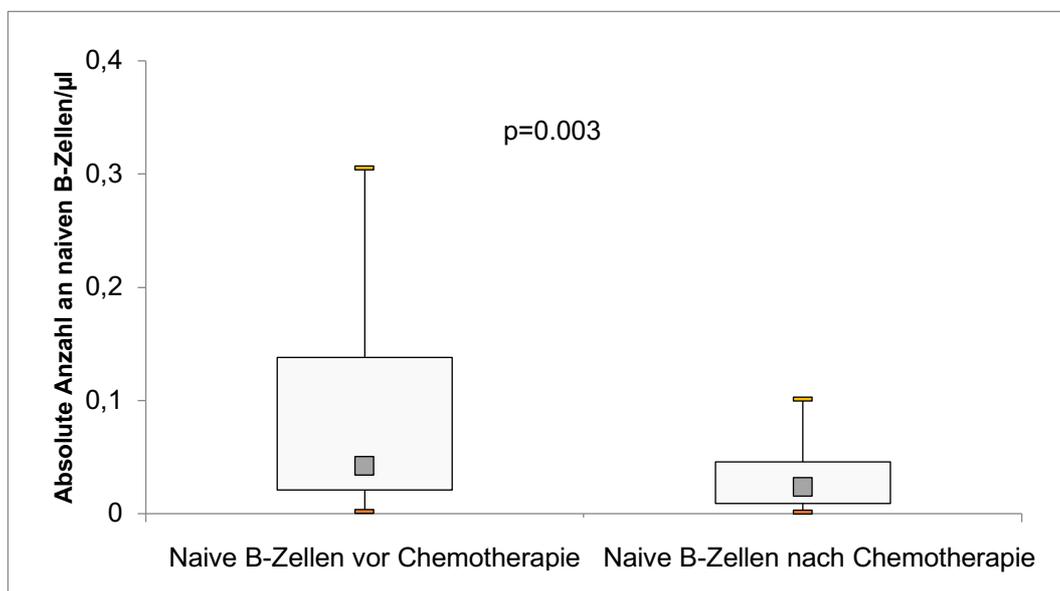
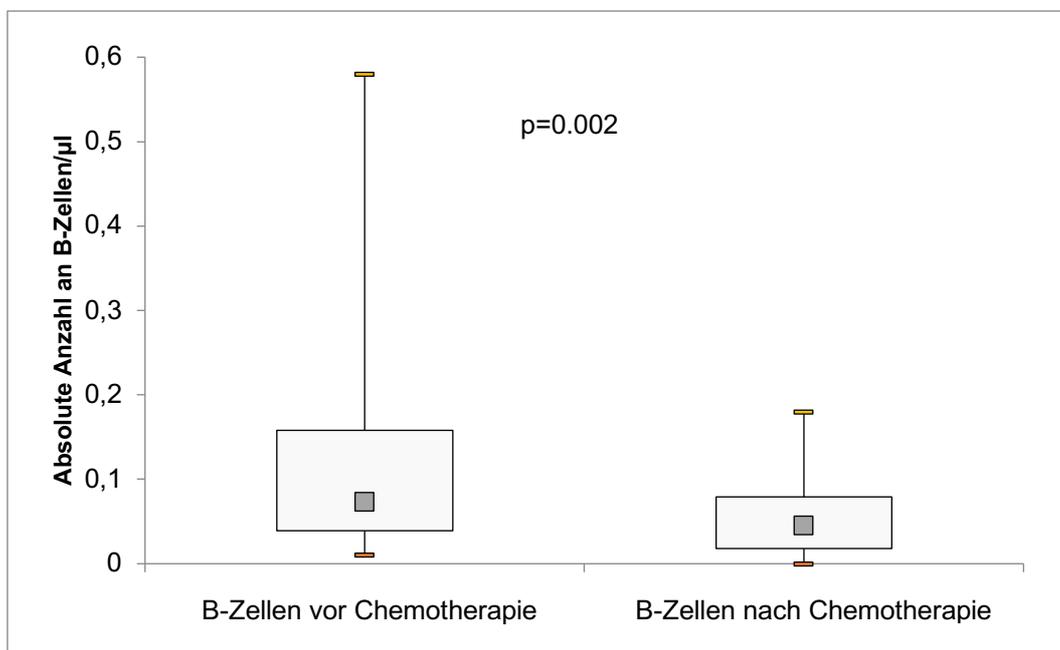
Eine Bestrahlungstherapie zeigte keine signifikante Veränderungen der T-Zell- und NK-Subpopulationen. Eine Ausnahme stellt die Reduktion der naiven CD4+ T-Zellen (131/µl vs. 61/µl; $p=0.017$) dar.

4.4.2.3 Das Chemotherapeutikum Platin

Beim Einsatz des Chemotherapeutikums Platin wurde bei Patienten eine NK-Zell-Subpopulation, die CD56+ CD16+ Zellen, signifikant vermindert (29/ μ l vs. 19/ μ l; $p=0.006$).

Des Weiteren führte Platin zu einer signifikanten Reduktion der B-Zellen an sich (73/ μ l vs. 45/ μ l; $p=0.002$), der naiven (42/ μ l vs. 23/ μ l; $p=0.003$), Gedächtnis- (3/ μ l vs. 2/ μ l; $p=0.007$) und der klassengewechselten (11/ μ l vs. 4/ μ l; $p=0.018$) B-Zellen. Signifikante Veränderungen bei Patienten, die eine Chemotherapie ohne Platin bekommen haben, wurden nicht beobachtet.

Darüber hinaus wurde ein deutlicher Abfall der terminalen Effektor CD8+ T-Zellen bei der Gruppe, die eine Chemotherapie mit Platin erhielt, erkannt (37/ μ l vs. 27/ μ l; $p=0.013$).



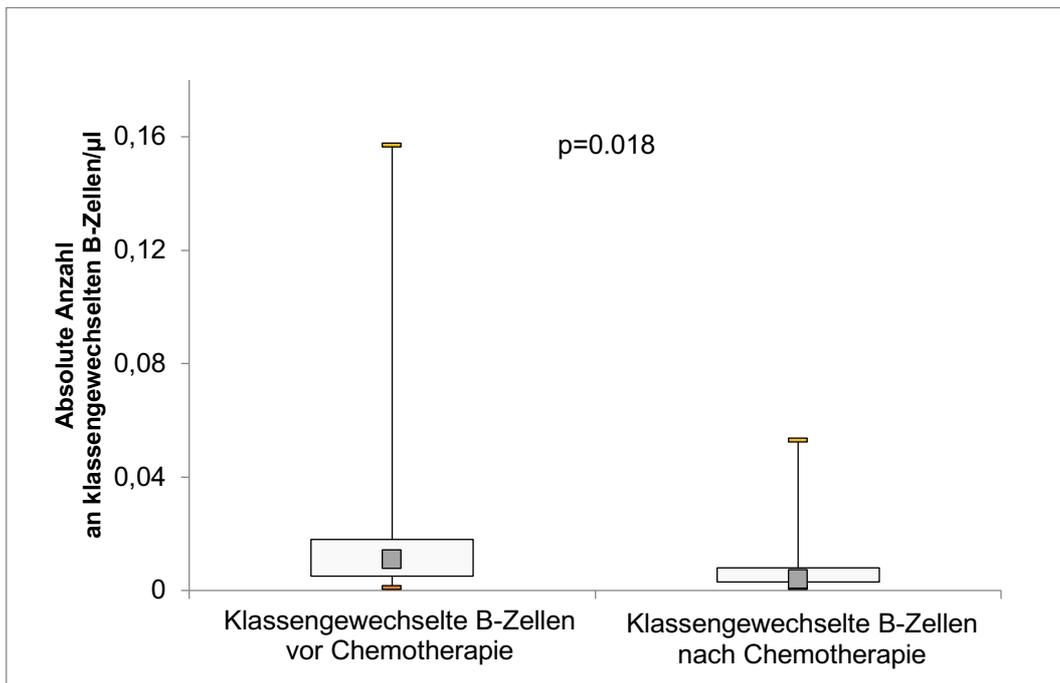
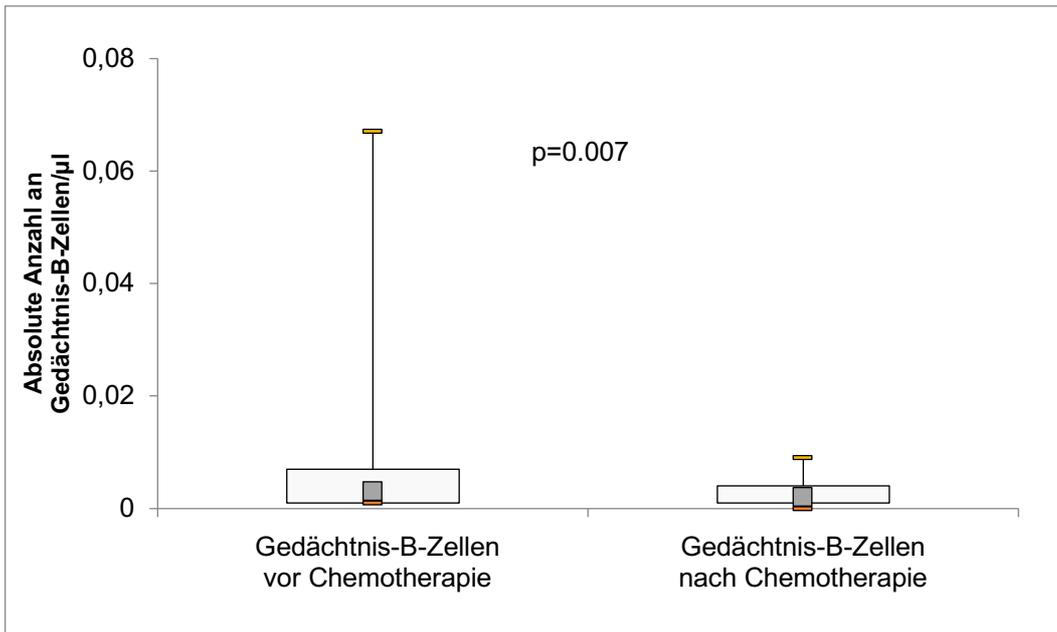


Abb. 41: Veränderungen der B-Zellen bei platinhaltiger Chemotherapie
(Quelle: eigene Grafik)

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die Inzidenz an Tumorerkrankungen nimmt zu und bei deren Entwicklung spielt meist ein durch unterschiedliche Ursachen beeinträchtigtes Immunsystem eine große Rolle. Als wesentlicher Bestandteil der Behandlung eines Karzinoms dient die Chemotherapie. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit bei 69 Patienten mit unterschiedlichen Malignomarten via Durchflusszytometrie untersucht, wie sich Zytostatika auf Immunzellen auswirken, und anhand von Dot-Plots dargestellt. Hierbei wurden signifikante Veränderungen der Anzahl von B-Zellen, aber nicht von T- und NK-Lymphozyten bei Patienten mit soliden Tumoren vor und nach vier bis sechs Zyklen first-line Chemotherapie entdeckt.

Im Hinblick auf die wachsende Bedeutung von Immuntherapien im Anschluss oder in Kombination mit einer zytostatischen Behandlung handelt es sich hierbei um wichtige Erkenntnisse.

5.2 Diskussion der Methoden

In dieser prospektiven Studie wurde als Goldstandard zur Untersuchung der B-, T- und NK-Zellen vor und nach Chemotherapie die Durchflusszytometrie angewandt. Dafür wurde bei insgesamt 81 Probanden Blut abgenommen. Davon dienten 12 gesunde, nicht tumorerkrankte Menschen als Kontrolle und 69 wiesen ein solides Malignom auf. Von diesen kamen nur 26 am Ende für die Studie in Frage: Ein Patient lehnte eine Chemotherapie ab, einer entschied sich grundsätzlich gegen eine Behandlung, 13 Teilnehmer verstarben während der Studie und die anderen 28 wurden am Universitätsklinikum Augsburg nicht weiterbetreut. Daher standen Lymphozyten von 26 Probanden und 12 Kontroll-Teilnehmern dem Vergleich zur Verfügung (siehe Überblick Abbildung 28).

In die Studienpopulation wurden die Menschen rekrutiert, die eine Tumorerkrankung aufwiesen, aber noch nicht behandelt wurden. Weitere Einflussfaktoren wie chronische Erkrankungen, HIV und Hepatitiden, Autoimmunerkrankungen, Immunsystemdefekte oder eine bereits erhaltene zytostatische Therapie bei vorherigem Tumor wurden ebenfalls ausgeschlossen. Lungenkrebs, nicht-kleinzelliger (NSCLC) und kleinzelliger (SCLC), kolorektale Karzinome (KRK), Pankreastumore, Sarkome, gastrointestinale Karzinome, Nasennebenhöhrentumore, Mammakarzinome und Blasenkrebs waren die Malignome, an denen die Patienten in der Studie erkrankt sind. Lungenkrebs und kolorektale Karzinome als zwei der häufigsten Tumore in Deutschland, neben Karzinomen der Mamma bei Frauen und der Prostata bei Männern, sind unter den Probanden am meisten vertreten (siehe Abbildung

2) (5). Hiermit wird in der vorliegenden Studienpopulation die statistische Verteilung der Tumorentitäten in Deutschland wiedergespiegelt.

Da Malignome zunehmend im Alter auftreten, befanden sich die Patienten dieser Studie mit einem Altersmedian von 63 Jahren (zwischen 48 und 80 Jahren) in einem typischen Altersspektrum, wie aus den Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten ersichtlich ist (5). Bei insgesamt ungefähr 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland werden nur etwa 20.000 Patienten im Alter zwischen 15 und 39 Jahren neu diagnostiziert, der andere große Anteil beläuft sich auf Menschen über 40 Jahre (5). Dies wird in Abbildung 1 veranschaulicht. Die Geschlechterverteilung der Studiengruppe mit 14 Frauen und 12 Männern stimmt nicht mit der Erkenntnis von mehreren Studien überein (5). In Deutschland erkranken ca. 51% der Männer in ihrem Leben an Krebs, ca. 43% Frauen. Etwa 25% der Männer sterben an der Tumorerkrankung, 20% der Frauen (6). Ein Grund für die geschlechtliche Aufstellung der Probanden in dieser Arbeit könnte daran liegen, dass Frauen häufiger bereit sind, an Studien teilzunehmen (94).

Es steht fest, dass die untersuchte Population von 28 Beteiligten nicht ausreichend repräsentativ ist. Dafür wären, wie in der Fallzahlberechnung beschrieben, mindestens 80 Menschen nötig gewesen, wobei ein frühzeitiges Ausscheiden aus der Studie durch Tod, Abbruch der Therapie und Klinikwechsel berücksichtigt werden muss. Dennoch stellen die 28 Patienten anhand von Alter und Lokalisation ihrer Tumore geeignete Probanden dar, um ihre Immunzellen zu analysieren.

Da die Patientenrekrutierung und Probenmessungen im Zeitraum von Mai 2016 bis August 2017 und pro Patientin bzw. Patient zwei Mal im Abstand von 12 Wochen stattfanden, war es nicht möglich, die Blutabnahmen von nur einer Person durchführen zu lassen. Um dennoch eine einheitliche Arbeitsweise zu erschaffen, wurden folgende Prinzipien festgelegt: Der Arm sollte maximal eine Minute mittels Stauschlauch abgedrückt werden. Damit soll eine zu lange venöse Stauung und dadurch eine Hämolyse der Zellen vermieden werden. Laufende Infusionen oder Ähnliches wurden vorher abgestellt bzw. es wurden, wenn möglich, die Seite der peripheren Venenverweilkanüle vermieden, an der die Infusion läuft. Zudem wurde das kleine EDTA-Blutentnahmeröhrchen immer vollständig, mit 2,7 Milliliter, gefüllt. Zu viel Blut im Behälter könnte zu einer niedrigen EDTA-Konzentration und damit zur Koagulation führen, zu wenig Blut lässt möglicherweise zu, dass sich Leukozyten und Erythrozyten morphologisch verändern (95). Den Patienten wurde das Blut mit erhöhtem Oberkörper abgenommen und danach wurde das Röhrchen geschwenkt, um sich mit dem EDTA-Salz zu vermischen. Da Kühlung oder Einfrieren aufgrund einer möglichen Aktivierung der Zellen durch Temperaturveränderungen vermieden wurde und keine chemische Stabilisierung der Proben stattfand, wurden die Proben innerhalb von 24 Stunden verarbeitet. Anhand dieser

Arbeitsweise ließen sich die Probenmessungen für diese Studie nahezu standardisiert durchführen.

Warum wurde die Durchflusszytometrie als Methode für diese Studie ausgewählt? Die Durchflusszytometrie ist die beste und einzigartige Technik zur Immunphänotypisierung von gesunden und kranken Menschen (18). Sie ist weltweit seit mehr als 30 Jahren von klinischen Pathologen und Immunologen im Einsatz, um Patienten mit Tumorerkrankungen und Immundefekten zu diagnostizieren und untersuchen (96).

Die Durchflusszytometrie zeichnet sich darin aus, multiple Parameter gleichzeitig analysieren und damit multivariate Datenanalysen gewähren zu können (18) (97). Die Stärke dieser Methodik liegt auch darin, eine sehr kleine Anzahl an individuellen Zellen in einer heterogenen Population zu detektieren (18) (96). Daneben können verschiedene Arten von Zellen untersucht werden, des Knochenmarks, des Liquors, weiterer Körperflüssigkeiten und vor allem des Blutes. Voraussetzung dafür ist, dass sie in eine Suspension überführt werden müssen (79) (84). Deshalb ist die durchflusszytometrische Methode dafür geeignet, viele verschiedene, auch seltene, Subpopulationen von Zellen wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten in einer Zellmischung wie dem Blut, zu erforschen (18). Dies entspricht genau dem Ziel, das in dieser vorliegenden Arbeit verfolgt wurde. Wäre nur eine einzige Population zu untersuchen gewesen, hätten sich z.B. Radioimmunassays (RIA) und Enzyme-linked immunosorbent Assays (ELISA) besser geeignet (98).

Neben der Untersuchung der Expression von Zelloberflächenproteinen dient sie z.B. auch der Analyse von intrazellulären Phosphoproteinen und Zytokinen, der Identifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen oder der Messung der T-Zell-Proliferation (18).

Dabei ist die Durchflusszytometrie sehr sensitiv und statistisch präzise (77). Zudem ermöglicht sie es, sehr schnell große Mengen an entstandenen Daten zu akquirieren und zu verarbeiten (77) (97).

Wenn die Durchflusszytometrie mit Fluoreszenz-markierten Proben kombiniert wird, lässt sich damit eine noch umfangreichere Zellsortierung verwirklichen. Mittels FACS können weitere Eigenschaften der Zellen mit Hilfe von Lichtstreuung und Fluoreszenz herausgefunden werden (77).

Dennoch ist zu berücksichtigen, dass vor Anwendung der Methode der Durchflusszytometrie die Gegebenheiten geschaffen werden müssen. Ein Durchflusszytometer ist sehr teuer - das Labor des Universitätsklinikums Augsburg ermöglichte es, ihr Gerät neben dem alltäglichen Betrieb mitzuverwenden. Genauso sind eine ausreichend gute Luftqualität, eine Lokalisation zum Aufstellen des Gerätes sowie z.B. ein geeignetes Kühlsystem für die dabei verwendeten Laser notwendig (97). Um das FACS-Gerät richtig zu bedienen, erfordert es qualifizierte und

gut ausgebildete Mitarbeiter (97). Auch dies war mittels der Leiterin des Labors und ihres Teams möglich.

Wie bei den Probenmessungen bereits erwähnt, sollte die Durchflusszytometrie standardisiert durchgeführt werden (18). Dies stellt sich als schwierig heraus, da es zahlreiche Variablen dabei gibt, wie z.B. die Antikörper-Panels, die Proben selbst, die Art der Software, die Verwendung von Beads oder auch die Gating-Strategien (18). In der vorliegenden Studie sind die Blutproben dauerhaft auf dieselbe Art und Weise abgenommen worden und es wurde immer das gleiche Antikörper-Panel verwendet. Ebenfalls wurde nur mit einer Software gearbeitet. Beads waren immer im Einsatz. Daraus folgernd bleiben nur die Gating-Strategien in unserer Studie übrig, die von allen Faktoren am wenigsten vereinheitlicht wurden. Es wurden Regeln bestimmt, an denen orientierend die Gates zu setzen sind. Dennoch ist es nicht bei jedem Patienten möglich gewesen, manuell die Grenzen für die Dotplots exakt gleich festzulegen. Die Verwendung von automatisierten Gating-Analysen wäre hierbei zu empfehlen (18).

Damit Störungen der Anzahl der Lymphozyten durch Debris und tote Zellen verhindert werden, wurde ein Schwellenwert für das Vorwärtsstreulicht eingeführt, um diese zu eliminieren (99). Außerdem dienten die oben genannten Beads, mit Antikörpern beschichtete Partikel, der Kalibrierung der Messung (100).

Zur Gegenüberstellung der Ergebnisse via Durchflusszytometrie wurden in der vorliegenden Arbeit grundsätzlich nur vereinzelt Tierstudien verwendet. Klein et al. und Xiao et al. bestätigen, dass Mäuse und Menschen sich bei der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses unterscheiden (16) (101). Während beispielsweise anhand von CD27 humane Gedächtnis-B-Lymphozyten erkannt werden können, ist dies bei murinen nicht möglich (16) (101). Dennoch geben Arbeiten an Mäusen Hinweise für die Untersuchung des menschlichen Gedächtnisses. Es sind aber weitere Studien nötig, um dies näher zu analysieren und präzisere Vergleiche zwischen Mensch und Tier zu ermöglichen (16) (101).

Grundsätzlich ist jedoch zu beobachten, dass Analysen an Menschen komplizierter als an Tieren sind (18). Sie sind nicht genetisch identisch und weisen unterschiedliche ethnische Differenzen und Umweltfaktoren auf (18). Zu den Umwelteinflüssen zählen z.B. verschiedene Ernährungsweisen, durchgemachte Infektionen und Luftverschmutzung (18) (102). Deshalb benötigen Studien an ihnen mehr Zeit als an Mäusen und lassen sich daher nur schwer vergleichen. Gerade aus diesen Gründen jedoch sollten Arbeiten an Menschen mittels Standardisierung gegenübergestellt werden können. Im Hinblick auf die oben genannten Variablen könnte eine solche erreicht werden, indem die Probanden über eine längere Zeit als 12 Wochen wie in dieser Studie untersucht werden. Darüber hinaus könnten damit auch insgesamt mehr Patienten rekrutiert werden (18). Dies würde wiederum zu einer Verbesserung der analytischen Reproduzierbarkeit und zur Erleichterung der Erstellung von Metaanalysen

führen (79) (96). Daran arbeitet derzeit unter anderem das Netzwerk European Network for Translational Immunology Research and Education (ENTIRE) (18) (96).

Da effektive Standardisierung derzeit ein Ziel bei der Immunphänotypisierung von Menschen darstellt und in der vorliegenden Arbeit die Gating-Strategien und die Probanden selbst die einzigen, nicht vollständig kontrollierbaren Punkte darstellen, kann diese Studie zum Vergleich mit anderen Arbeiten herangezogen werden.

Warum wurden zur Untersuchung des Immunsystems eines Menschen vor und nach Chemotherapie die Populationen B-, T- und NK-Zellen ausgewählt?

Alle drei Zelltypen spielen eine Rolle bei der Entwicklung von Tumoren und sind damit auch einer zytostatischen Behandlung, die Immunzellen angreift, ausgesetzt. Viele Studien berichten von einer Infiltration von Tumoren durch B- und T-Lymphozyten (103) (104) (105) (106) (107). Zum Beispiel wird beim Mammakarzinom von einer Dichte an B-Zellen von bis zu 40% berichtet (104). Ob die Lymphozyten dabei den Verlauf der Erkrankung positiv oder negativ beeinflussen, wird kontrovers diskutiert und hängt von vielen Faktoren ab, z.B. der Lokalisation der Immunzellen, der Tumorentität und dem Maß der Zelldichte (103). Laut Flammiger et al. und Mei et al. sind bei Karzinomen der Prostata, der Blase, des Ovars, des Darms und bei Melanomen mehr T- als B-Lymphozyten für das Outcome verantwortlich (103) (108). Gleichzeitig ist aber bei NSCLC und Mamma-Karzinomen die Bedeutung der B-Zellen für ein verbessertes Überleben bekannt (105) (107). Chin et al. berichten jedoch davon, dass eine erhöhte Anzahl an CD4+ T-Zellen zum Progress eines kolorektalen Karzinoms beitragen kann (104). Wie die verschiedenen Zellen dabei agieren, wird derzeit auch untersucht: B-Zellen wirken zum einen nicht direkt, sondern aktivieren bei Antigenpräsentation T-Zellen (109), deren zytotoxisches Potential zu einer Beeinträchtigung der Tumorentwicklung führt (110) (111). Zum anderen wird diskutiert, ob B-Lymphozyten T-Zellen in ihren Immunantworten gegen Tumore unterdrücken, unter anderem durch die Bildung von Antikörpern oder die Sekretion von tumorunterstützenden Faktoren (110). CD8+ T-Zellen sollen für die Aufrechterhaltung des Immunsystems sorgen, während CD4+ T-Zellen für die Kontrolle des Tumors verantwortlich sind (107). Dafür stimulieren sie z.B. CD8+ T-Zellen, NK-Lymphozyten und andere Zellen der angeborenen Immunität wie Makrophagen (107). Gleichzeitig können sie durch Ausschüttung von Interferon- γ und TNF Tumorzellen reduzieren (107). NK-Zellen helfen auch mit, das Wachstum des Tumors zu stoppen (106). Wenn die Produktion von NK-Lymphozyten jedoch nicht zusätzlich gesteigert wird, werden sie meist durch Krebszellen dezimiert (106). Laut Jeannet et al. beeinflussen Veränderungen der Anzahl von B- und T-Zellen signifikant NK-Zellen. In Abwesenheit von T-Zellen nimmt die Anzahl an NK-Zellen im Knochenmark zu, in der Milz jedoch bleibt sie gleich (112). Das liegt z.B. daran, dass das Zytokin IL-15 von NK-, NKT- und T-Zellen verwendet wird. Sind T-Zellen weniger vorhanden,

ist mehr Zytokin für NK-Zellen übrig, so dass sie ihre Produktion steigern. In Abwesenheit von B-Zellen dagegen reduziert sich die Anzahl von NK-Zellen in der Milz. Das liegt daran, dass B-Zellen IL-15 bilden (112).

Neben der Notwendigkeit, Zellen zu untersuchen, die in Tumoren vorkommen und durch Chemotherapie verändert werden können, ist es essentiell gewesen, dass sich die Auswahl der Lymphozyten auch mit derjenigen an Zellen deckt, die für eine sequentielle oder parallele Immuntherapie notwendig sind. Nur so besteht die Möglichkeit, den Effekt einer Chemotherapie umfassend zu eruieren.

Immuncheckpoint-Inhibitoren werden zunehmend eingesetzt. Bei den Checkpoints handelt es sich um die inhibitorischen Oberflächenmarker PD-1 und CTLA-4 (113). Beide können potentiell autoreaktive T-Lymphozyten auf den verschiedenen Schritten der T-Zell-Entwicklung stoppen: CTLA-4 zu Beginn, kurz nachdem naive T-Zellen in den Lymphknoten stimuliert werden, und PD-1 zu einem späteren Zeitpunkt von Effektor-T-Zellen in peripheren Geweben (53) (113). Bei Krebspatienten werden diese inhibitorischen Wege stimuliert und deshalb wird keine Immunantwort gegen den Tumor ausgelöst (113). Ziel einer Immuntherapie ist es, die Aufgaben der Checkpoints aufzuheben. Dazu dienen z.B. Ipilimumab als CTLA-4-Blocker und Nivolumab als PD-1-Inhibitor (53) (113). Damit sie an den Oberflächenmarkern angreifen können, sind diese auf den entsprechenden Zellen exprimiert: CTLA-4 befindet sich auf T-Zellen, PD-1 auf aktivierten T-Lymphozyten, B- und NK-Zellen (114). Da diese Lymphozyten damit die Voraussetzungen einer Immuntherapie darstellen, sind sie in der vorliegenden Arbeit umfassend betrachtet worden.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

In unserer Studie stellte sich heraus, dass eine zytostatische Therapie mit einem signifikanten Abfall der Absolutzahlen von B-Lymphozyten im peripheren Blut assoziiert ist. Transitorische B-Zellen stellen die einzige Population dar, die nicht nach Chemotherapie signifikant verringert wird. Für alle anderen B-Subpopulationen zeigte sich eine signifikante Abnahme. Diese jedoch ließ sich in allen Fraktionen gleichmäßig erkennen. Deshalb kann nur ein Einfluss von Chemotherapie auf die gesamte B-Zell-Population gesehen werden, aber es lässt sich nicht schlussfolgern, dass spezifische Subpopulationen auf Chemotherapie sensibler sind als andere.

Ob der Grund für die Abnahme von B-Zellen eine höhere Suszeptibilität für Chemotherapie oder eine langsamere Erholungskapazität ist, geht aus dieser Arbeit nicht hervor. Grundsätzlich berichten z.B. Dunleavy et al. bei 67% der Patienten neun Monate nach Chemotherapie von einer Erholung von mehr 40 B-Zellen pro mm^3 bei einer durchschnittlichen Ausgangszahl von 615 Zellen pro mm^3 und von einer vollständigen Rekonstitution der B-

Lymphozyten nach 18 Monaten (115). Hierbei haben die Probanden mit Ausnahme von Vincristin eine ähnliche zytostatische Behandlung erhalten wie in unserer Studie: Cyclophosphamid, das Anthracyclin Doxorubicin und Etoposid (115). Von einer benötigten Erholungszeit von B-Zellen von mehr als neun Monaten sprechen auch Verma et al. Nach Gabe von Epirubicin, Cyclophosphamid und Taxanen beobachteten sie bei naiven B-Zellen vor dem erneuten Anstieg zunächst von zwei Wochen bis neun Monaten nach Chemotherapie eine weitere Abnahme der Anzahl von 32% auf 25% (116). Bei transitorischen B-Zellen dagegen zeigte sich zunächst eine Zunahme nach Beendigung der Chemotherapie innerhalb der ersten zwei Wochen von 5% auf 23% und dann in den nächsten neun Monaten nochmal ein Abfall auf 14%, bevor sich die Zahl wieder normalisiert hat (116). Dies würde die zunächst nicht von Zytostatika beeinflussten Anzahl an transitorischen B-Zellen in der vorliegenden Arbeit erklären. Darüber hinaus wird dadurch auch verdeutlicht, dass der Beobachtungszeitraum dieser Studie von 12 Wochen zu klein ist, um die Erholung von B-Lymphozyten und damit die Gründe für deren reduzierte Zahl nach Chemotherapie beurteilen zu können.

Besonders in der Patientengruppe, die kein oder ein geringes Ansprechen auf Chemotherapie zeigten und damit eine stabile bzw. progressive Erkrankung aufweisen, wurde eine Abnahme von B-Zell-Subpopulationen beobachtet, während Patienten mit partieller oder kompletter Remission konstante Werte von B-Lymphozyten präsentierten. Diese Ergebnisse stimmen mit der Korrelation von tumorinfiltrierenden B-Zellen mit Rezidiven und Überlebensraten bei Melanomen (117), Hals- (118) und Lungentumoren (119) überein. Auch DiLillo et al. beschreiben ein zweifach erhöhtes Tumor- und Metastasenwachstum bei Melanomen, wenn die Anzahl der B-Zellen abnimmt (109). Genauso wird auch die Bedeutung der Anwesenheit von intratumoralen B-Zellen bei NSCLC für eine längere Überlebenszeit hervorgehoben (121).

Patienten, die keine Infektionen während der Chemotherapieperiode aufwiesen, zeigten signifikant geringere Zahlen verschiedener B-Zell-Subpopulationen nach Chemotherapie. Deshalb kann die Hypothese aufgestellt werden, dass infektiöse Bedingungen zu einer gesteigerten Regeneration von B-Zellen führen können. Diese könnte dadurch unterstützt werden, dass z.B. bei der Entstehung von kindlichen Leukämien virale Geschehen zu einer klonalen Expansion von B-Zell-Vorläuferzellen führen, die entarten (122). Infektionen führen auch häufig zur Entstehung von spezifischen Gedächtnis-B-Zellen, einer der Untergruppen der B-Lymphozyten, um bei einer erneuten Exposition eine Immunantwort rasch geben zu können. Dies ist auch bei den Menschen nachgewiesen worden, die an dem aktuell weltweit herrschenden SARS-Cov-2-Virus erkrankt sind (123).

Die signifikante Abnahme von naiven und Gedächtnis B-Zellen wurde bei Frauen, aber nicht bei Männern, beobachtet. Geschlechterspezifische Unterschiede von Lymphozyten bei Gesunden wurden bereits bei T- und NK-Zellen beschrieben, aber nicht für B-Zellen (18). Mehrere Studien bestätigen eine höhere Anzahl an NK-Zellen bei Frauen als bei Männern (102) (124) (125). Abdullah et al. dagegen berichten von höheren Zahlen an NK-Zellen bei Männern und mehr B-Zellen bei Frauen (126). Wenn dies jedoch der Fall wäre, würde diese Tatsache nicht dabei helfen, zu erklären, weshalb gerade bei Frauen nach Chemotherapie weniger naive und Gedächtnis B-Zellen nachgewiesen werden konnten. Naive T-Zellen sind gehäuft bei Frauen, aktivierte T-Zellen mehr bei Männern vorhanden (102). Fest steht, Männer und Frauen unterscheiden sich bei der globalen Genexpression von B-Zellen, vermutlich aufgrund des Hormons Östrogen (127).

Wichman et al. zeigten, dass sich bei Frauen die Immunzellen nach abdominalchirurgischen Operationen schneller, mit einer Differenz von 4 Tagen, erholen als bei Männern: Während bei diesen B-, T- und NK-Lymphozyten bis zu fünf Tage reduziert sind, lassen sich bei Frauen postoperativ nur erniedrigte T-Zellen entdecken, die sich bereits nach einem Tag wieder regenerieren (128).

Patienten, die eine Chemotherapie mit Platin erhielten, zeigten signifikante Veränderungen der Anzahl der B-Zellen und der naiven, Gedächtnis- und klassengewechselten B-Zell-Subpopulationen im Gegensatz zu Patienten, die nicht mit Platin behandelt wurden. Dies ist erstaunlich, da Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin als alkylierende Agenzien weniger myelosuppressiv sind als z.B. Topoisomerase und Mikrotubuli-Inhibitoren (129).

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass fast alle Patienten eine Kombinationstherapie erhalten und Platin oft mit stark myelosuppressiven Chemotherapeutika gekoppelt wird.

Ein Beispiel, wie unterschiedlich verschiedene Kombinationen miteinander auf Zellen wirken, stellen Verma et al. dar: Sie fanden heraus, dass die alleinige Gabe von Anthrazyklinen sich stärker auf B-Zellen auswirkt als die Kombination von solchen mit Taxanen. Diese wiederum führen langfristig dazu, dass B-Zellen länger für ihre Regeneration brauchen (116).

Außerdem können verschiedene Chemotherapeutika, z.B. die in dieser Studie zum Einsatz gekommenen Doxorubicin oder Paclitaxel, immunogenen Zelltod (immunogenic cell death, ICD) induzieren (130). Zu diesem Vorgang kommt es, in dem spezielle endogene Moleküle, DAMPs (damage-associated molecular patterns) entstehen, die wiederum Entzündungsmediatoren freisetzen und eine inflammatorische Reaktion zur Abwehr auslösen (130) (131). In unserer Studienpopulation waren die Chemotherapeutika sehr heterogen und die Anzahl der Patienten, die ICD-induzierende Agenzien erhalten haben, war zu klein, um eine zuverlässige statistische Analyse durchzuführen.

Auch wenn ein Einfluss von G-CSF auf die Lymphozytenzahlen in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden konnte, könnte die Gabe eines solchen prophylaktischen Faktors für Neutropenie laut Verma et al. dazu beitragen, dass sich die Gesamtanzahl von B-Zellen nach Chemotherapie langsamer erholt (116). Der Grund dafür ist, dass es zwar zu einer vermehrten Ausschwemmung von hämatopoetischen Stammzellen in die Peripherie führt, jedoch dadurch auch die Entwicklung von B-Zellen innerhalb des Knochenmarks gehemmt wird und sich damit insgesamt eine Auswirkung auf das Maß an Lymphozyten im peripheren Blut ergibt (116).

Wie bei G-CSF wurde auch kein Unterschied und kein starker Einfluss auf B-Zellen beim Einsatz von Strahlentherapie in dieser Arbeit festgestellt. Dennoch deckt sich unser Ergebnis, die Abnahme von klassengewechselten B-Zellen unter Radiatio, mit demjenigen von Uckun et al. und Nishii et al.: Beide beobachteten vor allem eine Auswirkung auf die B-Vorläuferzellen, zu denen die transitorischen B-Lymphozyten am Übergang vom Knochenmark zur Peripherie gehören (132) (133).

Der Effekt von zytotoxischer Chemotherapie auf Lymphozytenpopulationen wurde bisher hauptsächlich bei Patienten mit hämatologischen Malignitäten untersucht. Eyrich et al. zeigte, dass B-Zellen bei Kindern, die eine Chemotherapie bei hämatologischen Neoplasien erhalten haben, mehr beeinträchtigt wurden als T-Zellen. Daneben stellten sie fest, dass sich T-Zellen schneller als B-Zellen erholen (134). Das liegt daran, dass Kinder noch einen Thymus besitzen und dieser für die Regeneration von T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen scheint (135). Das bestätigten auch Weinberg et al. bei Patienten nach Knochenmarkstransplantation (136). Dabei wird auch darauf hingewiesen, dass Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHD, Graft-versus-host-disease) im Rahmen einer Immunsuppression direkt nach einer Transplantation auch dazu beitragen, die Involution des Thymus zu beschleunigen (136). Mackall et al. unterscheiden dabei die Regeneration von CD8⁺ Lymphozyten von der der CD4⁺ T-Zellen. Ihren Erkenntnissen zufolge benötigen CD4⁺ Lymphozyten den Thymus, um sich zu erholen, die Rekonstitution von CD8⁺ Zellen dagegen kann auch unabhängig vom Thymus und damit auch vom Alter eines Menschen stattfinden (137). Van Tilburg et al. zeigte, dass alle B-Zell-Subpopulationen von Patienten mit hämatologischen Neoplasien nach Chemotherapie signifikant reduziert werden (60). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen mit Ausnahme der transitorischen B-Lymphozyten, die in unserer Studie nicht signifikant verringert wurden. Wie kommt dies zustande und welche Tatsache liegt dieser Erkenntnis zugrunde? Transitorische Zellen kommen aus dem Knochenmark. Daher ist es nachvollziehbar, dass sie durch Chemotherapie aufgrund der Myelosuppression direkt zerstört werden (12). Wie vorher bereits anhand der Beobachtungen von Verma et al. beschrieben stellt sich der Verlauf der Anzahl an

transitorischen B-Zellen jedoch postchemotherapeutisch besonders dar: Zunächst kommt es zu einer Zunahme über das Ausgangsniveau hinaus, die sich aber im Laufe der nächsten Monate wieder zurückbildet (60) (116). Dies beobachteten auch Goswami et al.: Während vor zytostatischer Behandlung die transitorischen B-Zellen einen Anteil von 15,5% aller B-Zellen innehaben, beträgt dieser danach 35,8% (138). Im Zeitraum von 10 bis 19 Wochen nach Chemotherapie reduzierten sich die Zahlen wieder und erreichten den Ausgangswert (138). Da die Patienten der vorliegenden Studie 12 Wochen nach Zytostatika-Gabe untersucht wurden, lässt sich daraus schließen, dass die nur gering verringerte Anzahl an transitorischen B-Lymphozyten genau den Zeitpunkt abbildet, an dem sie sich vermehrt repliziert haben und kurz davorstehen, weiter abzunehmen.

Während sich naive und transitorische B-Lymphozyten innerhalb von drei bis neun Monaten erholen, benötigen Gedächtnis B-Zellen mehr als ein Jahr, um zu ihrer ursprünglichen Anzahl zurückzukehren (60) (116). Dies würde wiederum der Erkenntnis von Rösel et al. widersprechen, die herausfanden, dass Gedächtnis B-Zellen schneller proliferieren als alle anderen B-Zellen, vor allem naive (25). Darüber hinaus wurde auch kein Hinweis darauf gefunden, dass die regenerierten Zellen in ihrer Funktion durch die zytostatische Behandlung beeinträchtigt werden (60).

Auch wenn diese Daten von Patienten mit hämatologischen Malignitäten, die eine Chemotherapie erhalten haben, sich zum Vergleich mit unseren Ergebnissen größtenteils als geeignet erwiesen, muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Chemotherapeutika für hämatologische Neoplasien von denen für solide Malignome unterscheiden und deshalb zum Beispiel der Einfluss des immunogenen Zelltods (ICD) einen Unterschied macht. Da die Daten der vorliegenden Arbeit nicht einen ausreichend langen Zeitraum abdecken, kann die Regeneration von B-, T- und NK-Zellen nach Chemotherapie nicht beurteilt werden.

Vorherige Studien bezüglich B-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten zeigten unterschiedliche Ergebnisse, mit erhöhter oder erniedrigter Anzahl im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen (139) (140) (141) (142) (143). Schmidt et al. stellten auf Grundlage ihrer Ergebnisse die Hypothese auf, dass ein hohes Maß an B-Zellen als Teil des humoralen Immunsystems mit einem guten klinischen Outcome bei Mammakarzinom korrelieren (141). Inoue et al. jedoch waren der Meinung, dass B-Zellen die Immunantwort gegen Tumorzellen verhindern, z.B. bei Nierenzellkarzinomen, B-Zell-Lymphomen und Melanomen (142). Auch bei hepatozellulären Karzinomen wird das Fortschreiten durch B-Lymphozyten begünstigt (139). Deshalb müssten sie mittels Rituximab, einem Anti-CD20-Antikörper, verringert werden. Dadurch würden die Abwehrreaktionen gegen den Tumor durch die T-Zellen weniger von den B-Zellen blockiert werden können (142). Die gleiche Erkenntnis beschreiben Shah et al. (143).

Da eine Immuntherapie als Ziel am Ende unserer Studie steht, wären unsere Ergebnisse, eine geringe Anzahl an B-Lymphozyten bei Tumorpatienten, die durch Chemotherapie weiter verringert wird, gut mit denen von Inou et al., Lin et al. und Shah et al. vereinbar.

Allerdings steht fest, dass B-Zellen benötigt werden, um T-Lymphozyten zu aktivieren (109). Bei der Gabe von Rituximab ist bisher jedoch nicht bewiesen, ob eine ausreichend hohe Anzahl an B-Zellen noch bestehen bleibt, um für die Induktion der Antitumor-Antwort durch die T-Zellen zu sorgen. B-Zellen könnten keine direkte Rolle im Kampf gegen Tumore übernehmen, aber über T-Zell-Aktivierung dazu beitragen. Würden sie dezimiert werden, könnte das Krebswachstum gefördert werden (109). Es wird zudem spekuliert, ob B-Zellen Antikörper gegen Tumorantigene bilden und damit neben T-Lymphozyten essentiell bei der Bekämpfung von Tumorzellen sind. Deshalb steht auch zur Diskussion, ob es sinnvoll wäre, Therapiemöglichkeiten zu etablieren, bei denen B-Zellen neben dendritischen Zellen auf Tumorantigene ausgerichtet sind (109).

Bei den T-Zellen und ihren Subpopulationen wurden wenige, aber keine signifikanten Veränderungen vor und nach Chemotherapie gesehen und sie ließen kein spezifisches Muster erkennen. Deshalb ist es in erster Linie möglich, einen Vergleich zwischen unseren Werten über die T-Zellen bei den Patienten ohne Therapie und Ergebnissen aus anderen Studien anzustellen.

T-Lymphozyten werden durch die Anwesenheit von Malignomen beeinträchtigt, was z.B. bei Patienten mit NSCLC zu einem signifikanten Abfall von CD4+ Zellen und NK-Zellen führt, aber nicht von CD8+ Zellen (121). Al-Shibli et al. haben dagegen herausgefunden, dass auch CD8+ T-Zellen bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs reduziert werden (119). Dabei hängt deren Bedeutung für das Überleben davon ab, wo sich die T-Zellen befinden, im Stroma oder in den Epithelien: Stromale T-Zellen sind für die Prognose bedeutender als epitheliale (119). Außerdem nehmen CD4+, CD8+ und NK-Zellen bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) signifikant ab (109). Bei Melanomen spielen neben B-Zellen auch die Dichte an T-Zellen, vor allem CD8+, eine Rolle (117). Daneben sind niedrige Zahlen von CD4+ und CD8+ T-Zellen auch bei zervikalen Tumoren für die schlechte Prognose mitverantwortlich (118). Eerola et al. dagegen postuliert, dass T-Zellen im Gegensatz zu B-Zellen keine Bedeutung für die Überlebenszeit und für das Wachstum von Tumoren haben (144).

Wenn T-Zellen in den Tumoren erhalten bleiben, erkannten Zhang et al., dass sie mit einem 3,9 fach längeren progressionsfreien und 2,8 fach längeren gesamten Überleben korrelieren (145). Dies spielt bei Ovarialkarzinomen sowie bei Melanomen mit vertikalem Wachstum, kolorektalen sowie Prostata-, Nierenzell-, Mamma-, Ösophaguskarzinomen und NSCLC eine Rolle (103) (117) (145). Durch Antigene aktivierte intratumorale T-Zellen bilden Interferon- γ ,

Interleukin-2 und lymphozyten-anziehende Chemokine wie Monokine, Chemokine des sekundären lymphoiden Gewebes und Chemokine, die von Makrophagen abstammen (145). Monokine locken aktivierte T-Zellen an und hemmen die Angiogenese des Tumors, Chemokine des sekundären lymphoiden Gewebes und von Makrophagen-kommende Chemokine ziehen dagegen Gedächtnis-T-Zellen und reife dendritische Zellen an und fördern die Antigenpräsentation (145). Sind dagegen keine intratumoralen T-Zellen vorhanden, wird vermehrt von den Tumorzellen VEGF, vascular endothelial growth factor, produziert. Dieser Faktor fördert die Angiogenese und reduziert zusätzlich die Anzahl der T-Zellen (145).

Pagés et al. beschreiben einen Zusammenhang zwischen einer hohen Anzahl an Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD3+ CD8+ CD45RO+ CCR7- CD28- CD27-) und der Abwesenheit von Zeichen einer frühen Metastasierung, einem geringen pathologischen Stadium und einem erhöhten Überleben (146). Aber auch eine erhöhte Anzahl an T-Zellen in ihren verschiedenen Differenzierungsstadien von frühen Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO+ CCR7- CD28+ CD27+) bis Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, an CD3+ positiven T-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie Th1-Zellen sind in nicht-metastasierten Tumoren zu finden. T-Helferzellen von Typ 1 oder 2 entstehen nach Expression von T-BET (T-box Transkriptionsfaktor 21) durch T-Zellen (146). Auch Flammiger et al. beschreiben den Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von intratumoralen T-Zellen und erhöhtem Überleben (103). Allerdings wurde hierbei auch herausgefunden, dass zwar eine besonders geringe, aber auch eine ausgeprägt hohe Dichte an T-Zellen mit einem schlechten klinischen Outcome einhergehen (103). Dies wird dadurch erklärt, dass sich unter den T-Zellen überwiegend regulatorische T-Zellen befinden, die die Immunantwort gegen die Tumorzellen abschwächen könnten. Darüber hinaus ist es wichtig, dass die Anzahl der T-Zellen zwar konstant sein kann, ihre Reaktionen jedoch häufig abhängig sind von B-Zellen (103). Yuen et al. beschreibt, dass aktivierte B-Zellen die T-Zell-Antworten fördern können, ruhende B-Zellen dagegen blockieren (111).

In unserer Studienpopulation wurden ausschließlich bei den Fraktionen von CD4+, CD8+ und NK-Lymphozyten relevante Unterschiede zwischen unbehandelten Krebspatienten und der Kontrollgruppe sichtbar, aber nicht bei der gesamten Anzahl von T-Lymphozyten. Das stimmt teilweise mit den Ergebnissen anderer Studien überein. Mei et al. und Choi et al. fanden bei kolorektalem Krebs auch keine signifikanten Veränderungen von CD4+ und CD8+ Zellen zwischen Patienten und der gesunden Kontrollgruppe heraus (108) (147).

Da T-Zellen eine essenzielle Rolle bei der Funktion von Checkpoint-Inhibitoren spielen, kann die Erkenntnis, dass sie durch Chemotherapie nicht reduziert werden, dazu führen, diese im Anschluss daran zu verwenden. Neuerdings sind Checkpoint-Inhibitoren größtenteils als Zweitlinien- oder Drittlinientherapie für die meisten Tumorentitäten bestätigt und werden häufig nach einer Serie von Chemotherapiezyklen angewandt. Autoreaktive T-Lymphozyten sind

notwendig, um gegen Tumorzellen anzukämpfen. Ziel dieser Immuntherapie ist deshalb, die Aufgaben der Immuncheckpoints PD-1 und CTLA-4, die Entstehung von autoreaktive T-Zellen zu verhindern, zu blockieren (113). Die Möglichkeit, dass es aufgrund von potenziell verminderten T-Lymphozytensubpopulationen nach Chemotherapie einen abgeschwächten Antitumor-Effekt durch Immuncheckpoint-Inhibitoren gibt, könnte anhand von unseren Ergebnissen ausgeschlossen werden. Aufgrund der stabilen Anzahl an T-Zellen nach Chemotherapie wäre eine Kombination von Checkpoint-Inhibitoren und klassischer Chemotherapie, wie z.B. zur Behandlung von NSCLC, eine therapeutische Option, deren biologische Begründung von unseren Daten unterstützt wird.

B-Zellen exprimieren die inhibitorischen Oberflächenmarker wie PD-1 und CTLA-4 (111). PD-1 und CTLA-4 wiederum fördern die Aktivität von B-Zellen, so dass es sich hierbei um eine positive Rückkopplung handelt (111). Wie sehr diese Expression eine Anti-Tumor-Immunantwort beeinflusst und anschließend eine Rolle bei der Checkpoint-Inhibitions-Therapie spielt, ist noch nicht gut verstanden. Im Falle einer PD-1- bzw. CTLA-4-abhängigen Tumorkontrolle durch B-Zellen könnte die Verwendung von Chemotherapie mit dem anschließenden Abfall von verschiedenen B-Zell-Subpopulationen eine Bedeutung für die Wirksamkeit von simultan oder konsekutiv verwendeten Checkpoint-Inhibitoren aufweisen. Auf jeden Fall scheint der Effekt von T-Zellen auf die Tumorkontrolle relevanter bezüglich der Checkpoint-Inhibitions-Therapie als der Einfluss von B-Zellen zu sein (113).

5.4 Fazit – Stärken und Schwächen dieser Studie

Die Limitationen dieser Arbeit liegen in der niedrigen Anzahl der Probanden von 26, ihren heterogenen Tumorentitäten und damit auch in dem Einsatz von unterschiedlichen Chemotherapie-Schemata sowie in dem kleineren Beobachtungszeitraum von insgesamt drei Monaten, innerhalb dessen keine weiteren Untersuchungen der Lymphozyten und ihrer Subpopulationen stattgefunden haben. Eine regelmäßige Durchführung von Messungen während der 12 Wochen hätte über den genauen Verlauf der Anzahl z.B. der T-Lymphozyten Auskunft geben können – wie beispielsweise zunächst einem Abfall und anschließend einem schnellen Anstieg bis zum Ausgangsniveau - der sich derzeit ausschließlich vermuten lässt.

Die Stärken der vorliegenden Studie zeigen sich an der sehr differenzierten Analyse von insgesamt 35 Fraktionen der Lymphozyten, dem Einsatz von altersgematchten Populationen von Patienten und Kontrollpersonen und ihrer Prospektivität, die die klinische Relevanz dieser Arbeit für die zukünftige Anwendung von Immuntherapien unterstreicht. Eine Studie an Erwachsenen mit diesem Spektrum an Lymphozytensubpopulationen bestand in dieser Form bis dato nicht und hebt sich dadurch hervor.

5.5 Ausblick

Immuntherapien basieren größtenteils auf T-Zell-Aktivierung (53) (113). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass T-Lymphozyten nur gering bis nicht durch eine zytostatische Behandlung verringert werden, indem sie zügig zu ihrer annähernd ursprünglichen Zellzahl zurückkehren. Daher könnten sie die Idee einer effektiven Kombination von Chemotherapie und Immuntherapie im Rahmen von parallelen oder sequenziellen Protokollen unterstützen. Allerdings wären Studien mit einer größeren Anzahl an Patienten nötig, um diese Hypothese zu bestätigen und einen Einfluss von versteckten Variablen auszuschließen.

Darüber hinaus könnte untersucht werden, wie bedeutend die Rolle der B-Zellen bei der Checkpoint-Inhibition ist (109) (148). In diesem Zuge wäre es auch sinnvoll, Marker zu entdecken, anhand derer tumorfördernde und tumorhemmende B-Zellen erkannt werden können (109). Zudem werden zunehmend CAR-T-Zell-Therapien z.B. bei Bronchial-, Mamma- und diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen sowie akuter lymphatischer Leukämie bei Kindern eingesetzt (149) (150). In Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren werden sie derzeit diskutiert. CAR-T-Zellen sind autologe T-Zellen, die ex vivo via Gentechnik mit chimären Antigen-Rezeptoren (CAR) ausgestattet werden (149) (150). Später werden sie in den Patienten reimplantiert und mittels CAR können sie an Tumorzellen binden. Durch die Kopplung entwickeln sie sich zu zytotoxischen T-Lymphozyten, die die Krebszellen zerstören (149) (150). Für die Umsetzung solcher Therapien ist auch eine konstante Anzahl an T-Zellen nötig. Unsere Ergebnisse über T-Lymphozyten könnten den Nutzen dieses Behandlungswegs auch bekräftigen.

6 Zusammenfassung

Chemotherapie stellt die grundlegende Säule einer systemischen Behandlung für Patienten mit soliden Tumoren dar. Im Anschluss oder in Kombination zu einer zytostatischen Therapie können neben Radiatio Immuntherapien für Malignome eingesetzt werden. Damit diese ihre Wirkung entfalten können, sind funktionsfähige T-Zellen notwendig. Welchen Einfluss Chemotherapie jedoch im Allgemeinen auf Immunzellen nimmt, ist bisher nicht systematisch erforscht und wurde daher in dieser prospektiven Studie untersucht.

Um das Immunsystem und deren Rolle im Verlauf von Tumorerkrankungen vollständig abzubilden, wurden B-, T- und NK-Lymphozyten und deren Subpopulationen betrachtet. Dafür fand eine Analyse von Blutproben von 26 Patienten mit einem für Tumoren meist typischen Altersmedian von 63 Jahren vor und nach Chemotherapie im Zeitraum von 12 Wochen unter möglichst standardisierten Bedingungen statt. Für eine solche Studie dient die Durchflusszytometrie als Goldstandard.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten die beiden Fragestellungen beantwortet werden. Zum einen wurde eine signifikante Abnahme der gesamten Anzahl an B-Lymphozyten sowie von naiven, Gedächtnis- und klassengewechselten B-Zellen nach dreimonatiger Chemotherapie herausgefunden. Im Gegensatz dazu zeigten sich keine signifikanten Veränderungen von T- und NK-Lymphozyten und deren jeweiligen Subpopulationen nach 12-wöchiger chemotherapeutischer Behandlung. Zum anderen ließen sich Einflüsse von zusätzlichen Parametern wie das Geschlecht des Patienten, Infektionsgeschehen während des Beobachtungszeitraumes, das klinische Ansprechen auf Chemotherapie sowie der Einsatz von G-CSF, Radiatio und Platin besonders bei B-Lymphozyten und deren Fraktionen erkennen.

Warum sich B-Lymphozyten im Vergleich zu T- und NK-Lymphozyten durch Chemotherapie supprimieren lassen, ob es an einer erhöhten Empfindlichkeit für Zytostatika oder an einer langsameren Regenerationsfähigkeit liegt, ist unklar. Die Ergebnisse lassen eine quantitative Erholung von T-Zellen im Zeitraum von drei Monaten vermuten, die konsekutiv einer Immunerhaltungstherapie zur Verfügung stehen können. Diese Hypothese könnte das Konzept einer effektiven Immuntherapie parallel oder sequenziell zu Chemotherapie unterstützen. Um diese zu bestätigen, ist es essenziell, im Weiteren Studien, auch an einer größeren Anzahl an Patienten, durchzuführen.

Summary

Chemotherapy is the backbone of systemic treatment for patients with solid tumors. In addition to radiotherapy, immunotherapy for malignancies can be used subsequent or in combination with cytostatic therapy. Functional T cells are necessary for these to exert their effect. However, the influence of chemotherapy on immune cells in general has not yet been systematically investigated and was therefore examined in this prospective study.

In order to fully map the immune system and its role in the course of tumor diseases, B, T and NK lymphocytes and their subsets were considered. For this purpose, an analysis of blood samples from 26 patients with a median age of 63 years, which is usually typical for tumors, was performed before and after chemotherapy over a period of 12 weeks under conditions that were as standardized as possible. For such a study flow cytometry serves as the gold standard.

The present work was able to answer these two questions. Total number of B lymphocytes as well as naive, memory, and class-switched B cells decreased after three months of chemotherapy. In contrast there were no significant changes in T and NK lymphocytes and their respective subsets after 12 weeks of chemotherapeutic treatment. Furthermore, influences of additional parameters such as the patient's gender, infectious events during the observation period, clinical response to chemotherapy, and the use of G-CSF, radiotherapy, and platinum could be detected especially in B lymphocytes and their subsets.

Why B lymphocytes compared to T and NK lymphocytes can be suppressed by chemotherapy, whether it is due to an increased sensitivity to cytostatic drugs or a slower regenerative capacity, is unclear. The results suggest a quantitative recovery of T cells in the three-month period that may be consecutively available to immunotherapy. This hypothesis may support the concept of effective immunotherapy in parallel or sequential to chemotherapy. Therefore, it is essential to conduct further studies, also in a larger number of patients.

7 Publikation

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Dissertation wurden 2020 im Rahmen einer Publikation in der Fachzeitschrift *Cancer Immunology and Immunotherapy* des Springer Verlags veröffentlicht:

Waidhauser J, Schuh A, Trepel M, Schmälter AK, Rank A. Chemotherapy markedly reduces B cells but not T cells and NK cells in patients with cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2020, 69: 147-157.

<https://doi.org/10.1007/s00262-019-02449-y>

8 Literaturverzeichnis

1. The American Cancer Society. The History of Cancer: Understanding What Cancer Is: Ancient Times To Present: Origin of the word cancer. [Online] 2018. [Zitat vom 09.07.2022] <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/history-of-cancer/what-is-cancer.html>.
2. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016, 53: 441-442.
3. Mackay J et al. The Cancer Atlas. *American Cancer Society*. 2006, 1-69.
4. Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF. Zellen außer Kontrolle - Erkenntnisse aus der Krebsforschung. 2012, 1-14.
5. RKI. Krebs in Deutschland für 2015/2016. 2019, 12: 16-80.
6. Quante et al. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Medicine*. 2016, 5(9): 2649-2656.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, 144: 646-673.
8. Lewandowska AM et al. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med*. 2019, 26(1): 1-7.
9. Neuhouser ML et al. Overweight, Obesity and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk. *JAMA Oncol*. 2015, 1(5): 611-621.
10. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001, 357(9270): 1777-1789.
11. Upadhyay M et al. CD40 Signaling Drives B Lymphocytes Into an Intermediate Memory-Like State, Poised Between Naive and Plasma Cells. *J Cell Physiol*. 2014, 229: 1387-1396.
12. Sims GP et al. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005, 105(11): 4390-4398.
13. Tarlinton D, Good-Jacobson K. Diversity Among Memory B Cells: Origin, Consequences, and Utility. *Science*. 2013, 341(6151): 1205-1211.
14. Chong AS, Sciammas R. Memory B Cells in Transplantation. *Transplantation*. 2015, 99(1): 21-28.
15. Taylor JJ et al. Apoptosis and antigen affinity limit effector cell differentiation of a single naive B cell. *Science*. 2015, 347(6223): 784-787.
16. Klein U et al. Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *J Exp Med*. 1998, 188(9): 1678-1689.
17. Thorarinsdottir K et al. CD21-/low B cells in human blood are memory cells. *Clinical Experimental Immunology*. 2016, 185: 252-262.

18. Maecker HT et al. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. 2012, 12(3): 191-200.
19. Stavnezer J, Schrader CE. Ig heavy chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J Immunol.* 2014, 193(11): 5370-7378.
20. Maiga RI et al. Human CD38hi CD138+ Plasma Cells Can Be Generated In Vitro from CD40-Activated Switched-Memory B Lymphocytes. *Journal of Immunology Research.* 2014, 1-14.
21. Tendeiro R et al. Memory B-cell depletion is a feature of HIV-2 infection even in the absence of detectable viremia. *AIDS.* 2012, 26: 1607-1617.
22. Seifert M, Küppers R. Human memory B cells. *Leukemia.* 2016, 30: 2283-2292.
23. Buffa S et al. B cell immunosenescence: different features of naive and memory B cells in elderly. *Biogerontology.* 2011, 12: 473-483.
24. Kurupati RK et al. Age-related changes in B cell metabolism. *Aging.* 2019, 11(13): 4367-4381.
25. Rösel AL et al. Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and a memory B-cell functionality assay. *J Allergy Clin Immunol.* 2104, 135(1): 198-208.
26. Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018, 24: 6125-6135.
27. Godfrey DI et al. Unconventional T Cell Targets for Cancer Immunotherapy. *Immunity.* 2018, 48: 453-473.
28. Stem Cell Technologies. Frequencies of Cell Types in Human Peripheral Blood. 2019, Version 4.1.0: 1.
29. Strioga M et al. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology.* 2011, 134: 17-32.
30. Sallusto F et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999, 401: 708-712.
31. Förster R et al. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology.* 2008, 8: 362-371.
32. Willinger T et al. Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets. *The Journal of Immunology.* 2005, 175: 5895-5903.
33. Sarkar I et al. T-memory cells against cancer: Remembering the enemy. *Cellular Immunology.* 2019, 338: 27-31.
34. BD Biosciences. Human and Mouse Naive/Memory T-Cell Panels. 2011, 23-13010-00: 1-2.
35. Decrion AZ et al. A subset of functional effector-memory CD8+ T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected patients. *Immunology.* 2007, 121: 405-415.

36. Appay V et al. Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues. *Cytometry Part A*. 2008, 73A: 975-983.
37. Corthay A. How do Regulatory T Cells Work?. *Skandinavian Journal of Immunology*. 2009, 70: 326-336.
38. Shohei H et al. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 2003, 299(5609): 1057-1061.
39. Staats J. Immunophenotyping of Human Regulatory T Cells. *Methods in Molecular Biology*. 2019, 2032: 141-177.
40. Xating et al. Recent advances in CD8+ regulatory T cell research. *Oncology Letters*. 2018, 15: 8187-8194.
41. Kutukculer N et al. CD4+ CD25+ FoxP3+ T regulatory cells, Th1 (CCR5, IL-2, IFN- γ) and Th2 (CCR4, IL-4, IL-13) typ chemokine receptors and intracellular cytokines in children with common variable immunodeficiency. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2016, 29(2): 241-251.
42. Boldt A et al. Eight-Color Immunophenotyping of T-, B-, and NK-Cell Subpopulations for Characterization of Chronic Immunodeficiencies. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*. 2014, 86B: 191-206.
43. Tesmer LA et al. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*. 2008, 223: 87-113.
44. Chichocki F et al. Diversification and Functional Specialization of Human NK Cell Subsets. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2016, 63-93.
45. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: An update and future directions. *J Allergy Clin Immunol*. 2013, 132: 536-544.
46. Resch T et al. The Role of Natural Killer Cells in Humoral Rejection. *Transplantation*. 2015, 99: 1335-1340.
47. Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Fehniger TA. Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells. *J Innate Immun*. 2015, 7: 563-571.
48. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2013, 132: 515-525.
49. Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2015, 8(2): 47-55.
50. Michel T et al. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol*. 2016, 196: 2923-2931.
51. Sadegh L et al. NKT cells act through third party bone marrow-derived cells to suppress NK cell activity in the liver and exacerbate hepatic melanoma metastases. *Int J Cancer*. 2015, 137: 1085-1094.
52. Erdag G et al. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res*. 2012, 72(5): 1070-1080.

53. Muenst S et al. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine*. 2016, 279: 541-562.
54. Avigan D et al. Immune reconstitution following high-dose chemotherapy with stem cell rescue in patients with advanced breast cancer. *Bone Marrow Transplantation*. 2000, 26: 169-176.
55. Kitano S et al. Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients. *Cancer Immunol Res*. 2013, 1(4): 235-244.
56. De la Cruz Merino L et al. Evaluation of changes on tumor-infiltrating lymphocytes and regulatory T-cells in tissue and peripheral blood after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients and relation with pathologic complete response. *Journal of Clinical Oncology*. 2014, 32(15).
57. Van den Brink et al. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematology*. 2015, 215-219.
58. Mikhailova IN et al. Immunoregulatory CD4+ CD25+ t-cells in patients with advanced melanoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Immunologiya*. 2010, 3: 143-146.
59. Kopecky J et al. Immune alteration (NK and T cells) in patient with pancreatic carcinoma with or without chemotherapy. *Supportive Care in Cancer*. 2012, 20(Suppl1): S28.
60. Van Tilburg et al. Immune reconstitution in children following chemotherapy for haematological malignancies: a long-term follow-up. *Br J Haematol*. 2011, 152(2): 201-210.
61. Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 63, 80-89.
62. Engel P et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *The Journal of Immunology*. 2019, 195: 4555-4563.
63. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010, 1(2): 88-94.
64. Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 91-102.
65. Hulspas R et al. Flow cytometry and the stability of Phycoerythrin-tandem dye conjugates. *Cytometry Part A Clinical Cytometry*. 2009, 75(11): 966-972.
66. Schwartz A et al. Formalization of the MESF unit of fluorescence intensity. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*. 2004, 57(1): 1-6.
67. Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 41, 60-79.

68. Immunotech SAS Beckman Coulter. VersaLyse™ Lysing Solution Appendix to Ref A09777. [Online] 2006, 1-3. [Zitat vom: 09.07.2022] https://www.bc-cytometry.com/PDF/DataSheet/A09777_VersaLyse.pdf.
69. Tanada H et al. Evaluation of the automated hematology analyzer ADVIA® 120 for cerebrospinal fluid analysis and usage of unique hemolysis reagent. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014, 36(1): 83-91.
70. Kleine TO et al. Cell analysis in cerebrospinal fluid (CSF) using Sysmex® hematology analyzers XT-4000i and XE-5000: evaluation with CSF controls of the Joint German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). *Cytometry Part A Clinical Cytometry*. 2012, 81(3): 255-264.
71. Keeney M et al. Single Platform Flow Cytometric Absolute CD34+ Cell Counts Based on the ISHAGE Guidelines. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. 1998, 34: 61-70.
72. Brando B et al. Cytofluorometric Methods of Assessing Absolute Numbers of Cell Subsets in Blood. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. 2000, 42: 327-346.
73. Olivero S et al. CD34+ cell enumeration in peripheral blood and apheresis samples, using two laboratory diagnostic kits or an institutional protocol. *Bone Marrow Transplantation*. 1999, 23: 387-394.
74. Immunotech SAS Beckman Coulter. Stem-Kit™ Reagents. [Online] 2003, 1-29. [Zitat vom: 09.07.2022] <https://www.bc-cytometry.com/PDF/DataSheet/IM3630.pdf>.
75. Reimann KA et al. Multisite Comparison of CD4 and CD8 T-Lymphocyte Counting by Single- versus Multiple-Platform Methodologies: Evaluation of Beckman Coulter Flow-Count Fluorespheres and the tetraONE System. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2000, 7: 344-351.
76. Immunotech SAS Beckman Coulter. PerFix-nc Kit Appendix to Ref B31167. [Online] 2015, 1-2. [Zitat vom: 09.07.2022] https://www.bc-cytometry.com/PDF/DataSheet/B10825_D.S.pdf.
77. Herzenberg LA et al. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature Immunology*. 2006, 7(7): 681-685.
78. Jahan-Tigh RR et al. Flow Cytometry. *Journal Of Investigative Dermatology*. 2012, 132(10): e1.
79. De Rosa SC et al. Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells express distinct surface markers and might be developmentally distinct lineages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001, 70(4): 518-526.
80. Macey MG. Flow Cytometry: Principles and Applications. *Humana Press Totowa New Jersey*. 2007, 304-306.
81. Cho SH et al. Review Article: Recent advancements in optofluidic flow cytometer. *Biomicrofluidics*. 2010, 4(4): 1932-1058.

82. Willheim M et al. Einführung in die Durchflusszytometrie. *Austrian Society for Cytometry*. 2017, 1-147.
83. Suthanthiraraj PPA and Graves SW. Fluidics. *Current Protocols in Cytometry*. 2013, 1: 1.2.
84. Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 29-40.
85. Luider J et al. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2004, 10(2): 102-108.
86. Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 41-50.
87. Universität Wien. Kantenfilter. [Online] 2019. [Zitat vom: 30.08.20] https://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluoreszenz_mikroskop/2c_kantenfilter.htm.
88. Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 51-52.
89. Rosa SC et al. 11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature Medicine*. 2001, 7: 245-248.
90. Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 89-90.
91. Streitz M et al. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res*. 2013, 2(1): 17.
92. Van Gent R et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol*. 2009, 133(1): 95-107.
93. Finak G et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep*. 2016, 6: 20686.
94. Thürmann PA. Repräsentation von Frauen in klinischen Studien. *Gender Medicine Congress Heidelberg*. 2008.
95. Walser M, Becton Dickinson AG. Grundlagen der Präanalytik, praxisbezogene Tipps und Hinweise. 2001.
96. Jaye DL et al. Translational Applications of Flow Cytometry in Clinical Practice. *The Journal of Immunology*. 2012, 188: 4715-4719.
97. Vives-Regio J et al. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, 24: 429-488.
98. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005, 51(12): 2415-2418.

99. Hanamsager R et al. An optimized workflow for single-cell transcriptomics and repertoire profiling of purified lymphocytes from clinical samples. *Scientific Reports*. 2219(10): 1-15, 2020.
100. Mizrahi O et al. Quantitative Flow Cytometry: Concerns and Recommendations in Clinic and Research. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*. 2018, 94B: 211-218.
101. Xiao Y et al. CD27 Is Acquired by Primed B Cells at the Centroblast Stage and Promotes Germinal Center Formation. *J Immunol* . 2004, 172: 7432-7441.
102. Rovati B et al. An eight-colour flow cytometric method for the detection of reference values of lymphocyte subsets in selected healthy donors. *Clin Exp Med*. 2014, 14(3): 249-259.
103. Flammiger A et al. Intratumoral T but not B lymphocytes are related to clinical outcome in prostate cancer. *APMIS*. 2012, 120(11): 901-908.
104. Chin Y et al. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Res*. 1992, 12(5): 1463-1466.
105. Coronella-Wood JA, Hersh EM. Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2003, 52: 715-738.
106. Marsigliante S et al. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. *Cancer Letters*. 1999, 139: 33-41.
107. Van der Leun AM et al. CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer*. 2020, 20(4): 218-232.
108. Mei Z et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 2014, 110: 1595-1605.
109. DiLillo DJ et al. B Cells Are Required For Optimal CD4+ and CD8+ T Cell Tumor Immunity: Therapeutic B Cell Depletion Enhances B16 Melanoma Growth in Mice. *J Immunol*. 2010, 184(7): 4006-4016.
110. Li Q et al. In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy. *J Immunol*. 2009, 183(5): 3195-3203.
111. Yuen GJ et al. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer*. 2016, 2(12): 747-757.
112. Jeannot G et al. T and B lymphocytes exert distinct effects on the homeostasis of NK cells. *J Immunol*. 2006, 36: 2725-2734.
113. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016, 39(1): 98-106.
114. Abril-Rodriguez G, Ribas A. SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell*. 2017, 31: 848e1.

115. Dunleavy K et al. B-cell recovery following rituximab-based therapy is associated with perturbations in stromal derived factor-1 and granulocyte homeostasis. *Blood*. 2005, 106(3): 795-802.
116. Verma R et al. Lymphocyte depletion and repopulation after chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2016, 18(10): 1-12.
117. Pesce S et al. PD/1-PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Front Immunol*. 2019, 10: 1242.
118. Nedergaard BS et al. A comparative study of the cellular immune response in patients with stage IB cervical squamous cell carcinoma: Low numbers of several immune cell subtypes are strongly associated with relapse of disease within 5 years. *Gynecol Oncol*. 2008, 108(1): 106-111.
119. Al-Shibli KI et al. Prognostic Effect of Epithelial and Stromal Lymphocyte Infiltration in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008, 14(16): 5220-5227.
120. Bisset LR et al. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*. 2004, 72: 203-212.
121. Wang WJ et al. Variation of Blood T Lymphocyte Subgroups in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013, 14(8): 4671-4679.
122. Graves M, Müschen M. Infection and the perils of B cell activation. *Cancer Discov*. 2015, 5(12): 1244-1246.
123. Cox RJ, Brokstad KA. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19. *Nature*. 2020, 20: 581-582.
124. Santagostino et al. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica*. 1999, 84: 499-504.
125. Jentsch-Ullrich K et al. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults - A monocentric German study. *Clinical Immunology*. 2005, 116: 192-197.
126. Abdullah M et al. Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. *Cellular Immunology*. 2012, 272(2): 214-219.
127. Fan H et al. Gender Differences of B Cell Signature in Healthy Subjects Underlie Disparities in Incidence and Course of SLE Related to Estrogen. *Journal of Immunology Research*. 2014, 1-17.
128. Wichman MW et al. Different immune responses to abdominal surgery in men and women. *Langenbecks Arch Surg*. 2003, 387(11-12): 397-401.
129. Li W et al. Cell-based assays for profiling activity and safety properties of cancer drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2006, 54(3): 313-319.

130. Diederich M. Natural compound inducers of immunogenic cell death. *Arch Pharm Res.* 2019, 42(7): 629-645.
131. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *immune Netw.* 2018, 18(4): e27.
132. Uckun FM et al. Radiation sensitivity of human B-lineage lymphoid precursor cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.* 1991, 21(6): 1553-1560.
133. Nishii K et al. Regulation of the apoptotic response to radiation damage in B cell development. *Cell Death and Differentiation.* 1998, 5: 77-86.
134. Eyrich M et al. Immune function in children under chemotherapy for standard risk acute lymphoblastic leukaemia - a prospective study of 20 paediatric patients. *Br J Haematol.* 2009, 147(3): 360-370.
135. Mackall CL et al. Age, thymopoiesis, and CD4 T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *The New England Journal of Medicine.* 1995, 332(3): 143-149.
136. Weinberg K et al. The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplantat.* 1995, 1(1): 18-23.
137. Mackall CL et al. Distinctions Between CD8+ and CD4+ T-Cell Regenerative Pathways Result in Prolonged T-Cell Subset Imbalance After Intensive Chemotherapy. *Blood.* 1997, 89(10): 3700-3707.
138. Goswami et al. Impaired B cell immunity in acute myeloid leukemia patients after chemotherapy. *J Transl Med.* 2017, 15(155): 1-16.
139. Lin JC et al. Increased percentage of B cells in patients with more advanced hepatocellular carcinoma. *Hum Immunol.* 2010, 71(1): 58-62.
140. Spacek J et al. Immunological examination of peripheral blood in patients with colorectal cancer compared to healthy controls. *Immunol Invest.* 2018, 47(7): 643-653.
141. Schmidt M et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2008, 69(13): 5405-5413.
142. Inoue S et al. Inhibitory Effects of B Cells on Antitumor Immunity. *Cancer Res.* 2006, 66(15): 7741-7747.
143. Shah S et al. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: Inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int J Cancer.* 2005, 117: 574-486.
144. Eerola AK et al. Tumour infiltrating lymphocytes in relation to tumour angiogenesis, apoptosis and prognosis in patients with large cell lung carcinoma. *Lung Cancer.* 1999, 26: 73-83.
145. Zhang L et al. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2003, 348: 203-213.
146. Pagés F et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis and Survival in Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2005, 353: 2654-2666.

147. Choi J et al. Diagnostic value of peripheral blood immune profiling in colorectal cancer. *Ann Surg Treat Res.* 2018, 94(6): 312-321.
148. Fessas P et al. A molecular and preclinical comparison of the PD-1-targeted T-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab. *Semin Oncol.* 2017, 44(2): 136-140.
149. Liu E et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med.* 2020, 382: 545-553.
150. Cherkassky et al. Human Car T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest.* 2016, 126(8): 3130-3144.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Abb. 1:
RKI. Krebs in Deutschland für 2015/2016. 2019, 12: 75, Abb. 3.16.2.
2. Abb. 2:
RKI. Krebs in Deutschland für 2015/2016. 2019, 12: 17, Abb. 3.0.1.
3. Tab. 1:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: BD Biosciences. Human and Mouse Naïve/Memory T-Cell Panels. 2011, 23-13010-00: 1-2, Tab. 1; Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 58-60 Tab 6.
4. Abb. 3:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: Zündorf I, Dingermann T. MS – „Therapiedurchbruch“ mit Ocrelizumab?. *DAZ*. 2016, 10: 36.
5. Abb. 4:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: Restifo NP. Big bang theory of stem-like T-cells confirmed. *Blood*. 2014, 124(4): 476-477.
6. Tab. 2:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: BD Biosciences. Human and Mouse Naïve/Memory T-Cell Panels. 2011, 23-13010-00: 1-2, Tab. 1.
7. Tab. 3:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: BD Biosciences. Human and Mouse Naïve/Memory T-Cell Panels. 2011, 23-13010-00: 1-2, Tab. 1.
8. Abb. 5:
Maecker HT et al. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. 2012, 12(3): 191-200, Abb. 2.
9. Abb. 6:
Selbst aufgenommenes Foto
10. Abb. 7:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: Universität Wien. Direkte Immunfluoreszenz. https://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluorochrome/4b_direkteIF.htm. 2019.
11. Tab. 4:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: Urbanowicz RA et al. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respiratory Research*. 2010, 11(76): 3 Tab. 2.; Weit N (Beckman Coulter). Studienpanel. *Spezielle Hämatologie*. 2016.; Beckman Coulter, 2011, Antibodies, 2-49.

12. Tab. 5:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 91, Tab. 6.
13. Abb. 8:
Selbst aufgenommene Fotos
14. Abb. 9:
Selbst aufgenommenes Foto
15. Abb. 10:
Selbst aufgenommenes Foto
16. Tab. 6:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: Weit N (Beckman Coulter). Studienpanel. *Spezielle Hämatologie*. 2016.
17. Abb. 11:
Beckman Coulter, Inc. Cytomics FC 500 With CXP Software Instructions for Use PN6249238. 2004, 4-2.
18. Abb. 12:
Beckman Coulter, Inc. Cytomics FC 500 With CXP Software Instructions for Use PN6249238. 2004, 4-2, 4-3.
19. Abb. 13:
Bearbeitet; Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 30, Abb. 2.
20. Abb. 14:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 30, Abb. 1.;
Willheim M et al. Einführung in die Durchflusszytometrie. *Austrian Society for Cytometry*. 2017, 19.
21. Abb. 15:
Beckman Coulter, Inc. Cytomics FC 500 With CXP Software Instructions for Use PN6249238. 2004, 5-5.
22. Abb. 16:
Beckman Coulter, Inc. Cytomics FC 500 With CXP Software Instructions for Use PN6249238. 2004, 5-6.
23. Abb. 17:
Selbst erstellt; in Anlehnung an: Beckman Coulter, Inc. Cytomics FC 500 With CXP Software Instructions for Use PN6249238. 2004, 5-10; Bushnell T. The Difference Between Linear And Log Displays In Flow Cytometry.

<https://expert.cheekyscientist.com/the-difference-between-linear-and-log-displays-in-flow-cytometry>. 2015, Abb. 2.

24. Abb. 18:

Hegemann J. Multiparameteranalyse. <https://www.genomforschung.hhu.de/facs-facility/protokolle-und-problemloesungen/multiparameteranalyse.html>. 2022, Abb. 2.

25. Abb. 19:

Selbst erstellt.

26. Abb. 20:

Selbst erstellt; in Anlehnung an: Sack U et al. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007, 52 Abb. 13.

27. Abb. 21:

Selbst erstellt.

28. Tab. 7:

Selbst erstellt.

29. Abb. 22:

Selbst erstellt.

30. Tab. 8:

Selbst erstellt.

31. Abb. 23:

Selbst erstellt.

32. Tab. 9:

Selbst erstellt.

33. Tab. 10:

Selbst erstellt.

34. Abb. 24:

Selbst erstellt

35. Abb. 25:

Selbst erstellt

36. Tab. 11:

Selbst erstellt.

37. Tab. 12:

Selbst erstellt.

38. Tab. 13:

Selbst erstellt.

39. Abb. 26:

Selbst erstellt.

40. Abb. 27:
Selbst erstellt.
41. Tab. 14:
Selbst erstellt.
42. Abb. 28:
Selbst erstellt.
43. Tab. 15 A-C:
Selbst erstellt.
44. Tab. 16 A, B1, B2, C:
Selbst erstellt.
45. Abb. 29:
Selbst erstellt.
46. Abb. 30:
Selbst erstellt.
47. Abb. 31:
Selbst erstellt.
48. Abb. 32:
Selbst erstellt.
49. Abb. 33:
Selbst erstellt.
50. Abb. 34:
Selbst erstellt.
51. Abb. 35:
Selbst erstellt.
52. Abb. 36:
Selbst erstellt.
53. Abb. 37:
Selbst erstellt.
54. Abb. 38:
Selbst erstellt.
55. Abb. 39:
Selbst erstellt.
56. Abb. 40:
Selbst erstellt.
57. Abb. 41:
Selbst erstellt.

10 Anhang

10.1 Ethikvotum



KLINIKUM AUGSBURG

Beratungskommission
für klinische Forschung - BKF

Klinikum Augsburg
Lehrkrankenhaus der LMU München

Klinikum Augsburg, Beratungskommission
Stenglinstraße 2, 86156 Augsburg

PD. Dr. A. Rank
II. Medizinische Klinik
Klinikum Augsburg

Vorsitzende:
Prof. Dr. med. Julia Welzel
Dr. med. Stefanie Grützner

Zentrale Studienassistentin:
Franziska Knieler

Telefon: 0821 - 400 3715
Telefax: 0821 - 400 3717
e-mail:
franziska.knieler@klinikum-augsburg.de

10.07.2016

Begutachtung der Studie 2016/09

Zellulärer Immunstatus von Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung

Eingereicht bei der Beratungskommission klinische Forschung am 16.05.2016

Projektleiter:
PD. Dr. A. Rank
II. Medizinische Klinik
Klinikum Augsburg

Gutachter:
Dr. med. D. Dunstheimer
Dr. med. Schimmel
Dr. med. Grützner

Fallzahl/Statistik: 80, Wilcoxon Test für verbundene Stichproben.

Einschluss- Ausschlusskriterien: klar definiert

Aufklärung/Patienteninformation: liegen den Unterlagen bei und sind nicht zu beanstanden.

Datenschutz: pseudonymisiert, keine Bedenken.

Finanzierung: entfällt

Ethische Gesichtspunkte/Probleme: keine Bedenken

Sonstige Anmerkungen: keine

Beurteilung:

Es handelt sich um eine prospektive Studie mit klarer Zielsetzung und klinisch relevanten Gewinn.

Es bestehen keine prinzipiellen oder ethischen Bedenken gegen die genannte Studie.
Das Beratungsverfahren ist hiermit abgeschlossen.

Augsburg, den 10.07.2016 Dr. S. Grützner



10.2 Statistische Auswertung

Anhang Tab. 4: Alle Subpopulationen der verschiedenen Lymphozyten während Chemotherapie unter Betrachtung unterschiedlicher Gesichtspunkte

A) Frauen vs. Männer

	Männer (n=14)			p-Wert	Frauen (n=12)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie			Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
B-Lymphozyten							
B Lymphozyten	0.059 [0.024; 0.148]	0.046 [0.025; 0.066]	0.039	0.105 [0.071; 0.184]	0.060 [0.023; 0.134]	0.017	
naiv	0.031 [0.010; 0.083]	0.021 [0.011; 0.041]	0.064	0.067 [0.044; 0.136]	0.044 [0.014; 0.094]	0.007	
Gedächtnis	0.003 [0.001; 0.005]	0.002 [0.001; 0.005]	0.087	0.006 [0.003; 0.013]	0.003 [0.001; 0.004]	0.005	
klassengewechselt	0.010 [0.003; 0.021]	0.004 [0.002; 0.012]	0.101	0.012 [0.006; 0.022]	0.007 [0.004; 0.015]	0.059	
transitorisch	0.001 [0.000; 0.004]	0.000 [0.000; 0.003]	0.814	0.003 [0.001; 0.005]	0.001 [0.000; 0.002]	0.139	
CD8+ T-Lymphozyten							
CD8+ T-Lymphozyten	0.198 [0.089; 0.311]	0.206 [0.099; 0.265]	0.638	0.247 [0.134; 0.483]	0.300 [0.156; 0.449]	0.937	
CD4+CD8+	0.005 [0.001; 0.010]	0.003 [0.001; 0.010]	0.807	0.006 [0.002; 0.016]	0.004 [0.003; 0.013]	0.272	
Gedächtnis	0.054 [0.039; 0.110]	0.063 [0.033; 0.128]	0.510	0.096 [0.039; 0.145]	0.105 [0.071; 0.150]	0.583	
zentrale Gedächtnis	0.025 [0.015; 0.067]	0.024 [0.016; 0.036]	0.433	0.031 [0.013; 0.058]	0.030 [0.017; 0.053]	0.308	
naiv	0.039 [0.012; 0.091]	0.034 [0.014; 0.048]	0.084	0.044 [0.021; 0.102]	0.042 [0.022; 0.139]	0.583	
Effektor-Gedächtnis	0.048 [0.035; 0.068]	0.051 [0.026; 0.102]	0.551	0.103 [0.037; 0.136]	0.080 [0.058; 0.121]	0.937	
EMRA	0.036 [0.022; 0.106]	0.056 [0.028; 0.097]	0.975	0.065 [0.029; 0.192]	0.087 [0.035; 0.157]	0.754	
früh	0.074 [0.035; 0.168]	0.068 [0.045; 0.122]	0.730	0.112 [0.057; 0.271]	0.121 [0.068; 0.241]	0.272	
intermediär	0.001 [0.005; 0.012]	0.014 [0.006; 0.015]	0.245	0.017 [0.008; 0.028]	0.031 [0.009; 0.045]	0.158	
spät	0.043 [0.020; 0.120]	0.054 [0.022; 0.114]	0.433	0.044 [0.029; 0.126]	0.058 [0.026; 0.159]	0.530	
erschöpft	0.049 [0.030; 0.084]	0.058 [0.031; 0.098]	0.638	0.076 [0.041; 0.199]	0.099 [0.053; 0.147]	0.480	
terminale Effektor	0.036 [0.015; 0.105]	0.032 [0.012; 0.090]	0.109	0.030 [0.022; 0.116]	0.046 [0.019; 0.135]	0.937	
HLA-DR+	0.049 [0.026; 0.106]	0.074 [0.025; 0.120]	0.826	0.092 [0.039; 0.207]	0.123 [0.039; 0.202]	0.583	
CD69+	0.027 [0.011; 0.118]	0.031 [0.017; 0.085]	0.331	0.040 [0.029; 0.060]	0.056 [0.030; 0.080]	0.388	
regulatorisch	0.001 [0.000; 0.003]	0.001 [0.000; 0.001]	0.530	0.000 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.003]	0.333	
CD25+	0.000 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	0.363	0.001 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	0.433	
CD4+ T-Lymphozyten							
CD4+ T-Lymphozyten	0.435 [0.322; 0.801]	0.384 [0.177; 0.655]	0.109	0.690 [0.394; 0.987]	0.496 [0.297; 0.918]	0.583	
Gedächtnis	0.282 [0.172; 0.459]	0.290 [0.153; 0.325]	0.158	0.418 [0.251; 0.591]	0.346 [0.179; 0.587]	0.638	
zentrale Gedächtnis	0.199 [0.126; 0.336]	0.170 [0.075; 0.256]	0.096	0.252 [0.135; 0.342]	0.192 [0.113; 0.353]	0.480	
naiv	0.153 [0.048; 0.330]	0.104 [0.031; 0.260]	0.198	0.251 [0.070; 0.398]	0.127 [0.058; 0.360]	0.117	
Effektor-Gedächtnis	0.086 [0.050; 0.153]	0.082 [0.068; 0.127]	0.594	0.155 [0.111; 0.233]	0.200 [0.064; 0.254]	0.814	
EMRA	0.003 [0.001; 0.012]	0.004 [0.001; 0.016]	0.470	0.014 [0.005; 0.028]	0.008 [0.003; 0.025]	0.638	
HLA-DR+	0.051 [0.039; 0.068]	0.046 [0.037; 0.068]	0.683	0.071 [0.048; 0.114]	0.058 [0.031; 0.180]	0.814	
CD69+	0.043 [0.037; 0.068]	0.035 [0.020; 0.043]	0.074	0.068 [0.034; 0.124]	0.053 [0.021; 0.109]	0.182	
Th1	0.021 [0.014; 0.048]	0.023 [0.011; 0.038]	0.173	0.052 [0.027; 0.075]	0.056 [0.016; 0.081]	0.433	
Th2	0.047 [0.017; 0.091]	0.041 [0.021; 0.070]	0.650	0.058 [0.028; 0.092]	0.046 [0.024; 0.103]	0.937	
Th17	0.032 [0.016; 0.048]	0.033 [0.023; 0.047]	0.861	0.036 [0.021; 0.058]	0.027 [0.012; 0.104]	0.695	
regulatorisch	0.024 [0.010; 0.044]	0.012 [0.007; 0.034]	0.048	0.027 [0.021; 0.050]	0.015 [0.010; 0.035]	0.530	
CD25+	0.005 [0.003; 0.011]	0.008 [0.003; 0.012]	0.778	0.012 [0.007; 0.016]	0.012 [0.008; 0.019]	0.308	
CD4/CD8	2.211 [1.758; 4.899]	1.778 [1.231; 3.765]	0.272	2.813 [1.535; 3.699]	1.854 [1.353; 3.334]	0.182	
NK-Zellen							
NK-Zellen	0.127 [0.080; 0.283]	0.126 [0.065; 0.292]	0.701	0.133 [0.114; 0.194]	0.128 [0.082; 0.192]	0.530	
CD56+CD16+	0.032 [0.018; 0.120]	0.047 [0.016; 0.079]	0.182	0.039 [0.016; 0.064]	0.019 [0.006; 0.067]	0.239	
CD56bright CD16dim	0.003 [0.000; 0.006]	0.003 [0.001; 0.008]	0.158	0.003 [0.001; 0.007]	0.003 [0.001; 0.005]	0.530	
CD56dim CD16bright	0.004 [0.002; 0.015]	0.006 [0.002; 0.010]	0.875	0.004 [0.003; 0.018]	0.007 [0.001; 0.009]	0.388	
NKT	0.044 [0.025; 0.129]	0.061 [0.024; 0.084]	0.650	0.047 [0.025; 0.082]	0.025 [0.014; 0.079]	0.754	

B) Mit vs. ohne Verwendung von G-CSF

	mit Verwendung von G-CSF (n=15)			p-Wert	ohne Verwendung von G-CSF (n=11)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie			Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
B-Lymphozyten							
B-Lymphozyten	0.070 [0.028; 0.104]	0.038 [0.013; 0.054]	0.013	0.145 [0.048; 0.190]	0.070 [0.044; 0.134]	0.022	
naiv	0.041 [0.013; 0.059]	0.021 [0.005; 0.036]	0.019	0.084 [0.028; 0.148]	0.053 [0.017; 0.094]	0.017	
Gedächtnis	0.003 [0.001; 0.007]	0.002 [0.001; 0.003]	0.019	0.006 [0.003; 0.014]	0.004 [0.002; 0.005]	0.013	
klassengewechselt	0.006 [0.003; 0.015]	0.004 [0.002; 0.006]	0.055	0.018 [0.009; 0.032]	0.010 [0.006; 0.020]	0.074	
transitorisch	0.001 [0.000; 0.004]	0.000 [0.000; 0.004]	0.754	0.003 [0.000; 0.005]	0.005 [0.000; 0.002]	0.169	
CD8+ T-Lymphozyten							
CD8+ T-Lymphozyten	0.221 [0.084; 0.314]	0.217 [0.100; 0.300]	0.776	0.206 [0.186; 0.460]	0.284 [0.189; 0.344]	0.929	
CD4+CD8+	0.004 [0.001; 0.011]	0.004 [0.001; 0.015]	0.730	0.007 [0.002; 0.017]	0.003 [0.002; 0.011]	0.131	
Gedächtnis	0.052 [0.034; 0.110]	0.079 [0.034; 0.121]	0.078	0.104 [0.053; 0.134]	0.093 [0.034; 0.164]	0.929	
zentrale Gedächtnis	0.022 [0.007; 0.061]	0.023 [0.015; 0.055]	0.363	0.034 [0.027; 0.084]	0.025 [0.023; 0.046]	0.286	
naiv	0.035 [0.012; 0.089]	0.033 [0.008; 0.037]	0.112	0.047 [0.031; 0.097]	0.059 [0.028; 0.116]	0.790	
Effektor-Gedächtnis	0.048 [0.033; 0.106]	0.066 [0.030; 0.123]	0.334	0.079 [0.039; 0.144]	0.079 [0.027; 0.118]	0.534	
EMRA	0.034 [0.020; 0.120]	0.056 [0.025; 0.120]	0.910	0.056 [0.038; 0.102]	0.068 [0.037; 0.146]	0.722	
früh	0.068 [0.036; 0.178]	0.073 [0.049; 0.158]	0.776	0.137 [0.070; 0.165]	0.224 [0.063; 0.229]	0.248	
intermediär	0.011 [0.005; 0.017]	0.014 [0.006; 0.017]	0.112	0.010 [0.009; 0.029]	0.015 [0.010; 0.037]	0.477	
spät	0.032 [0.020; 0.142]	0.039 [0.016; 0.119]	0.609	0.052 [0.034; 0.108]	0.054 [0.035; 0.163]	0.722	
erschöpft	0.051 [0.032; 0.079]	0.058 [0.035; 0.128]	0.910	0.084 [0.038; 0.195]	0.095 [0.057; 0.115]	0.657	
terminale Effektor	0.037 [0.016; 0.116]	0.022 [0.009; 0.101]	0.088	0.030 [0.022; 0.085]	0.038 [0.023; 0.111]	0.929	
HLA-DR+	0.093 [0.016; 0.139]	0.091 [0.021; 0.157]	0.955	0.062 [0.032; 0.092]	0.074 [0.035; 0.137]	0.424	
CD69+	0.041 [0.014; 0.075]	0.046 [0.019; 0.076]	0.955	0.035 [0.027; 0.057]	0.040 [0.023; 0.081]	0.929	
regulatorisch	0.000 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.002]	0.929	0.001 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.002]	0.859	
CD25+	0.000 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	0.256	0.001 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.001]	0.248	

	mit Verwendung von G-CSF (n=15)			ohne Verwendung von G-CSF (n=11)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD4+ T-Lymphozyten						
CD4+ T-Lymphozyten	0.453 [0.189; 0.700]	0.374 [0.168; 0.667]	0.363	0.718 [0.388; 1.162]	0.590 [0.437; 0.716]	0.213
Gedächtnis	0.282 [0.133; 0.482]	0.288 [0.113; 0.328]	0.733	0.435 [0.296; 0.665]	0.315 [0.255; 0.444]	0.213
zentrale Gedächtnis	0.199 [0.073; 0.301]	0.165 [0.057; 0.254]	0.256	0.235 [0.178; 0.469]	0.230 [0.127; 0.298]	0.182
naiv	1.242 [0.049; 0.327]	0.056 [0.017; 0.137]	0.047	0.276 [0.088; 0.370]	0.225 [0.085; 0.308]	0.534
Effektor-Gedächtnis	0.101 [0.050; 0.184]	0.082 [0.061; 0.187]	0.334	0.142 [0.109; 0.254]	0.118 [0.081; 0.203]	0.182
EMRA	0.006 [0.001; 0.012]	0.003 [0.002; 0.005]	0.334	0.017 [0.004; 0.022]	0.016 [0.006; 0.031]	0.286
HLA-DR+	0.050 [0.038; 0.080]	0.045 [0.036; 0.070]	0.776	0.068 [0.055; 0.095]	0.047 [0.037; 0.172]	0.374
CD69+	0.040 [0.020; 0.091]	0.035 [0.024; 0.042]	0.334	0.053 [0.035; 0.126]	0.046 [0.019; 0.073]	0.050
Th1	0.021 [0.016; 0.045]	0.020 [0.010; 0.037]	0.300	0.055 [0.044; 0.082]	0.047 [0.023; 0.084]	0.213
Th2	0.041 [0.016; 0.096]	0.037 [0.011; 0.070]	0.875	0.062 [0.029; 0.085]	0.053 [0.027; 0.102]	0.534
Th17	0.032 [0.019; 0.058]	0.031 [0.010; 0.047]	0.826	0.033 [0.020; 0.051]	0.028 [0.024; 0.059]	1.0
regulatorisch	0.020 [0.012; 0.042]	0.013 [0.010; 0.040]	0.156	0.028 [0.021; 0.050]	0.011 [0.009; 0.020]	0.328
CD25+	0.008 [0.003; 0.022]	0.008 [0.007; 0.018]	0.211	0.008 [0.006; 0.013]	0.009 [0.003; 0.012]	1.0
CD4/CD8	0.258 [1.723; 3.547]	1.685 [1.119; 3.504]	0.281	3.482 [1.571; 3.970]	1.872 [1.343; 3.463]	0.213

	mit Verwendung von G-CSF (n=15)			ohne Verwendung von G-CSF (n=11)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
NK-Zellen						
NK-Zellen	0.131 [0.086; 0.232]	0.133 [0.074; 0.256]	0.683	0.131 [0.099; 0.270]	0.126 [0.064; 0.200]	0.534
CD56+CD16+	0.031 [0.016; 0.099]	0.028 [0.009; 0.055]	0.033	0.039 [0.023; 0.068]	0.049 [0.016; 0.074]	0.722
CD56bright CD16dim	0.003 [0.000; 0.005]	0.003 [0.001; 0.006]	0.507	0.003 [0.000; 0.007]	0.004 [0.002; 0.011]	0.790
CD56dim CD16bright	0.004 [0.002; 0.021]	0.004 [0.003; 0.018]	0.249	0.004 [0.003; 0.018]	0.007 [0.004; 0.013]	0.790
NKT	0.046 [0.022; 0.116]	0.037 [0.014; 0.072]	0.177	0.046 [0.028; 0.087]	0.066 [0.025; 0.084]	0.790

C) Chemotherapie mit Platin vs. ohne Platin

	Chemotherapie mit Platin (n=19)			Chemotherapie ohne Platin (n=7)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
B-Lymphozyten						
B-Lymphozyten	0.073 [0.039; 0.158]	0.045 [0.018; 0.079]	0.002	0.109 [0.048; 0.166]	0.072 [0.049; 0.118]	0.138
naiv	0.042 [0.021; 0.138]	0.023 [0.009; 0.046]	0.003	0.065 [0.020; 0.102]	0.056 [0.020; 0.077]	0.138
Gedächtnis	0.003 [0.001; 0.007]	0.002 [0.001; 0.004]	0.007	0.006 [0.003; 0.012]	0.004 [0.002; 0.004]	0.043
klassengewechselt	0.001; 0.005; 0.018]	0.004 [0.003; 0.008]	0.018	0.010 [0.009; 0.032]	0.012 [0.006; 0.019]	0.345
transitorisch	0.002 [0.000; 0.005]	0.000 [0.000; 0.002]	0.287	0.001 [0.002; 0.003]	0.001 [0.000; 0.002]	0.893

	Chemotherapie mit Platin (n=19)			Chemotherapie ohne Platin (n=7)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD8+ T-Lymphozyten						
CD8+ T-Lymphozyten	0.241 [0.141; 0.384]	0.253 [0.126; 0.315]	0.243	0.194 [0.087; 0.206]	0.220 [0.094; 0.644]	0.237
CD4+CD8+	0.008 [0.002; 0.017]	0.005 [0.003; 0.015]	0.601	0.002 [0.001; 0.005]	0.002 [0.001; 0.003]	0.249
Gedächtnis	0.088 [0.044; 0.133]	0.079 [0.044; 0.114]	0.601	0.055 [0.023; 0.124]	0.120 [0.022; 0.164]	0.499
zentrale Gedächtnis	0.028 [0.017; 0.076]	0.025 [0.015; 0.058]	0.243	0.028 [0.001; 0.045]	0.025 [0.016; 0.035]	0.499
naiv	0.042 [0.015; 0.101]	0.034 [0.017; 0.064]	0.314	0.043 [0.018; 0.049]	0.035 [0.016; 0.072]	1.00
Effektor-Gedächtnis	0.062 [0.045; 0.110]	0.067 [0.031; 0.092]	0.841	0.039 [0.018; 0.101]	0.118 [0.021; 0.154]	0.398
EMRA	0.063 [0.022; 0.120]	0.068 [0.025; 0.119]	0.295	0.038 [0.023; 0.056]	0.068 [0.032; 0.397]	0.063
früh	0.132 [0.055; 0.180]	0.082 [0.053; 0.211]	0.334	0.076 [0.038; 0.139]	0.063 [0.027; 0.114]	0.735
intermediär	0.012 [0.008; 0.020]	0.014 [0.007; 0.017]	0.260	0.009 [0.004; 0.017]	0.017 [0.008; 0.037]	0.176
spät	0.054 [0.020; 0.142]	0.039 [0.023; 0.119]	0.099	0.035 [0.025; 0.108]	0.078 [0.052; 0.496]	0.128
erschöpft	0.073 [0.035; 0.105]	0.065 [0.036; 0.104]	0.629	0.038 [0.030; 0.112]	0.115 [0.021; 0.160]	0.735
terminale Effektor	0.037 [0.022; 0.116]	0.027 [0.011; 0.101]	0.013	0.023 [0.019; 0.085]	0.046 [0.023; 0.244]	0.176
HLA-DR+	0.092 [0.042; 0.139]	0.074 [0.035; 0.137]	0.469	0.033 [0.029; 0.070]	0.108 [0.026; 0.479]	0.063
CD69+	0.039 [0.018; 0.075]	0.037 [0.023; 0.071]	0.546	0.035 [0.011; 0.057]	0.068 [0.010; 0.123]	0.398
regulatorisch	0.001 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.002]	0.820	0.000 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.002]	0.735
CD25+	0.001 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	0.717	0.000 [0.000; 0.002]	0.000 [0.000; 0.001]	0.735

	Chemotherapie mit Platin (n=19)			Chemotherapie ohne Platin (n=7)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD4+ T-Lymphozyten						
CD4+ T-Lymphozyten	0.519 [0.379; 0.888]	0.442 [0.192; 0.667]	0.107	0.650 [0.330; 0.773]	0.653 [0.250; 0.716]	0.735
Gedächtnis	0.296 [0.227; 0.501]	0.301 [0.137; 0.376]	0.171	0.324 [0.223; 0.441]	0.301 [0.158; 0.444]	0.735
zentrale Gedächtnis	0.199 [0.132; 0.357]	0.174 [0.064; 0.296]	0.099	0.235 [0.144; 0.322]	0.230 [0.111; 0.262]	0.499
naiv	0.124 [0.053; 0.338]	0.074 [0.034; 0.225]	0.024	0.276 [0.088; 0.300]	0.244 [0.085; 0.308]	0.866
Effektor-Gedächtnis	0.123 [0.062; 0.205]	0.083 [0.065; 0.203]	0.520	0.115 [0.079; 0.165]	0.118 [0.079; 0.197]	1.0
EMRA	0.008 [0.002; 0.017]	0.004 [0.002; 0.016]	0.421	0.008 [0.004; 0.021]	0.010 [0.006; 0.031]	0.237
HLA-DR+	0.055 [0.044; 0.080]	0.044 [0.036; 0.070]	0.334	0.068 [0.028; 0.095]	0.072 [0.045; 0.175]	0.499
CD69+	0.049 [0.027; 0.116]	0.032 [0.019; 0.042]	0.027	0.053 [0.032; 0.172]	0.071 [0.035; 0.077]	0.499
Th1	0.040 [0.018; 0.053]	0.023 [0.011; 0.041]	0.048	0.066 [0.018; 0.082]	0.052 [0.014; 0.084]	1.0
Th2	0.051 [0.022; 0.096]	0.038 [0.021; 0.082]	0.879	0.049 [0.029; 0.085]	0.053 [0.024; 0.074]	0.612
Th17	0.037 [0.025; 0.058]	0.031 [0.019; 0.047]	0.349	0.022 [0.017; 0.040]	0.032 [0.022; 0.059]	0.310
regulatorisch	0.028 [0.015; 0.050]	0.012 [0.009; 0.031]	0.036	0.024 [0.020; 0.046]	0.020 [0.010; 0.079]	0.866
CD25+	0.008 [0.005; 0.016]	0.009 [0.007; 0.014]	0.445	0.008 [0.004; 0.013]	0.008 [0.002; 0.015]	0.735
CD4/CD8	2.084 [1.571; 3.547]	2.872 [1.343; 3.475]	0.243	3.800 [2.258; 4.928]	1.776 [1.111; 4.083]	0.310

	Chemotherapie mit Platin (n=19)			Chemotherapie ohne Platin (n=7)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
NK-Zellen						
NK-Zellen	0.152 [0.104; 0.296]	0.126 [0.069; 0.256]	0.122	0.109 [0.087; 0.137]	0.129 [0.115; 0.209]	0.310
CD56+CD16+	0.029 [0.016; 0.090]	0.019 [0.011; 0.051]	0.006	0.047 [0.027; 0.089]	0.072 [0.028; 0.078]	0.600
CD56bright CD16dim	0.003 [0.000; 0.005]	0.003 [0.001; 0.006]	0.420	0.005 [0.001; 0.012]	0.003 [0.002; 0.013]	0.753
CD56dim CD16bright	0.004 [0.002; 0.019]	0.006 [0.001; 0.009]	0.248	0.004 [0.003; 0.018]	0.006 [0.002; 0.020]	0.463
NKT	0.044 [0.022; 0.110]	0.027 [0.015; 0.072]	0.064	0.062 [0.029; 0.110]	0.084 [0.037; 0.159]	0.463

D) Remissionsstatus: CR + PR vs. SD + PD

	CR + PR (n=11)			SD + PD (n=15)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
B-Lymphozyten						
B-Lymphozyten	0.082 [0.073; 0.181]	0.049 [0.038; 0.106]	0.041	0.066 [0.036; 0.158]	0.044 [0.017; 0.110]	0.006
naiv	0.058 [0.022; 0.145]	0.025 [0.016; 0.051]	0.026	0.041 [0.020; 0.102]	0.028 [0.007; 0.086]	0.012
Gedächtnis	0.004 [0.003; 0.007]	0.003 [0.002; 0.005]	0.091	0.003 [0.001; 0.013]	0.001 [0.001; 0.004]	0.005
klassengewechselt	0.015 [0.009; 0.029]	0.009 [0.004; 0.020]	0.213	0.008 [0.003; 0.015]	0.004 [0.002; 0.006]	0.012
transitorisch	0.001 [0.000; 0.003]	0.000 [0.000; 0.002]	0.799	0.003 [0.001; 0.005]	0.000 [0.000; 0.002]	0.272

	CR + PR (n=11)			SD + PD (n=15)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD8+ T-Lymphozyten						
CD8+ T-Lymphozyten	0.241 [0.201; 0.314]	0.300 [0.216; 0.393]	0.155	0.178 [0.084; 0.482]	0.161 [0.080; 0.284]	0.156
CD4+CD8+	0.008 [0.002; 0.017]	0.005 [0.003; 0.018]	0.594	0.003 [0.001; 0.010]	0.003 [0.001; 0.006]	0.056
Gedächtnis	0.109 [0.055; 0.134]	0.121 [0.076; 0.182]	0.091	0.049 [0.029; 0.104]	0.070 [0.030; 0.105]	0.650
zentrale Gedächtnis	0.048 [0.027; 0.076]	0.036 [0.025; 0.058]	0.534	0.021 [0.007; 0.039]	0.017 [0.012; 0.028]	0.281
naiv	0.042 [0.029; 0.088]	0.037 [0.027; 0.064]	0.722	0.043 [0.015; 0.101]	0.034 [0.016; 0.079]	0.394
Effektor-Gedächtnis	0.064 [0.053; 0.113]	0.100 [0.063; 0.154]	0.091	0.046 [0.024; 0.106]	0.055 [0.026; 0.080]	0.363
EMRA	0.063 [0.034; 0.120]	0.105 [0.068; 0.121]	0.075	0.042 [0.022; 0.087]	0.044 [0.025; 0.068]	0.256
früh	0.145 [0.070; 0.178]	0.110 [0.072; 0.229]	0.929	0.068 [0.036; 0.139]	0.064 [0.027; 0.129]	0.125
intermediär	0.010 [0.006; 0.012]	0.015 [0.013; 0.031]	0.033	0.015 [0.005; 0.020]	0.012 [0.006; 0.017]	0.570
spät	0.074 [0.032; 0.155]	0.096 [0.054; 0.247]	0.477	0.035 [0.020; 0.079]	0.033 [0.023; 0.105]	0.334
erschöpft	0.073 [0.050; 0.084]	0.095 [0.057; 0.151]	0.328	0.038 [0.032; 0.112]	0.059 [0.027; 0.104]	0.211
terminale Effektor	0.093 [0.019; 0.141]	0.066 [0.023; 0.144]	0.859	0.026 [0.022; 0.046]	0.022 [0.011; 0.055]	0.233
HLA-DR+	0.094 [0.042; 0.139]	0.114 [0.074; 0.217]	0.131	0.053 [0.016; 0.093]	0.048 [0.020; 0.135]	0.496
CD69+	0.041 [0.029; 0.198]	0.076 [0.026; 0.129]	0.859	0.029 [0.011; 0.055]	0.037 [0.010; 0.065]	0.865
regulatorisch	0.001 [0.000; 0.004]	0.001 [0.000; 0.003]	0.646	0.000 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	0.695
CD25+	0.001 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.001]	0.286	0.000 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	0.256

	CR + PR (n=11)			SD + PD (n=15)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD4+ T-Lymphozyten						
CD4+ T-Lymphozyten	0.650 [0.388; 0.888]	0.590 [0.252; 0.716]	0.328	0.519 [0.299; 0.773]	0.437 [0.181; 0.661]	0.233
Gedächtnis	0.358 [0.296; 0.591]	0.328 [0.193; 0.444]	0.477	0.282 [0.197; 0.482]	0.288 [0.154; 0.322]	0.256
zentrale Gedächtnis	0.268 [0.199; 0.373]	0.230 [0.120; 0.298]	0.182	0.185 [0.111; 0.299]	0.165 [0.078; 0.262]	0.233
naiv	0.244 [0.069; 0.327]	0.116 [0.034; 0.261]	0.328	0.182 [0.053; 0.338]	0.091 [0.039; 0.308]	0.100
Effektor-Gedächtnis	0.135 [0.070; 0.202]	0.128 [0.072; 0.197]	1.0	0.106 [0.055; 0.205]	0.085 [0.061; 0.203]	0.496
EMRA	0.114 [0.003; 0.022]	0.016 [0.004; 0.031]	0.374	0.008 [0.001; 0.017]	0.004 [0.002; 0.010]	0.460
HLA-DR+	0.080 [0.044; 0.095]	0.053 [0.037; 0.175]	0.929	0.055 [0.038; 0.071]	0.045 [0.031; 0.072]	0.427
CD69+	0.050 [0.032; 0.172]	0.037 [0.015; 0.077]	0.182	0.049 [0.025; 0.091]	0.035 [0.024; 0.047]	0.061
Th1	0.044 [0.021; 0.066]	0.036 [0.021; 0.052]	0.424	0.031 [0.016; 0.072]	0.021 [0.011; 0.062]	0.177
Th2	0.068 [0.045; 0.107]	0.062 [0.021; 0.103]	0.374	0.032 [0.018; 0.082]	0.029 [0.024; 0.073]	0.875
Th17	0.040 [0.017; 0.056]	0.043 [0.024; 0.059]	0.722	0.027 [0.020; 0.053]	0.026 [0.021; 0.047]	0.975
regulatorisch	0.020 [0.015; 0.050]	0.040 [0.010; 0.079]	0.477	0.028 [0.015; 0.042]	0.012 [0.009; 0.016]	0.001
CD25+	0.009 [0.004; 0.017]	0.012 [0.008; 0.015]	0.477	0.008 [0.005; 0.013]	0.008 [0.003; 0.012]	0.496
CD4/CD8	2.548 [1.571; 4.928]	1.381 [1.111; 2.116]	0.101	2.258 [1.723; 3.800]	1.960 [1.558; 4.548]	0.865

	CR + PR (n=11)			SD + PD (n=15)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
NK-Zellen						
NK-Zellen	0.240 [0.124; 0.310]	0.212 [0.127; 0.332]	0.799	0.126 [0.077; 0.137]	0.105 [0.056; 0.163]	0.496
CD56+CD16+	0.062 [0.030; 0.098]	0.072 [0.046; 0.095]	0.721	0.024 [0.014; 0.048]	0.019 [0.009; 0.043]	0.048
CD56bright CD16dim	0.004 [0.000; 0.008]	0.006 [0.001; 0.011]	0.445	0.002 [0.001; 0.005]	0.003 [0.002; 0.004]	0.975
CD56dim CD16bright	0.004 [0.003; 0.020]	0.007 [0.004; 0.015]	0.646	0.004 [0.002; 0.016]	0.004 [0.001; 0.008]	0.177
NKT	0.078 [0.034; 0.124]	0.084 [0.053; 0.117]	0.657	0.037 [0.016; 0.057]	0.024 [0.013; 0.055]	0.109

E) Mit vs. Ohne Radiatio

	Mit Radiatio (n=8)			Ohne Radiatio (n=18)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
B-Lymphozyten						
B-Lymphozyten	0.074 [0.046; 0.106]	0.033 [0.009; 0.056]	0.055	0.078 [0.038; 0.057]	0.057 [0.037; 0.107]	0.178
naiv	0.043 [0.026; 0.071]	0.016 [0.002; 0.045]	0.028	0.056 [0.018; 0.140]	0.033 [0.017; 0.059]	0.013
Gedächtnis	0.005 [0.003; 0.011]	0.001 [0.000; 0.008]	0.028	0.003 [0.001; 0.008]	0.002 [0.001; 0.004]	0.010
klassengewechselt	0.013 [0.007; 0.015]	0.004 [0.003; 0.009]	0.018	0.010 [0.003; 0.024]	0.006 [0.004; 0.015]	0.196
transitorisch	0.003 [0.001; 0.005]	0.000 [0.000; 0.006]	0.735	0.001 [0.000; 0.005]	0.001 [0.000; 0.002]	0.281

	Mit Radiatio (n=8)			Ohne Radiatio (n=18)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD8+ T-Lymphozyten						
CD8+ T-Lymphozyten	0.244 [0.150; 0.455]	0.235 [0.080; 0.337]	0.123	0.204 [0.090; 0.331]	0.233 [0.146; 0.319]	0.500
CD4+CD8+	0.010 [0.004; 0.017]	0.009 [0.003; 0.018]	0.484	0.003 [0.001; 0.009]	0.003 [0.001; 0.006]	0.554
Gedächtnis	0.070 [0.038; 0.140]	0.081 [0.037; 0.118]	0.484	0.059 [0.040; 0.126]	0.091 [0.033; 0.153]	0.372
zentrale Gedächtnis	0.030 [0.009; 0.072]	0.039 [0.015; 0.068]	0.674	0.028 [0.016; 0.052]	0.025 [0.016; 0.038]	0.184
naiv	0.069 [0.019; 0.107]	0.033 [0.017; 0.121]	0.575	0.039 [0.016; 0.081]	0.036 [0.016; 0.066]	0.420
Effektor-Gedächtnis	0.055 [0.043; 0.109]	0.060 [0.031; 0.068]	0.327	0.054 [0.031; 0.119]	0.086 [0.029; 0.136]	0.372
EMRA	0.065 [0.029; 0.249]	0.058 [0.024; 0.136]	0.327	0.043 [0.022; 0.109]	0.068 [0.036; 0.120]	0.349
früh	0.147 [0.061; 0.275]	0.127 [0.056; 0.241]	0.093	0.073 [0.037; 0.150]	0.072 [0.048; 0.150]	0.811
intermediär	0.017 [0.013; 0.020]	0.014 [0.006; 0.047]	0.263	0.010 [0.005; 0.013]	0.014 [0.009; 0.021]	0.157
spät	0.023 [0.016; 0.076]	0.024 [0.014; 0.070]	0.575	0.053 [0.032; 0.146]	0.087 [0.032; 0.152]	0.845
erschöpft	0.066 [0.039; 0.103]	0.074 [0.042; 0.122]	0.575	0.055 [0.032; 0.112]	0.062 [0.034; 0.118]	0.948
terminale Effektor	0.038 [0.024; 0.111]	0.021 [0.010; 0.058]	0.025	0.031 [0.018; 0.120]	0.045 [0.018; 0.118]	0.879
HLA-DR+	0.085 [0.023; 0.207]	0.069 [0.028; 0.148]	0.674	0.057 [0.031; 0.109]	0.085 [0.033; 0.163]	0.349
CD69+	0.046 [0.032; 0.071]	0.052 [0.029; 0.091]	0.889	0.030 [0.017; 0.066]	0.041 [0.017; 0.073]	0.983
regulatorisch	0.000 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.003]	0.866	0.000 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.002]	1.0
CD25+	0.001 [0.000; 0.001]	0.001 [0.001; 0.001]	0.263	0.001 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	0.446

	Mit Radiatio (n=8)			Ohne Radiatio (n=18)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD4+ T-Lymphozyten						
CD4+ T-Lymphozyten	0.486 [0.320; 0.976]	0.418 [0.185; 0.906]	0.484	0.819 [0.367; 0.802]	0.485 [0.236; 0.674]	0.145
Gedächtnis	0.320 [0.206; 0.564]	0.352 [0.147; 0.587]	0.889	0.317 [0.226; 0.548]	0.297 [0.157; 0.333]	0.112
zentrale Gedächtnis	0.249 [0.120; 0.343]	0.191 [0.089; 0.353]	0.401	0.220 [0.141; 0.336]	0.157 [0.103; 0.256]	0.133
naiv	0.131 [0.057; 0.378]	0.061 [0.024; 0.318]	0.017	0.251 [0.069; 0.330]	0.153 [0.038; 0.273]	0.446
Effektor-Gedächtnis	0.115 [0.064; 0.233]	0.166 [0.065; 0.254]	0.263	0.125 [0.065; 0.188]	0.083 [0.068; 0.145]	0.184
EMRA	0.112 [0.004; 0.015]	0.004 [0.002; 0.009]	0.069	0.005 [0.002; 0.022]	0.008 [0.002; 0.029]	0.306
HLA-DR+	0.057 [0.038; 0.071]	0.058 [0.044; 0.156]	0.263	0.058 [0.043; 0.090]	0.046 [0.035; 0.079]	0.199
CD69+	0.045 [0.026; 0.116]	0.035 [0.030; 0.107]	0.575	0.051 [0.031; 0.117]	0.035 [0.018; 0.053]	0.035
Th1	0.040 [0.018; 0.071]	0.036 [0.015; 0.067]	0.612	0.043 [0.018; 0.069]	0.022 [0.012; 0.054]	0.102
Th2	0.047 [0.028; 0.107]	0.064 [0.027; 0.103]	0.612	0.052 [0.023; 0.082]	0.034 [0.021; 0.070]	0.500
Th17	0.049 [0.026; 0.061]	0.041 [0.013; 0.113]	0.735	0.029 [0.019; 0.048]	0.029 [0.021; 0.044]	0.913
regulatorisch	0.024 [0.016; 0.050]	0.012 [0.010; 0.017]	0.263	0.027 [0.014; 0.047]	0.014 [0.008; 0.051]	0.184
CD25+	0.007 [0.004; 0.011]	0.008 [0.007; 0.012]	0.208	0.009 [0.005; 0.016]	0.010 [0.003; 0.016]	0.777
CD4/CD8	2.108 [1.438; 3.297]	2.024 [1.642; 3.344]	0.889	2.973 [1.758; 4.677]	1.579 [1.117; 3.627]	0.078

	Mit Radiatio (n=8)			Ohne Radiatio (n=18)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
NK-Zellen						
NK-Zellen	0.152 [0.080; 0.273]	0.119 [0.038; 0.258]	0.263	0.129 [0.093; 0.240]	0.127 [0.093; 0.204]	0.943
CD56+CD16+	0.025 [0.015; 0.083]	0.016 [0.009; 0.050]	0.123	0.039 [0.023; 0.083]	0.046 [0.016; 0.079]	0.379
CD56bright CD16dim	0.002 [0.000; 0.006]	0.003 [0.001; 0.004]	1.0	0.003 [0.001; 0.007]	0.004 [0.001; 0.008]	0.352
CD56dim CD16bright	0.005 [0.002; 0.022]	0.007 [0.001; 0.009]	0.093	0.004 [0.002; 0.017]	0.006 [0.002; 0.010]	0.606
NKT	0.041 [0.021; 0.113]	0.024 [0.014; 0.063]	0.161	0.057 [0.030; 0.098]	0.061 [0.024; 0.092]	0.943

E) Mit vs. Ohne Infektion

	Mit Infektion (n=9)			Ohne Infektion (n=17)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
B-Lymphozyten						
B-Lymphozyten	0.073 [0.020; 0.162]	0.063 [0.014; 0.112]	0.463	0.079 [0.044; 0.168]	0.046 [0.029; 0.088]	0.002
naiv	0.054 [0.010; 0.120]	0.048 [0.008; 0.070]	0.345	0.045 [0.021; 0.116]	0.023 [0.014; 0.047]	0.001
Gedächtnis	0.003 [0.002; 0.004]	0.002 [0.001; 0.003]	0.173	0.006 [0.002; 0.012]	0.003 [0.001; 0.004]	0.002
klassengewechselt	0.009 [0.004; 0.013]	0.004 [0.002; 0.010]	0.600	0.015 [0.006; 0.026]	0.006 [0.003; 0.014]	0.009
transitorisch	0.001 [0.000; 0.007]	0.000 [0.000; 0.014]	0.917	0.002 [0.000; 0.004]	0.005 [0.000; 0.002]	0.148

	Mit Infektion (n=9)			Ohne Infektion (n=17)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD8+ T-Lymphozyten						
CD8+ T-Lymphozyten	0.178 [0.087; 0.344]	0.220 [0.121; 0.368]	0.079	0.241 [0.168; 0.378]	0.272 [0.113; 0.323]	0.235
CD4+CD8+	0.002 [0.001; 0.006]	0.003 [0.001; 0.004]	0.401	0.008 [0.002; 0.017]	0.005 [0.002; 0.014]	0.554
Gedächtnis	0.044 [0.035; 0.071]	0.079 [0.039; 0.134]	0.086	0.104 [0.052; 0.141]	0.093 [0.033; 0.140]	0.868
zentrale Gedächtnis	0.021 [0.012; 0.031]	0.025 [0.016; 0.032]	0.314	0.045 [0.018; 0.080]	0.027 [0.015; 0.057]	0.028
naiv	0.047 [0.010; 0.095]	0.035 [0.013; 0.105]	0.953	0.042 [0.022; 0.093]	0.034 [0.024; 0.067]	0.287
Effektor-Gedächtnis	0.045 [0.028; 0.078]	0.063 [0.033; 0.124]	0.374	0.064 [0.044; 0.128]	0.068 [0.029; 0.112]	0.723
EMRA	0.024 [0.022; 0.202]	0.068 [0.033; 0.154]	0.767	0.062 [0.036; 0.113]	0.068 [0.031; 0.116]	0.981
früh	0.078 [0.044; 0.135]	0.072 [0.053; 0.183]	0.678	0.137 [0.045; 0.179]	0.096 [0.043; 0.186]	0.356
intermediär	0.010 [0.004; 0.019]	0.017 [0.011; 0.042]	0.066	0.011 [0.008; 0.020]	0.013 [0.007; 0.023]	0.523
spät	0.034 [0.022; 0.075]	0.096 [0.024; 0.131]	0.314	0.069 [0.026; 0.149]	0.052 [0.024; 0.134]	0.193
erschöpft	0.033 [0.023; 0.108]	0.104 [0.031; 0.141]	0.767	0.056 [0.042; 0.104]	0.059 [0.037; 0.010]	0.435
terminale Effektor	0.026 [0.017; 0.048]	0.046 [0.015; 0.094]	0.678	0.036 [0.022; 0.129]	0.027 [0.014; 0.106]	0.076
HLA-DR+	0.042 [0.014; 0.152]	0.108 [0.050; 0.178]	0.260	0.092 [0.042; 0.133]	0.068 [0.031; 0.147]	0.653
CD69+	0.022 [0.013; 0.053]	0.045 [0.016; 0.076]	0.139	0.041 [0.028; 0.145]	0.040 [0.021; 0.100]	0.332
regulatorisch	0.001 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.002]	0.889	0.000 [0.000; 0.002]	0.001 [0.000; 0.002]	0.778
CD25+	0.000 [0.000; 0.001]	0.001 [0.000; 0.001]	0.314	0.001 [0.000; 0.002]	0.001 [0.003; 0.001]	0.523

	Mit Infektion (n=9)			Ohne Infektion (n=17)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
CD4+ T-Lymphozyten						
CD4+ T-Lymphozyten	0.417 [0.269; 0.684]	0.374 [0.174; 1.111]	0.237	0.679 [0.355; 1.025]	0.549 [0.308; 0.691]	0.543
Gedächtnis	0.282 [0.149; 0.382]	0.228 [0.147; 0.700]	0.859	0.395 [0.229; 0.628]	0.322 [0.223; 0.376]	0.049
zentrale Gedächtnis	0.185 [0.105; 0.255]	0.140 [0.071; 0.417]	0.859	0.268 [0.138; 0.421]	0.202 [0.115; 0.279]	0.028
naiv	0.182 [0.048; 0.280]	0.091 [0.028; 0.281]	0.314	0.244 [0.072; 0.354]	0.116 [0.045; 0.285]	0.124
Effektor-Gedächtnis	0.106 [0.051; 0.150]	0.084 [0.067; 0.297]	0.594	0.142 [0.070; 0.223]	0.112 [0.067; 0.200]	0.177
EMRA	0.006 [0.001; 0.025]	0.003 [0.001; 0.012]	0.953	0.008 [0.002; 0.018]	0.005 [0.003; 0.022]	0.868
HLA-DR+	0.053 [0.025; 0.068]	0.067 [0.034; 0.168]	0.515	0.068 [0.045; 0.092]	0.046 [0.039; 0.086]	0.193
CD69+	0.035 [0.018; 0.109]	0.035 [0.023; 0.075]	0.441	0.050 [0.033; 0.117]	0.034 [0.017; 0.058]	0.044
Th1	0.042 [0.013; 0.070]	0.037 [0.009; 0.077]	0.889	0.042 [0.019; 0.068]	0.027 [0.017; 0.056]	0.049
Th2	0.031 [0.016; 0.063]	0.024 [0.021; 0.121]	0.208	0.062 [0.029; 0.102]	0.062 [0.028; 0.078]	0.210
Th17	0.036 [0.022; 0.054]	0.031 [0.024; 0.082]	0.327	0.031 [0.019; 0.054]	0.028 [0.016; 0.053]	0.381
regulatorisch	0.042 [0.014; 0.051]	0.012 [0.009; 0.025]	0.110	0.024 [0.016; 0.036]	0.013 [0.009; 0.042]	0.287
CD25+	0.008 [0.002; 0.015]	0.008 [0.003; 0.018]	0.214	0.008 [0.006; 0.014]	0.009 [0.006; 0.013]	0.723
CD4/CD8	2.164 [1.772; 4.038]	1.558 [1.200; 3.254]	0.214	2.868 [1.522; 3.885]	1.932 [1.343; 3.489]	0.266

	Mit Infektion (n=9)			Ohne Infektion (n=17)		
	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert	Vor Chemotherapie	Nach Chemotherapie	p-Wert
NK-Zellen						
NK-Zellen	0.112 [0.078; 0.163]	0.126 [0.051; 0.189]	0.997	0.153 [0.114; 0.297]	0.128 [0.073; 0.258]	0.237
CD56+CD16+	0.041 [0.025; 0.083]	0.042 [0.014; 0.064]	0.327	0.029 [0.015; 0.089]	0.043 [0.012; 0.079]	0.148
CD56bright CD16dim	0.003 [0.002; 0.006]	0.003 [0.003; 0.005]	0.889	0.002 [0.000; 0.007]	0.002 [0.001; 0.008]	0.569
CD56dim CD16bright	0.005 [0.003; 0.026]	0.007 [0.001; 0.013]	0.779	0.004 [0.002; 0.018]	0.006 [0.002; 0.008]	0.569
NKT	0.047 [0.035; 0.113]	0.055 [0.018; 0.078]	0.723	0.039 [0.022; 0.098]	0.053 [0.019; 0.084]	0.134

Bei den Zahlen handelt es sich um Werte pro nl und die interquartilen Abstände befinden sich in den eckigen Klammern.
p < 0.022: signifikant, p > 0.022: nicht signifikant

10.3 Patienteninformation und Einverständniserklärung

Patienteninformation zur Studie

Zellulärer Immunstatus von Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen wurde eine bösartige Tumorerkrankung festgestellt. Die meisten Patienten werden in dieser Situation mit einer klassischen Chemotherapie behandelt mit dem Ziel, das Tumorwachstum zu stoppen bzw. die Tumorgroße zu reduzieren. Ein neuer Ansatzpunkt in der Behandlung bösartiger Tumoren ist die Aktivierung des patienteneigenen Immunsystems, welches sich dann gegen Tumorzellen richten kann. Mittlerweile stehen Medikamente zur Verfügung, die nach Versagen einer Chemotherapie genau hierfür eingesetzt werden können. Für bestimmte Tumorarten wie dem schwarzen Hautkrebs ist diese neue Therapiemöglichkeit bereits fester Bestandteil im Behandlungsablauf geworden. Allerdings spricht immer nur ein Teil der Patienten auf diese sogenannte Immuntherapie an. Leider ist es bisher nicht möglich, mit Hilfe von Laborwerten oder Tumorzelleigenschaften vorherzusagen, welcher Patient von einer Immuntherapie profitiert und welcher wahrscheinlich nicht.

Auf der Suche nach einem verlässlichen Prognosemarker auf das Ansprechen einer Immuntherapie untersuchen wir bei Patienten wie Ihnen die Zellen des Immunsystems nach ihren genauen Eigenschaften im Detail sowohl vor Beginn einer geplanten Chemotherapie und etwa 3 Monate später. Wir erwarten uns hiervon Erkenntnisse, wie die einzelnen Chemotherapeutika das Immunsystem beeinflussen; dies ist insbesondere wichtig, wenn anschließend eine Immuntherapie wie oben beschrieben durchgeführt werden soll. Die Hoffnung ist dabei, künftig vorhersagen zu können, welcher Patient von einer Immuntherapie profitieren wird.

Die Analysen Ihres zellulären Immunsystems erfolgt aus dem Blutröhrchen, welches Ihnen zur Bestimmung Ihres Blutbildes abgenommen wird. Eine zusätzliche Blutabnahme ist also nicht erforderlich. Diese Analysen sollen vor der ersten Chemotherapie und nach etwa 3 Monaten durchgeführt werden. Bei Patienten, die nach einer Chemotherapie eine Immuntherapie erhalten, wird deren Immunsystem nach weiteren 3 und 6 Monaten genauer untersucht. Die statistische Auswertung patientenbezogener Daten erfolgt in pseudonymisierter Form, so dass bei Veröffentlichung von Untersuchungsergebnissen nicht auf die teilnehmenden Patienten rückgeschlossen werden kann.

Für Ihre Erlaubnis, Ihr Immunsystem genauer untersuchen zu dürfen, bedanken wir uns ganz herzlich. Für Ihre Fragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

PD Dr. A. Rank

Prof. Dr. M. Trepel

Einverständniserklärung zur Studie

Zellulärer Immunstatus von Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung

[Patientenetikett]

Ich wurde von Dr. über Inhalt und Zweck der o.g. Studie aufgeklärt und hatte Gelegenheit, meine Fragen zu stellen. Mein Einverständnis kann ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen zurückziehen.

Ort und Datum

Unterschrift Patient/-in

Unterschrift Ärztin / Arzt

11 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Martin Trepel für die Möglichkeit, mich mit diesem interessanten Thema zu beschäftigen, und für seine Treue während dieser Zeit. Durch die Bearbeitung des Projekts wurde mir bewusst, wie facettenreich und faszinierend die Sichtweise auf der Ebene der Zellen ist, und es hat in mir das Interesse geweckt, deren funktionelle Eigenschaften auch über diese Dissertation hinaus weiter zu erforschen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Andreas Rank für die außerordentlich zuverlässige Organisation und Betreuung dieser Arbeit bedanken. Neben einem Arbeitsplatz auf der Station 10.3 oder in seinem Büro am damals noch Klinikum Augsburg hatte er stets mehr als eine Antwort auf meine vielen Fragen und unterstützte mich mit seiner herausragenden Fachkompetenz in allen Dingen. Er förderte, ermutigte mich und stand mir jederzeit mit wertvollen Ratschlägen zur Seite. Andreas Rank war mir der beste Betreuer, den ich mir vorstellen konnte. Er war bei all meiner Anliegen immer für mich da. Vielen Dank für alles!

Des Weiteren danke ich auch Frau Dr. Johanna Waidhauser für ihr Engagement bei meiner Doktorarbeit und ihrer großen Mühe bei der Erstellung der Publikation der Studie.

Ein spezieller Dank gilt ferner der medizinisch-technischen Assistentin, Frau Tatjana Lenskaja, des Universitätsklinikums Augsburg für ihre hilfreiche und geduldige Kooperation und den motivierenden Worten, sowie den weiteren Mitarbeitern des Labors.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. Ann-Kristin Schmälder, dem Ärzteteam der II. Medizinischen Klinik an der Universitätsklinik Augsburg sowie Herrn Professor Dr. Gernot Müller am Institut für Mathematik der Universität Augsburg für die gute Zusammenarbeit.

Abschließend gehört mein Dank meiner Familie, ohne deren unendliche Geduld, Hilfe jeglicher Art und Empathie mein Medizinstudium und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.