

**Untersuchung zellulärer und humoraler Immunparameter
bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen
im Kopf-/Halsbereich in Abhängigkeit von
Tumorstadium und Therapieform**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

BIOLOGIE

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in

Frankfurt am Main

von

Marissa Penna Martinez

aus Valparaiso, Chile

Frankfurt am Main 2001

(D F 1)

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation
angenommen

Dekan: Prof. Dr. K. D. Entian

Gutachter: Prof. Dr. M. Brendel, Prof. Dr. L. Träger

Datum der Disputation:

Fachbereich BIOLOGIE

der

Johann Wolfgang Goethe-Universität

Die Bewerberin Marissa Penna Martinez

hat heute das Promotionsverfahren im Fach

BIOLOGIE

mit der Gesamtnote

abgeschlossen.

Die einzelnen Prüfungsleistungen wurden wie folgt bewertet:

Dissertation:

Disputation:

Das Recht zur Führung des Dokortitels wird nicht durch diese Bescheinigung, sondern erst durch die Aushändigung der Urkunde erworben.

Frankfurt am Main, den

Der Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Tumoren	1
1.1.	Unterscheidungskriterien von gut- und bösartigen Tumoren	1
1.1.1.	Plattenepithelkarzinome des Aerodigestivtraktes	2
1.1.1.1.	Konventionelle Therapie	3
1.1.1.2.	Alternative Therapie	4
2.	Tumorimmunologie	6
2.1.	Tumorinfiltrierenden Lymphozyten	7
3.	Differenzierung der Zellen des Immunsystems	8
3.1.	T-Zelldifferenzierung und T-Zell-Subpopulationen	12
3.1.1.	Der T-Zell-Rezeptor und CD3-Komplex	13
3.1.2.	Zell-Adhäsionsmolekül, CD2	14
3.1.3.	Erkennungs- und Aktivierungsmarker, HLA-DR	15
3.2.	B-Zellen	15
3.3.	Natürliche Killerzellen	17
4.	Zytokine	18
4.1.	Interleukin-2	18
4.2.	Interleukin-2-Rezeptor	19
4.3.	T-Zellaktivierung	20
4.3.1.	IP3/ DAG-Weg	21
5.	Zielsetzung der Arbeit	22

II.	Material	23
1.	Geräte	23
2.	Verbrauchsmaterial	24
3.	Chemikalien und Reagenzien	25
4.	Antikörper und Elisa- Testsysteme	28
5.	Zelllinien	29
6.	Lösungen	29
6.1.	Vitalitätstest	29
6.2	Dichtegradientenzentrifugation	29
6.3.	Zytotoxizitätstest	29
6.4.	Biotin-Streptavidin-Peroxidase Methode	30
III.	Methoden	31
1.	Patienten- und Kontrollgruppe	31
1.1.	Auswahl der untersuchten Patienten nach klinischen Gesichtspunkten	31
2.	Zellkultivierung	35
2.1.	Kultivierung der Zelllinien <i>Raji</i> und <i>K562</i>	35
2.2.	Kultivierung der Lymphozyten	35
3.	Routinemethoden	35
3.1.	Bestimmung der Zellzahl mittels Thoma-Zählkammer	35
3.2.	Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung	36
3.3.	Kryokonservierung von Zellen	36
4.	Immunologische Methoden	37
4.1.	Isolierung mononukleären Zellen aus periphrem Blut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll-Hypaque)	37
4.2.	Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen mittels Durchflußzytometrie	38
4.2.1.	Durchführung der Phänotypisierung	39
4.2.2.	Auswertung	40
4.3.	Messung der Zytotoxizität mit dem Europiumfreisetzungstest	42
4.3.1.	Vorbereitung der Zielzelllinien	42

4.3.2.	Vorbereitung der Effektorzellen	43
4.4.	Quantitative Bestimmung des Interleukin-2 Proteins und löslichen Interleukin-2-Rezeptors α im Plasma mittels Sandwich-Elisa	44
4.4.1.	Vorbereitung des Elisa- Testsystems	44
4.4.2.	Erstellung der Standardkurve	45
4.5.	Nachweis von Lymphozyteninfiltration im Tumor mittels der Biotin-Streptavidin-Peroxidase Methode	46
4.5.1	Entparaffinierung	46
4.5.2.	Vorbereitung der Gewebeschnitte bei Einsatz von Anti-CD3 und Anti-CD8-Antikörper	47
4.5.3.	Antikörperzugabe	48
4.5.4.	Substratzugabe	48
4.5.5.	Kontrolle	49
4.5.6.	Verwendete Schnitte	49
4.5.7.	Auswertung	49
5.	Statistische Auswertung	50

IV.	Ergebnisse	51
1.	Phänotypisierung der Zelllinie <i>Raji</i> und <i>K562</i>	52
2.	Etablierung der Biotin-Streptavidin-Methode	52
3.	Zelluläres Immunprofil	53
3.1.	Zelluläres Immunprofil von Kontrollpersonen	53
3.2.	Zelluläres Immunprofil und Tumorgroße	54
3.3.	Zelluläres Immunprofil und Tumormalignität	61
3.4.	Zelluläres Immunprofil und Lymphknotenmetastasen	68
3.5.	Zelluläres Immunprofil und verschiedene Therapiemodalitäten	75
4.	Interleukin-2 Spiegel	82
4.1.	Interleukin-2 Spiegel bei Tumorpatienten	82
4.2.	Interleukin-2 Spiegel und Besonderheiten des Kontrollkollektivs	83
4.3.	Interleukin-2 Spiegel im zeitlichen Verlauf	84

5.	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α	86
5.1.	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α und Besonderheiten des Kontrollkollektivs	90
6.	Korrelationsanalysen	91
7.	Untersuchung immunkompetenter Zellen innerhalb des Tumors und im peripheren Blut	93
7.1.	Lymphozyten-Infiltrate im Primärtumor und metastasierten Lymphknoten	93
7.2.	Periphere Blutlymphozyten bei Patienten mit Primärtumor und Lymphknotenmetastasen	94
7.3.	Korrelationsanalysen	95
V.	Diskussion	96
1.	Methoden	96
1.1.	Europiumfreisetzungstest	96
1.2.	Sandwich Elisa zum Nachweis von Interleukin-2 und löslichem Interleukin-2-Rezeptor α	98
1.2.2.	Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit monoklonalen Antikörpern gegen CD25-Antigen zum Nachweis des löslichen Interleukin-2-Rezeptors	99
2.	Diskussion der Ergebnisse	101
2.1.	Phänotypisierung der Zelllinie <i>Raji</i> und <i>K562</i>	101
2.2.	Etablierung der Biotin-Streptavidin-Methode	102
2.3.	Zelluläres Immunprofil	103
2.3.1.	Zelluläres Immunprofil von Kontrollpersonen	104
2.3.2.	Zelluläres Immunprofil in Abhängigkeit des Tumorstadiums	106
2.3.3.	Zelluläres Immunprofil in Abhängigkeit verschiedener konventioneller Therapiemodalitäten	112
2.4.	Interleukin-2 Spiegel	117
2.4.1.	Interleukin-2 Spiegel und Tumorpatienten	117
2.4.2.	Interleukin-2 Spiegel und Besonderheit des Kontrollkollektivs	119
2.4.3.	Zeitlicher Verlauf des Interleukin-2 Spiegels	119
2.5.	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α	121

2.5.1.	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α bei Kontrollpersonen	122
2.5.2.	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α und Tumorstadium	123
2.5.3.	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor- α -Konzentration unter dem Einfluß verschiedener Therapiemodalitäten	125
2.5.4.	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α -Spiegel und Besonderheiten des Kontrollkollektivs	126
2.6.	Korrelationsanalysen	127
2.7.	Untersuchung immunkompetenter Zellen im Primärtumor, im metastasierten Lymphknoten und im peripheren Blut	129
2.7.1.	Lymphozyten-Infiltrate im Primärtumor und metastasierten Lymphknoten	129
2.7.2.	Periphere Blutlymphozyten bei Patienten mit Primärtumor und Lymphknotenmetastasen	132
2.7.3.	Korrelationsanalysen	132
VI.	Zusammenfassung	133
VII.	Literaturverzeichnis	135
	Anhang	155
	Danksagung	156
	Erklärung	157

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
CCP-SF	Komplementkontrollprotein Superfamilie
CD	Differenzierungscluster
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elisa	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
Fc	kristallines Fragment von Antikörper
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
FL-1	Floureszenz-1 (grün)
FL-2	Floureszenz-2 (orange)
FL-3	Floureszenz-3 (rot)
FSC	Vorwärtslichtstreuung
5-Fu	5-Fluoruracil
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSSC	Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals Bereich
Ig	Immunglobulin
IL-1,-2	Interleukin-1, -2
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IL-2R α	Interleukin-2-Rezeptor alpha

LAK	lymphokin aktivierte Killerzellen
LCA	leucozytencommon Antigen
LFA,1,2,3	leukozytenfunktion-assoziertes Antigen- 1,2,3
m	männlich
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ML	maximale Lyse
nIL-2	natürliches Interleukin-2
NK	natürliche Killerzellen
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RT	Raumtemperatur
SCC	Plattenepithelkarzinom Antigen
SD	Standardabweichung
SSC	Seitlichtstreuung
TAA	tumorassoziertes Antigen
Tab	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tdt	terminale Desoxynukleotidyltransferase
T _H 1	T-Helferzellen Typ 1
T _H 2	T-Helferzellen Typ 2
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minuten
w	weiblich

I. Einleitung

1. Tumoren

Als Neoplasie bezeichnet man eine abnorme, funktionell nutzlose Gewebemasse, die durch eine autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Mit der Proliferation verliert die Zelle in der Regel die Fähigkeit zur weiteren Differenzierung. Gleichzeitig kommt es zu einer Instabilität des Chromosomensatzes, die sich in einer Prädisposition zum Auftreten von Chromosomenbrüchen, von Chromosomenfehlverteilung, von abnorm vielen Chromosomensätzen und von Genmutationen niederschlägt [Schmitz-Moormann et al. 1995].

1.1. Unterscheidungskriterien von gut- und bösartigen Tumoren

Aufgrund ihres biologischen Verhaltens (Dignität) unterscheidet man gutartige und bösartige Neoplasien [Schmitz-Moormann et al. 1995]. Kriterien wie Metastasierungsfähigkeit, Veränderungen und Differenzierungsgrad der Zellen werden bei der Beurteilung der Dignität mitberücksichtigt [Bühling et al. 1995].

Benigne Tumoren haben im allgemeinen eine sehr gute Prognose und führen selten zum Tode. Im Gegensatz dazu stellen maligne Tumoren nach den Herzerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Westeuropa dar [Stevens & Lowe 1997]. Allein in der Bundesrepublik Deutschland sterben jährlich 840 000 Menschen an Krebs und der Anteil der Krebspatienten

Tab. 1: Histologische Unterschiede zwischen benignen und malignen Tumoren [Stevens & Lowe 1997]

	benigne Tumoren	maligne Tumoren
Verhalten	Ausschließlich expansives, lokal begrenztes Wachstum	Expansives und infiltrierendes Wachstum; kann metastasieren
Histologie	Ähnlichkeit mit dem Muttergewebe (hochdifferenziert)	Mangelnde Differenzierung der Zelle
	geringe Mitoserate	Zahlreiche, zum Teil abnorme Mitosen
	Normale oder geringgradig erhöhte Kern-Plasma Relation	Hohe Kern-Plasma-Relation
	Uniformität der Zellen im gesamten Tumor	Unterschiedliche Form und Größe der Zellen (Zellpolymorphie) und / oder der Zellkerne (Kernpolymorphie)

Unterschiede der jeweiligen Neoplasien beziehen sich auf das Muttergewebe, aus welchem die Geschwulst hervorgegangen ist. Aus dem Mesoderm entstammende Tumoren werden mesenchymale Tumoren, aus dem Ekto- oder Endoderm, hervorgehende epitheliale Tumoren genannt. Maligne epitheliale Tumoren werden als Karzinome, maligne mesenchymale Neubildungen als Sarkome und entdifferenzierte Neubildungen, die sich weder morphologisch noch histologisch einordnen lassen, als Blastome bezeichnet [Schmitz-Moormann et al. 1995]. Zu den Karzinomen gehören Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome, sie machen mehr als 90% aller malignen Neoplasien aus.

1.1.1. Plattenepithelkarzinome des Aerodigestivtraktes

Kopf-Hals Tumorgruppen umfassen Karzinome des Mundes, Tonsillen, Pharynx, Larynx, Zunge, Speicheldrüse und oberen Ösophagus [Bellacosa et al. 1996]. Über 90 % der Tumoren aus diesem Bereich sind Plattenepithelkarzinome. Alkohol und Nikotin, insbesondere in Kombination, sind für mehr als 80 % der Mundhöhlen- und Larynxkarzinome verantwortlich [Decker et al. 1982, Tuyns et al. 1988, Spitz et al. 1994]. Vitaminmangel, der Genuß von salzgetrocknetem Fisch und Epstein-Barr-Virus-Infektionen sind pathogenetisch mit Nasopharynxkarzinomen assoziiert [Ning et al. 1990, Liebovitz et al. 1994].

Die Plattenepithelkarzinome entstehen über eine Metaplasie aus den Basalzellen des respiratorischen Epithels. Bei einer chronischen Schädigung des luminalen Zylinderepithels z.B. durch Rauchen beginnen bipolare Basalzellen das empfindliche Zylinderepithel durch das widerstandsfähige Plattenepithel zu ersetzen. Dieser morphologische Wandel wird durch Änderung der Zytokeratinexpression begleitet. Die Plattenepithelmetaplasie enthält gleichzeitig zylinderepithel- und plattenepitheltypische Zytokeratine, außerdem nimmt die Expression der proliferationsassoziierten Zytokeratine CK6 und CK16 deutlich zu [Moll 1993]. Die histopathologische Progression von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals Bereich (HNSCC) ist mit einer genetischen Veränderung assoziiert, die auf dem Verlust von Chromosomenmaterial basiert:

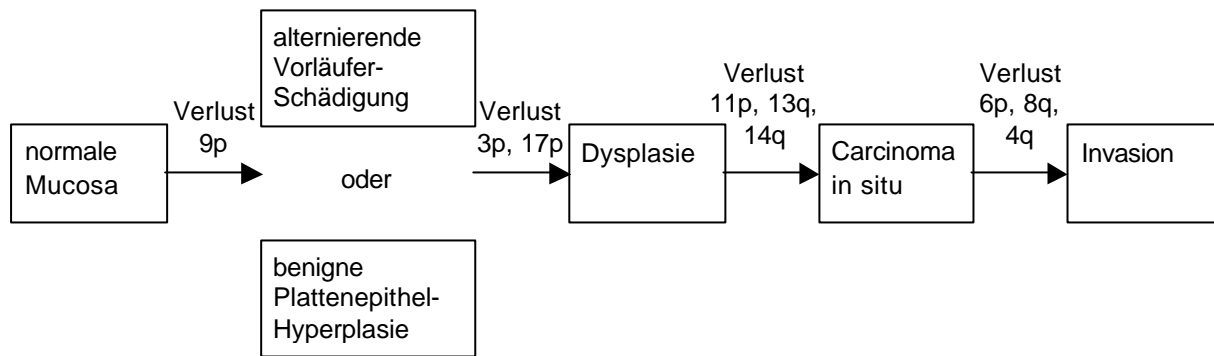


Abb.1: Genetische Progression von HNSCC: Es ist die Anhäufung und nicht notwendigerweise die Reihenfolge genetischer Ereignisse aufgeführt, die die Progression von Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich bestimmen. [nach Califano et al.1996].

1.1.1.1. Konventionelle Therapie

Die chirurgische Therapie der Kopf-Hals Karzinome ist seit langem als Standardtherapie etabliert. Radiotherapie wird anstelle oder zusätzlich zu chirurgischen Maßnahmen zur Verbesserung der lokoregionären Tumorkontrolle angewandt. Bei klinisch unauffälligen Halslymphknoten reichen 45 - 50 Gy, bei positiven Halslymphknoten sind Strahlentherapiedosen von 66 - 76 Gy notwendig. Ebenso wird der Primärtumor bzw. das Primärtumorbett mit 66 - 70 Gy bestrahlt. Die tumorizide Wirkung der Radiotherapie ist von der Gesamt-Strahlendosis abhängig, welche durch Gewebe-Spätreaktionen begrenzt ist. Durch Hyperfraktionierung der Strahlentherapie wird das gesunde, langsamer proliferierende Gewebe überproportional geschont, was die Verabreichung einer höheren Gesamt-Strahlendosis gestattet. Die alleinige Verkürzung der Behandlungsintervalle bei gleichbleibender Einzelstrahlendosis verhindert die Erholung von subletal geschädigten Tumorzellen. Vermehrte akute Gewebereaktionen erfordern allerdings eine Reduktion der Gesamt-Strahlendosis [Peters 1988, Dubben et al. 1992, Dadian et al. 1993, Dische et al. 1994].

Während früher die Chemotherapie auf die palliative Behandlung von Tumorrezidiven und Metastasen beschränkt war, ist eine Chemotherapie heute auch zur Behandlung primär inoperabler Tumoren, sowie vorrangig zu einer organerhaltenden Chirurgie bei Larynx- und Hypopharynx-Karzinomen indiziert. Im Rahmen multimodaler Therapieansätze wird die Chemotherapie rasch alternierend oder simultan mit der Radiotherapie verabreicht. Das Ziel gleichzeitigen Einsatzes von Chemotherapie und Bestrahlung ist eine verbesserte lokoregionäre Tumorkontrolle sowie die Reduktion der Fernmetastasierungsrate [Vokes et al. 1993].

Zu einer Vielzahl Chemotherapeutika zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren sind in den letzten Jahren weitere Substanzen wie Docetaxel, Paclitaxel, Virorelbin und Gemcitabin hinzugekommen oder wie Ifosfamid wieder neu entdeckt worden. Standard-Medikamente sind derzeit Methotrexat (wöchentlich 40 - 60 mg/m² i.v.) oder Cisplatin (100 mg/m², T1) 5-FU (1000 mg/m² als Dauerinfusion, T1 - 4) [O'Brien et al. 1994, Clavel et al. 1994].

1.1.1.2. Alternative Therapie

Weniger als ein Drittel der Tumoren werden im Frühstadium (T1N0, T2N0) erkannt. Diese können mittels Operation und/oder Strahlentherapie in ca. 90 % der Fälle geheilt werden. Rund 60 % der Patienten haben bei Diagnosestellung ein intermediäres (T2N1, T3N0) oder lokal fortgeschrittenes Stadium (T3 - 4, N2 - 3, M0). Hiervon können weniger als 30 % mit traditioneller Chirurgie und Strahlen- und Chemotherapie geheilt werden [Stupp et al. 1994]. Daher wird nach völlig neuen Strategien zur Bekämpfung der Krankheit gesucht [Eckardt 1996]:

- Genterapie
- Vitamintherapie
- Immuntherapie

Ziel der genterapeutischen Strategien ist die Transfektion von Genen in Tumorzellen, die den Zellzyklus der Tumorzellen hemmen, den programmierten Zelltod (Apoptose) der Tumorzellen einleiten oder den Tumor Zytokine produzieren lassen, die eine patienteneigene Immunantwort erleichtern. Ein weiterer Ansatz das Tumorzellwachstum zu hemmen, besteht in der Applikation von Antisense-Oligodesoxynukleotiden gegen Translations-Startstellen der mRNA wichtiger Proteine [He et al. 1998, Lang et al. 1999, Faust et al. 2000].

Vitamin D hat einen ausgeprägten antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen. Es zeigte sich in vielen Untersuchungen, daß Kopf-Hals Tumoren Vitamin-D-Rezeptoren besitzen [Kornfehl 1996]. Die Entwicklung eines Vitamin-D-Analogons mit sowohl antiproliferativer Wirkung, als auch geringer Induktion einer Hyperkalzämie scheint erfolgversprechend für eine therapeutische Anwendung zu sein [Eckardt et al. 1996].

Es wurde in vivo und in vitro die Möglichkeit aufgezeigt, daß durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten, unterstützt durch Gabe von Zytokinen wie IL-2 und Interferon γ , das Tumorstadium zu hemmen, bzw. die Tumorzellen abzutöten sind [Rangel et al. 1995]. Fernziel dieser immunologischen Tumorthherapie ist es, tumorspezifische Antigene oder Peptide zu isolieren und den Patienten gegen seinen Tumor zu impfen. Damit könnte bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nach Entfernung des Primärtumors eine starke Immunantwort ausgelöst werden und ein Tumorrezidiv, welches für die hohe Mortalität bei diesem Tumortyp verantwortlich ist, verhindert werden. Einige dieser Tumorantigene könnten die ursprünglich bei Melanomen identifizierten MAGE (Melanom Associated Gene) Gene sein. Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes exprimieren teilweise diese Gene [Eura et al. 1995].

Neben der Strategie, Tumorpfimpfstoffe zu entwickeln, wird auch versucht, durch lokale Applikation von Zytokinen die immunologische Abwehr gegen den Tumor positiv zu beeinflussen. Die vorgestellte Strategie beinhaltet die Transfektion der Tumoren mit dem IL-12- oder IL-2-Gen. IL-2 hemmt das Tumorstadium direkt, das von den transfizierten Tumorzellen freigesetzte IL-2 hat eine stimulierende Wirkung auf tumorinfiltrierende zytotoxische Lymphozyten und Killerzellen. Wie Untersuchungen zeigten, haben blockierende Antikörper gegen den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-R) einen ausgeprägten tumorhemmenden Effekt. EGF-R und seine Liganden EGF und TGF- α werden von den meisten Plattenepithelkarzinomen überexprimiert [Ishitoya et al. 1989] und fungieren als autokrines Wachstumsfaktorsystem, dessen Unterbrechung zur Tumorstadiumshemmung führt.

2. Tumorimmunologie

Krebszellen ändern im Zuge ihrer Entartung viele morphologische und physiologische Eigenschaften. Eine maligne Transformation geht mit phänotypischen Zellveränderungen einher, wie z.B. dem Verlust von Oberflächenantigenen, Erwerb von Neoantigenen und anderen Membranveränderungen. Dies beeinflusst Zellinteraktionen des betroffenen Organismus. Man vermutet, daß in einem Individuum im Laufe seines Lebens viele Zellen zu Tumorzellen transformieren. Etliche sterben spontan ab, da die molekularen Veränderungen lebenswichtige Prozesse in den Zellen stören. In anderen Fällen dürfte das Immunsystem eine Tumorzelle als fremd erkennen und durch eine effiziente Immunantwort eliminieren. Sobald ein Tumor jedoch heranwächst und möglicherweise metastasiert, ist das Immunsystem offensichtlich nicht in der Lage, eine ausreichende Abwehr gegen die Tumorzellen zu bilden.

Das von Burnet (1971) vorgestellte Konzept der Immunüberwachung geht von einer Hauptrolle der T-Zell-vermittelten Immunität aus, die Tumorzellen bei ihrer Entstehung eliminiert, da diese durch die Expression neuer Epitope vom Immunsystem als fremd erkannt werden. Diese Antigene werden unterteilt in tumorassoziierte- (TAA) und tumorspezifische- (TSA) Antigene [Davies 1957]. Zu letztgenannten zählen auch solche, die durch Reexpression oder durch Erwerb von embryonalen oder Differenzierungsantigenen zustande kommen. TSA sind echte Tumorantigene, da sie nur auf Tumorzellen erscheinen, während TAA sowohl auf neoplastischen als auch auf normalen Zellen exprimiert werden.

TAA werden in Tumorzellen überexprimiert, kommen aber in geringerer Dichte auch auf nicht entarteten Zellen vor. Zu dieser Gruppe gehören die Onkofetalantigene wie Alphafetoprotein (AFP) und karzinoembryonales Antigen (CEA), die in Tumoren der Leber, der Gonaden und bei verschiedenen Adenokarzinomen wieder gebildet werden. Bei Plattenepithelkarzinomen findet sich das „Plattenepithelkarzinom-Antigen (SCC)“. Diese Antigene sind hrend der fetalen Entwicklung stark exprimiert, beim Erwachsenen nur schwach. Sie werden auch als Tumormarker bei Patienten verwendet, da sie im Serum als lösliche Proteine zirkulieren.

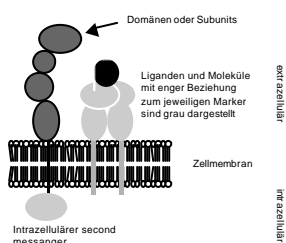
2.1. Tumorinfiltrierende Lymphozyten

Operativ entfernte Tumoren weisen manchmal ein mononukleäres Zellinfiltrat auf, welches nicht zum Ausmaß der Gewebenekrose paßt. Solche Infiltrate sind heterogen zusammengesetzt und enthalten häufig mononukleäre Phagozyten, Lymphozyten verschiedener Subtypen und einen kleineren Teil anderer Zellen wie Plasmazellen und Mastzellen [Bordignon et al. 1999]. Das Auftreten signifikanter Lymphozyteninfiltrate einschließlich zytotoxischer Lymphozyten in bestimmten Tumoren läßt vermuten, daß eine Immunreaktion gegen tumorspezifische Antigene stattfindet. Klinische Beobachtungen deuten darauf hin, daß Patienten mit Tumoren, die ein lymphoides Infiltrat aufweisen, eine bessere Prognose haben, als solche ohne Infiltrat [Kreider et al. 1984, Wolf et al. 1986, Marrogi et al. 1997, Naito et al. 1998]. Dies hat zur Entwicklung von Therapieprotokollen geführt, in denen Lymphozyten von chirurgisch entfernten Tumoren gewonnen, zur Produktion von Killerzellen in Kulturen kloniert und dann dem Patienten retransfundiert werden, um so die Immunreaktion gegen den Tumor zu verstärken [Bordignon et al. 1999]. Bisher wurden diese tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) aus OP-Präparaten, insbesondere aus Melanomen und Nierenzellkarzinomen, isoliert und nach Vermehrung in vitro zurücktransfundiert, allerdings ohne großen Erfolg [Rosenberg et al. 1990, Beldegrun et al. 1993, Chang et al. 1997]. In vielen Fällen reagierten diese TIL spezifisch mit dem Tumor, sie hatten jedoch die zytotoxische Aktivität verloren.

Tab. 2: Lymphozyten und andere Leukozyten exprimieren sehr viele verschiedene Moleküle oder „Marker“ auf ihrer Zelloberfläche, die der Unterscheidung ihrer Zellpopulation dienen. Viele dieser Moleküle können mittlerweile mit spezifischen monoklonalen Antikörpern identifiziert werden. Für die Zelloberflächenmarker wurde eine systematische Nomenklatur entwickelt, das CD-System (clusters of differentiation), in dem die Marker fortlaufend als CD1, CD2 usw. nummeriert werden. Es existieren heutzutage 130 CD's [Knapp et al. 1989, Pinto et al. 1994]. Hier werden die für die vorliegende Arbeit wichtigsten Zelloberflächenmarker unter Berücksichtigung zusätzlicher Bezeichnungen, des Molekulargewichtes, ihrer Expression auf bestimmten Zelltypen, chromosomale Lokalisation ihrer Gene [Williams et al. 1988] sowie ihrer Funktion vorgestellt. Die mit • gekennzeichneten Marker gehören zu der Immunglobulin-Superfamilie [Apiller et al. 1989, Keegan et al. 1992], die mit •• gekennzeichneten Marker werden der CCP-Superfamilie zugeordnet [Janeway & Travers 1995].

CD-Antigen mAK	schematische Darstellung	MG (kD)	Zellen, die das Antigen exprimieren	Funktionen										
CD 2 • (T11, LFA-2) [Howard et al. 1981]		45 - 58	Thymozyten, T-Zellen, natürliche Killerzellen	Adhäsionsmolekül, das an CD 58 (LFA-3) bindet, kann T-Zellen aktivieren										
CD 3 • (T3, UCHT1, Leu4) [Kung et al. 1979]		<table border="0"> <tr><td>γ</td><td>25 - 28</td></tr> <tr><td>δ</td><td>20</td></tr> <tr><td>ε</td><td>20</td></tr> <tr><td>ζ</td><td>16</td></tr> <tr><td>η</td><td>22</td></tr> </table>	γ	25 - 28	δ	20	ε	20	ζ	16	η	22	Thymozyten, T-Zellen	Assoziiert mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen; notwendig für die Oberflächenexpression des T-Zell-Rezeptors und die Signalvermittlung über diesen Rezeptor.
γ	25 - 28													
δ	20													
ε	20													
ζ	16													
η	22													
CD 4 • (T4, L3T4) [Reinherz et al. 1979]		55	Einige Gruppen von Thymozyten, zytotoxische T-Zellen	Korezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle; bindet Ick an der zyttoplasmatischen Seite der Membran; Rezeptor für gp 120 von HIV-1 und HIV-2										
CD 8 • (T8) [Reinherz et al. 1980a]		<table border="0"> <tr><td>α</td><td>32 - 34</td></tr> <tr><td>β</td><td>32 - 34</td></tr> </table>	α	32 - 34	β	32 - 34	Einige Gruppen von Thymozyten, zytotoxische T-Zellen	Korezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle, bindet an der zyttoplasmatischen Seite der Membran						
α	32 - 34													
β	32 - 34													
CD 25 •• (Tac) [Uchiyama et al. 1981]		55	aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	α-Kette des IL 2-R, assoziiert mit IL 2-Rβ (CD122) und dem IL 2-Rγ										

CD-Antigen mAK	schematische Darstellung	MG (kD) / Chromosom	Zellen, die das Antigen exprimieren	Funktionen
CD 19 [Nadler et al. 1983]		95	B-Zellen	Bildet einen Komplex mit CD 21 (CR2) und CD 81 (TAPA-1); Core-rezeptor für B-Zellen
CD 16 • (Fc γ -R III) [Perussia et al. 1984]		50 - 80	neutrophile Zellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen	Bestandteil des niedrigaffinen Fc-Rezeptors (Fc γ -R III), vermittelt die Phagozytose und die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität.
CD 56 (NKH-I) [Lanier et al. 1986a]		175 - 185	natürliche Killerzellen	Isoform des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles (NCAM)
CD 45 (LCA, T 200, B 220) [Shaw et al. 1987]		180 - 240	Leukozyten	Tyrosinphosphatase; erhöht die Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen; durch alternatives Spleißen entstehen viele Isoformen
CD 45 R0 [Smith et al. 1986]		180	Untergruppen von T- und B-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Isoform von CD 45, die weder das A-, das B- noch das C-Exon enthält
CD 45 RA [Streuli et al. 1987]		205 - 220	B-Zellen, Untergruppen von T-Zellen (naive T-Zellen), Monozyten	Isoform von CD 45 mit A-Exon
HLA-DR • [Steel et al. 1984]		α 34 β 29	Langerhanszellen, B-Zellen, interdigitierende dendritische Zellen des lymphatischen Gewebes, Monozyten, Makrophagen, aktivierte T-Zellen	Erkennung von „Selbst“ und „nicht-Selbst“



Während alle anderen Zellen ihre Entwicklung im Knochenmark durchlaufen, scheinen T-Lymphozyten und NK-Zellen über eine gemeinsame Vorläuferzelle zu verfügen, die in den Thymus wandert und dort zu immunkompetenten Zellen reift [Sanchez et al. 1994]. Alle Zellen gelangen schließlich in den Blutkreislauf und erfüllen, je nach Typ, dort oder in Geweben ihre Funktion.

Die wichtigsten Zellen der immunologischen Abwehr sind die Leukozyten. Zu ihnen gehören Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Als gemeinsames Erkennungsmerkmal tragen sie und ihre hämatopoetischen Vorläuferzellen das CD45-Molekül auf der Zelloberfläche. Dieser auch als „leucocyte common antigen (LCA)“ oder T200 bezeichnete Oberflächenmarker umfaßt eine Glykoproteinfamilie mit Molekulargewichten zwischen 180 und 220 kDa [Shaw et al. 1987, Ralph et al. 1987]. CD45 besteht aus einer stark glykosylierten externen Domäne (391 - 552 AS), einer Transmembranregion und einer großen, aus zwei Abschnitten bestehenden zytoplasmatischen Domäne (707 AS) mit einer intrinsischen Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPase)-Aktivität [Streuli et al. 1988]. Die PTPase aktiviert Tyrosinkinase, die mit den Rezeptor- und Korezeptormolekülen der T- und B-Zellen assoziiert sind [Charbonneau et al. 1988, Dianzani et al. 1992]. Das CD45-Molekül ist somit an der Signalweiterleitung über die Antigenrezeptoren von B- und T-Zellen beteiligt [Koretzky et al. 1990, Justement et al. 1991].

Die immunologische Abwehr läßt sich in unspezifische und spezifische Systeme untergliedern. Beide Systeme bestehen aus Zellen und löslichen Komponenten, die im Kampf gegen Tumoren und Infektionserreger eng zusammenarbeiten. Bei den Vorgängen der spezifischen Immunität sind Lymphozyten wie T- und B-Zellen beteiligt. T-Zellen reagieren über den T-Zell-Rezeptor (TCR) mit nicht-normalen körpereigenen Zellen, virusinfizierten Zellen oder Krebszellen. B-Zellen können nach Antigenkontakt an ihrem membranständigen Immunglobulin (Ig) antigenspezifische Antikörper sezernieren. Im Gegensatz dazu besitzen die NK-Zellen keine Oberflächenantigenrezeptoren und sind an der nichtspezifischen zellulären Tumolyse beteiligt.

3.1. T-Zelldifferenzierung und T-Zell-Subpopulationen

Die gemeinsame Vorläuferzelle der T- und NK-Zellen exprimiert beim Eintreffen im Thymus das Stammzellantigen CD34, das Enzym terminale Desoxyribonukleotidtransferase (Tdt), CD38 und das myeloische CD33. Aus diesen Vorläufern entstehen unmittelbar darauf die gemeinsamen T-NK-Vorläufer, die bereits eine hohe Expression der T-Zell-Antigene CD7 und cyCD3 aufweisen. Ab diesem Stadium trennen sich die Differenzierungswege der T-Zellen und der NK-Zellen [Gore et al. 1991, Spits et al. 1995].

Die Vorläufer der T-Lymphozyten unternehmen im Thymus eine Wanderung von der äußeren Rinde bis in das Mark, wobei sie die typischen T-Zelleigenschaften erwerben. Voraussetzung für die Ausdifferenzierung ist dabei der Kontakt mit den dendritischen Epithelzellen des Thymus, die MHC-Antigene der Klasse I und II verfügen und eine Reihe von Thymushormonen bilden [Stutman 1978, Haynes 1984].

Die phänotypischen Variationen kann man vereinfacht in einen Dreistufenmodell darstellen [Reinherz et al. 1980b]:

Im Stadium I, werden von den frühen Thymozyten, die im Thymuskortex anzutreffen sind, CD7, CD2 und CD5 exprimiert. Ebenfalls treten Proliferationsmarker, wie der Transferrinrezeptor (CD71) und CD38, sowie der Homing-Rezeptor (CD62L) auf. Keines dieser Moleküle ist spezifisch für die T-Zellreihe. Die Zugehörigkeit zur T-Zellentwicklungslinie der frühen Thymozyten ergibt sich aus den Genrearrangements der TCR- β -Kette und der Bildung des TCR-assoziierten CD3-Komplexes, der hier jedoch nur zytoplasmatisch und noch nicht membranständig ist. Da diesen Zellen CD4 und CD8 fehlen, nennt man sie „doppelt negative“.

Das Stadium II, der intermediären Thymozyten, die ebenfalls in der Thymusrinde zu finden sind, ist durch das Erscheinen zusätzlicher Oberflächenmarker wie CD1 und der Koexpression von CD4 und CD8 auf derselben Zelle („doppelt positive Thymozyten“) gekennzeichnet. In diesem Stadium findet auch das Rearrangement der α -Kette des TCR-2 statt.

Im Stadium III, dem der reifen Thymozyten im Thymusmark, treten größere phänotypische Veränderungen auf: Verlust von CD1, membranständiges CD3 in Assoziation mit dem α/β TCR (TCR-2) und die klare Trennung in CD4-positive (T-Helfer) und CD8-positive (zytotoxische) T-Zellen, sogenannten „einfach positiven Zellen“. Der Mehrzahl der Thymozyten dieses Stadiums fehlt CD38, CD71 und Tdt [Janossi et al. 1981, Spits et al. 1995].

Die Effektorfunktionen, wie die spezifische Abtötung virusinfizierter oder entarteter Zellen obliegt den zytotoxischen T-Lymphozyten. Sie erkennen Antigene in Kombination mit MHC-Klasse-I Molekülen. Die Rolle der T-Helferzellen liegt hauptsächlich in der Koordination der Immunantwort. Sie erkennen Fremdanigene in Kombination mit MHC Klasse-II-Molekülen [Meuer et al. 1982, Swain, et al. 1983].

3.1.1. Der T-Zell-Rezeptor und CD3-Komplex

Der T-Zell-Antigenrezeptor selbst ähnelt einem membrangebundenen Immunglobulin-Fab-Fragment, dem Antigenrezeptor der B-Zellen. Jeder Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, den sogenannten T-Zell-Rezeptor- α -(45 kDa) oder β (40 kDa)-Ketten, die miteinander durch eine Disulfidbrücke verbunden sind [Kappler et al. 1983, Yanagi et al. 1984].

Die $\alpha\beta$ -Heterodimere (TCR-2) sind für die Antigenerkennung aller funktionellen Klassen von T-Zellen verantwortlich. Es gibt noch einen weiteren Typ des T-Zell-Rezeptors. Dieser besteht aus anderen Polypeptidketten, die als γ (36 - 55 kDa) und δ (40 - 60 kDa) bezeichnet werden. 95% aller T-Zellen tragen den TCR-2 Rezeptor, nur 5% den TCR-1 [Brenner et al. 1986, Borst et al. 1987, Fowlkes et al. 1989].

Beide Formen des TCR, $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ sind mit einem aus fünf Polypeptiden zusammengesetzten Komplex assoziiert, dem CD3. Im Gegensatz zum Heterodimer des T-Zell-Rezeptors haben die CD3-Proteine zytoplasmatische Ausläufer über die sie mit signalübertragenden Proteinen interagieren können. Die Proteine, die mit Immunglobulinen verwandt sind, werden als CD3 γ (25 kDa), CD3 δ (20 kDa), CD3 ϵ (20 kDa) bezeichnet. Diese Ketten sind untereinander und mit dem $\alpha\beta$ -Heterodimer des TCR nichtkovalent verbunden. Der TCR-Rezeptor leitet über diesen Transmembrankomplex die Signale in die T-Zelle weiter [Borst et al. 1983a, Borst et al. 1983 b, Borst et al. 1984].

Die beiden anderen Proteinen, ζ (16 kDa) und η (22 kDa), sind auch Teil dieses Komplexes, und zwar entweder als $\zeta:\zeta$ -, $\zeta:\eta$ - oder als $\square:\square$ -Dimere, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind [Weissmann et al. 1986, Baniyash et al. 1988, Clayton et al. 1990]. Ungefähr 80 Prozent der T-Zell-Rezeptoren an der Zelloberfläche sind mit einem $\zeta:\zeta$ Dimer assoziiert, die übrigen mit einem $\zeta:\eta$ -Dimer [Baniyash et al. 1988].

Im Gegensatz zu den anderen CD3-Ketten haben weder die ζ - noch die η -Polypeptide ausgeprägte extrazelluläre Domänen, der Hauptanteil dieser Polypeptide befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite und dient der Signaltransduktion. Besonders die ζ -Ketten assoziieren sich mit zytoplasmatischen Proteintyrosinkinasen, vor allem mit $p59^{fyn}$, die nach der Ligandbindung an den TCR das Anfügen von Phosphatgruppen an Tyrosine von Proteinen katalysiert [Sussmann et al. 1988, Samelson et al. 1990].

Die CD3-Proteine sind auch für die Expression des T-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche erforderlich. Mutierte Zellen, denen entweder die T-Zell-Rezeptorketten oder eine der γ -, δ - oder η -Ketten des CD3-Komplexes fehlen, können keine Bestandteile des Komplexes auf der Zelloberfläche exprimieren [Martin et al. 1999].

3.1.2. Zell-Adhäsionsmolekül, CD2

Ein weiterer T-Zellmarker ist das CD2-Adhäsionsmolekül (50 kDa), auch leukozytenfunktionsassoziiertes-Antigen-2 (LFA-2) oder Schaf-Erythrozytenrezeptor (SRBC) genannt. Die Bindung von CD2 an den Liganden LFA-3 (CD58) verstärkt die Zell-Zell-Adhäsion. Dies ist wahrscheinlich für die funktionelle Bindung von T-Helferzellen an Antigen-präsentierenden Zellen, von CTL an ihre Zielzellen und von reifen Thymozyten an die Epithelialzellen im Thymus wichtig [Elangbam et al. 1997]. Zusätzlich zu seinen Adhäsionseigenschaften trägt CD2 durch Signalübertragungen in die T-Zelle zur T-Zell-Aktivierung bei und zwar in Verbindung mit dem TCR/CD3-Komplex. Desweiteren ist CD2 an der T-Zell-vermittelten Zytolyse beteiligt. Alloantigene sowie Lektine können durch Bindung an CD2 T-Zellen aktivieren, ohne daß ein T-Zell-Rezeptor involviert ist [Westphal et al. 1993, Elangbam et al. 1997].

3.1.3. Erkennungs- und Aktivierungsmarker, HLA-DR

Eine besondere Rolle bei der Erkennung von Fremdstoffen durch T-Zellen spielen spezielle körpereigene Gewebeantigene, die Haupt-Histokompatibilitätsantigene. Sie werden von einem Genkomplex kodiert, dem sogenannten Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC). Die Genprodukte des MHC nennt man beim Menschen „humanes Leukocyten Antigen“ (HLA). Die biologische Funktion der MHC-Moleküle besteht darin, T-Zellen Antigene anzubieten, da diese Lymphozyten nur auf Antigene reagieren können, wenn sie an körpereigene MHC-Moleküle gebunden sind.

Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen, die Klasse-I- (HLA-A, -B und -C) und die Klasse-II-Moleküle (HLA-DP, -DQ und -DR). Die MHC-Klasse-I-Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers [Marrack et al. 1986] die MHC-Klasse-II-Moleküle kommen dagegen nur auf bestimmten Immunzellen vor, beispielsweise auf Langerhanszellen der Haut, B-Lymphozyten, interdigitierenden dendritischen Zellen der lymphatischen Gewebe, Monozyten, Makrophagen und aktivierten T-Zellen.

MHC-II-Moleküle bestehen aus einem nichtkovalenten Komplex zweier Ketten, $\nu\beta$ (34 kDa) und $\nu\alpha$ (29 kDa), die beide Kohlenhydratgruppen tragen und die Plasmamembran durchdringen. Jede Kette hat zwei Domänen. Die $\nu\beta_2$ - und $\nu\alpha_2$ -Domänen haben ähnliche Aminosäure-Sequenzen und Strukturen wie die konstanten Domänen von Immunglobulinen.

Die Peptidbindungsregion der Klasse-II-Moleküle wird durch die Interaktion von beiden Ketten unter Einbeziehung der α_1 β_1 -Segmente gebildet. Im Gegensatz zu den MHC-Molekülen der Klasse I sind bei MHC-Molekülen der Klasse II die Enden der Bindungsgrube offen, was den präsentierten Peptiden erlaubt, über die Ränder der Grube hinauszuragen [Brown et al. 1988, Brown et al. 1993].

3.2. B-Zellen

Charakteristische Marker der B-Lymphozyten-Reihe sind membranständige Immunglobuline, die als Antigenrezeptoren auf der Zelloberfläche fungieren. Die meisten B-Zellen exprimieren im peripheren Blut zwei Immunglobulinisotypen auf ihrer Oberfläche, IgM und IgD. Im Gegensatz dazu erscheint auf zirkulierenden B-Zellen im Kreislauf sehr wenig membrangebundenes IgG, IgA oder IgE.

Sowohl IgM als auch IgD sind auf der Zelloberfläche nicht-kovalent mit mindestens zwei anderen Proteinen, genannt $Ig\alpha$ und $Ig\beta$, assoziiert. Gemeinsam bilden sie den Antigenrezeptorkomplex [Van Noesel et al. 1990, Reth et al. 1991]. Diese Proteine werden benötigt, um IgM und IgD stabil auf der Oberfläche zu exprimieren [Venkitaraman 1991]. Zusätzlich verbindet $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ die Membran-Ig-Moleküle mit mehreren Tyrosinkinasen: blk, ick, fyn, lyn. $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ werden nach Antigen-Bindung phosphoryliert. Die Membran-Ig-Moleküle unterstützen die Zusammenführung der an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligten Proteine, wie z.B. Kinasen.

Die Mehrzahl der B-Zellen trägt MHC-Klasse-II Antigene und Komplementrezeptoren für C3b (CR1, CD35) und C3d (CR2, CD21) sowie Fc-Rezeptoren für exogene IgG (Fc γ RII, CD32). CD19, CD20 und CD22 sind die am häufigsten genutzten Marker zur Identifizierung menschlicher B-Zellen. Ebenfalls für diesen Zweck geeignet sind CD72 - CD78 und eine 220 kDa schwere Isoform des CD45 (B220) [Banchereau et al. 1992].

Das CD19-Antigen bildet mit zwei anderen Proteinen den B-Zell-Korezeptor. Die erste Komponente des Korezeptors, CR2 kann das auf der Oberfläche follikulärer dendritischer Zellen exprimierte CD23-Molekül aufnehmen und somit die Empfindlichkeit der B-Zellen für ein Antigen erhöhen. Der zweite Bestandteil, TAPA-1 (CD81), ist ein schlangenförmiges Protein mit vier Transmembran-Domänen [Matsumoto et al. 1991]. Der Komplex steht über das zytoplasmatische Ende von CD19 mit der Tyrosinkinase lyn in Verbindung. Die Aggregation von CD19 mit Immunglobulinen verstärkt die Signalübertragung der B-Zellen.

Die Antigenbindung verursacht gemeinsam mit bestimmten, von T-Zellen ausgehenden Aktivierungssignalen die Proliferation der B-Zelle. Der expandierte Klon differenziert sich in Gedächtnis- und Plasmazellen, wobei letztere als Effektoren agieren. Die Plasmazellen synthetisieren und sezernieren große Mengen Immunglobulinmoleküle mit der selben Antigen-spezifität, die der Ausgangs-B-Zelle als Antigenoberflächenrezeptor gedient hat.

3.3. Natürliche Killerzellen

Die NK-Zellen, deren Anteil an PBL ca. 15% beträgt, sind große, granuliert, lymphoide Zellen, die keine antigenspezifischen Oberflächenrezeptoren besitzen, die ein Genrearrangement erfordern, wie z.B. TCR oder Membran-Ig. Sie lassen sich somit weder den B- noch den T-Lymphozyten zuordnen [Lanier et al. 1986b]. Die meisten Oberflächenantigene, die mittels monoklonaler Antikörper auf NK-Zellen nachweisbar sind, werden mit T-Zellen oder Zellen der Monozyten / Makrophagen-Reihe geteilt. Hierzu zählen MHC-I, CD2, CD7, CD11a, CD11c, CD18, CD25, CD8, CD38, CD71, CD16 und CD56 [Trinchieri 1989]. Die Mehrzahl der humanen reifen NK-Zellen weisen den Phänotyp $CD3\gamma\delta\epsilon^- CD56^+ CD16^+$ auf, eine Minderheit besitzt das Antigenmuster $CD3^- CD56^- CD16^+$ bzw. $CD3^- CD56^+ CD16^-$ [Lanier et al. 1986a].

Die Hauptfunktion der NK-Zellen besteht in der Abtötung von Tumorzellen, insbesondere an eine Gewebekultur adaptierte Zellen und virusinfizierte Zellen mit Hilfe zytotoxischer Mechanismen. Sie spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Bakterien, Protozoen und Pilzen und der Regulation von Immunantworten [Herberman et al. 1981, Trinchieri 1989]. Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen zerstören NK-Zellen unspezifisch Zielzellen, die kein MHC bzw. Fremd-MHC exprimieren, eine Eigenschaft die generell als MHC-unabhängige Zytotoxizität bezeichnet wird [Grimm et al. 1982, 1993].

Nach Anlagerung an die Zielzellen setzen NK-Zellen porenbildende Proteine (PFP), Serinesterasen und andere zytolytische Faktoren frei, welche die Zellmembran der Zielzelle mit Poren durchsetzen und zu deren Lyse führen. Die NK-Zellen bilden nach heutigem Stand der Forschung kein immunologisches Gedächtnis.

4. Zytokine

Der Begriff Zytokin wird heute meist als generelle Bezeichnung für lösliche Proteine und Peptide verwendet, die als chemische Mediatoren bereits in nano- bis picomolaren Konzentrationen biologisch wirksam werden. Zytokine werden auch von Fibroblasten und Endothelzellen gebildet, die Hauptproduzenten sind jedoch die Immunzellen, Makrophagen bzw. Lymphozyten [Cohen et al. 1974, Barkwill & Burke 1989, Holtmann et al. 1995].

Zytokine gewährleisten eine sinnvolle und geordnete Zusammenarbeit der verschiedenen Komponenten des Immunsystems. Sie beeinflussen Entwicklung und Reifung von Immunzellen (Hämatopoese) und spielen eine entscheidende Rolle bei der Auslösung, Regulation und Beendigung einer Immunantwort. Weiterhin sind sie an wichtigen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Wundheilung und generelle systematische Reaktionen bei Organ- und Gewebeverletzungen beteiligt. Darüber hinaus gibt es auch Zytokine, die auf ihre Zielzellen toxisch wirken.

Zu den Zytokinen gehören Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrose-Faktor (TNF), Transforming-Growth-Faktor (TGF) und Interleukine [Holtmann et al. 1995].

4.1. Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2), ursprünglich als T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF) bezeichnet, ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 15 kDa, das nach Antigenkontakt von T-Lymphozyten synthetisiert und freigesetzt wird [Morgan et al. 1976, Gillis et al. 1978, Mizel et al. 1979, Taniguchi et al. 1983].

Dieses von einem einzelnen Gen auf dem Chromosom 4 kodierte Lymphokin wird zunächst in den Zellen als 153 Aminosäuren lange Vorläufer-Form synthetisiert, wobei die ersten 20 aminoterminalen Aminosäuren als hydrophobe, sekretorische Signalsequenz fungieren [Dumonde et al. 1969, Taniguchi et al. 1983, Seigel et al. 1984]. Das reife IL-2 besteht aus 133 Aminosäuren. IL-2 ist am Threoninrest der Position 3 O-glykosyliert und enthält eine einzige Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten in den Positionen 58 und 105 [Taniguchi et al. 1983, Brandhuber et al. 1987]. Das Molekulargewicht von Interleukin-2 variiert je nach Art und Ausmaß der O-Glykosylierung.

Die Glykosylierung ist für die biologische Funktion des Proteins unwichtig, während das Protein durch Zerstörung der Disulfidbrücke seine Aktivität verliert [Taniguchi et al. 1983, Ju et al. 1987].

Die Effekte von IL-2 sind beispielsweise die T-Zell-Aktivierung, Steigerung der IFN- γ Produktion, Modulation der T-Zell-Rezeptor-Expression, tumorabtötende Aktivität, Wachstumsförderung von NK- und LAK-Zellen, Steigerung von B-Zellwachstum und Immunglobulinproduktion, sowie Makrophagen-Aktivierung [Henny et al. 1981, Nakanishi et al. 1984, Raulet et al. 1985, Malkovsky et al. 1987, Tigges et al. 1989]

4.2. Interleukin-2-Rezeptor

Der Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R) ist ein Membran-Rezeptor-Komplex, an dessen Bildung drei verschiedene Proteinketten, die α - (55 kDa), die β - (75 kDa) und die γ -Ketten (64 kDa) beteiligt sind [Leonard et al. 1984, Tsudo et al. 1986, Takeshita, et al. 1992]. Die α -Kette, die auch als Tac oder als CD25 bezeichnet wird, hat eine Länge von 251 AS. Sie setzt sich aus einer langen extrazellulären Domäne (219 AS) und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (13 AS) zusammen, ohne die keine direkte Signaltransduktion in die Zelle möglich ist.

Die β -Kette (CD122) ist 525 AS lang, mit einer 214 AS umfassenden extrazellulären Domäne und einer intrazellulären Domäne aus 286 AS [Hatakeyama et al. 1989]. IL-2 R β ist auch an der Bildung des IL-15-Rezeptors beteiligt. Es spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion, ohne jedoch selbst eine Enzymaktivität zu besitzen [Waldmann et al. 1998].

Die γ -Kette (CD132) ist selbst nicht an der direkten Bindung des IL-2-Moleküls beteiligt, besitzt aber eine wichtige Funktion für die Signaltransduktion [Hatakeyama et al. 1989, Takeshita et al. 1992]. Mutationen in dem Gen für diese 64 kDa schwere Kette führen zu einem schweren kombinierten Immundefekt, da diese Kette an der Bildung verschiedener Interleukin-Rezeptoren beteiligt ist (IL-4, IL-7, IL-9, IL-13) [Matthews et al. 1995].

Dieser Rezeptormultimer-Komplex kann in drei Formen mit unterschiedlicher Affinität für IL-2 in der Zellmembran vorliegen. Während bei der Bindung mit niedriger Affinität die α -Kette des IL-2 Rezeptors involviert ist, liegen IL-2R-Komplexe mit mittlerer Affinität als Heterodimere entweder mit der α/γ oder den β/γ -Ketten vor.

Die Produktion und die Assoziation der α -Kette mit den schon vorhandenen $\beta\gamma$ -Ketten führt zur Formation des hochaffinen IL-2 Rezeptors, einem Heterotrimer aus $\alpha/\beta/\gamma$ -Kette, der IL-2 bindet und die Mitose in Gang setzt. [Minami et al. 1993].

Die Expression von IL-2R α , IL-2R β und IL-2R γ bei verschiedenen Populationen von humanen peripheren Blutzellen wurde durch Färbung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern γ -Kette ohne Stimulation auf T-, B-, NK-Zellen sowie Monozyten und Granulozyten exprimiert wird, findet man bei denselben Zellen unterschiedliche Expression der α - und der β -Ketten. So finden sich auf der Oberfläche ruhender T-, B- oder NK-Zellen $\beta\gamma$ -Ketten [Dukovich et al.1987], jedoch keine α -Ketten [Farrar et al.1990]. Durch Stimulation der T- und B-Zellen durch ein adäquates Antigen wird die zusätzliche Expression der α -Kette induziert, sie sind somit in der Lage den hochaffinen Rezeptor zu bilden [Waldmann 1984, Waldmann 1986, Waldmann 1991, Tsudo et al. 1987, Farrar et al. 1990]. Eine Ausnahme bilden einige Tumorzellen, die diese Kette konstitutiv exprimieren. Nur eine sehr geringe Zahl von NK-Zellen ist ebenfalls in der Lage, IL-2 α zu bilden. Die Zugabe von IL-2 zu großen granulären Lymphozyten fördert die natürliche Killerzell- (LAK)-Aktivität sowie die Expression der IL-2 α -Kette. IL-2 R β wird ebenfalls auf LAK exprimiert [Tsudo et al. 1987, Nagler et al. 1990].

4.3. T-Zellaktivierung

Obwohl es zwei funktionell und phänotypisch unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen gibt, CD4⁺-Helfer und CD8⁺zytotoxische T-Zellen, sind ihre Aktivierungsschritte weitgehend dieselben. Das erste Aktivierungssignal für eine T-Zelle ist die Bindung ihres $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors an eine Antigen-präsentierende Zelle. So können sie Antigene erkennen, die ihnen durch Proteine des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert werden. Wenn sich der $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor und der Hilfsrezeptor CD4 an MHC-II-Molekül bindet, wird die T-Helferzelle aktiviert. CD8-tragende T-Zellen können nur mit MHC-Klasse-I-positiven Zellen interagieren [Sakihama et al. 1995, Gao et al. 2000].

Weitere akzessorische Moleküle (CD28/B7, CTLA-4/B7, LFA-1/ICAM-1, CD2/LFA-3 und andere) verstärken die Bindung und sind für die weitere Aktivierung von entscheidender Bedeutung [Wingren et al. 1995, Greenfield et al. 1998]. Um diesen Aktivierungs-Prozeß zu vervollständigen, muß die antigenpräsentierende Zelle ein zweites Signal aussenden, und zwar in Form des Lymphokins Interleukin-1 (IL-1). Die T-Zelle produziert nach ausreichender Aktivierung durch Signal 1 und Signal 2 das Molekül IL-2 sowie dessen hochaffinen Rezeptor. Das sezernierte IL-2 entfaltet seine Wirkung sowohl autokrin - durch Bindung an die produzierende Zelle, als auch parakrin - durch Bindung an benachbarte aktivierte Zellen. Die Bindung von IL-2 führt im Sinne einer positiven Rückkopplung zu einer weiteren Expression von IL-2 und seinem Rezeptor. Das Zusammenspiel der verschiedenen Signale führt schließlich zur Proliferation und klonalen Expansion der aktivierten Zellen [Wingren et al. 1995].

4.3.1. IP₃/ DAG-Weg

Die TCR-Bindung führt zur Aktivierung von Phospholipase C, welche die Produktion von Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diazylglycerol (DAG) über die Hydrolyse des Phosphatidyl-Inositoldiphosphats zur Folge hat. IP₃ initiiert eine Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, wohingegen DAG an der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) beteiligt ist [Gupta et al. 1989]. Der Aktivierungsprozeß erfolgt unter Beteiligung einer komplexen Phosphorylierungsabfolge von TCR-Komponenten (CD3), CD4 oder CD8 sowie dem Leukozytenantigen CD45. CD45 ist eine Phosphatase und mit CD4 assoziiert. Zusätzlich zur PKC sind an diesen Schritten zwei weitere Kinasen (p56^{lck}, assoziiert mit CD4 oder CD8 und p59^{lyn}) beteiligt [Ledbetter et al. 1993, Fischer et al. 1994].

5. Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von der Erkenntnis, daß zelluläre und humorale Abwehrreaktionen bei der Krebserkrankung von Bedeutung sind, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß des Tumors auf den Immunstatus bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Aerodigestivtrakt untersucht. Dabei wurden die Patienten unter Berücksichtigung von Tumorgröße, Tumormalignität und Lymphknotenmetastasen eingruppiert. Außerdem war der Therapiemodalitäten wie z.B. Operation, Chemo,- Bestrahlungs- und kombinierte Radio-Chemotherapie auf die Phänotypen der Immunzellen und auf die Funktion des Immunsystems dieser Patienten von Interesse.

Hierfür sollen Subpopulationen peripherer Lymphozyten aus Vollblutproben durch die Expression von spezifischen Antigenen an der Zelloberfläche mit Hilfe fluorochrom-markierter, monoklonaler Antikörper identifiziert werden. Aufgabe war weiterhin, die Funktion der natürlichen Killerzellen (NK) und Lymphokin-aktivierter-Killerzellen (LAK) der Patienten mit einem Zytotoxizitätstest zu bestimmen.

Da Zytokine Mediatoren sind, welche die Aktivität der zellulären Immunabwehr stimulieren können, sollte die Konzentration von Interleukin-2 (IL-2), das nach Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen von T-Helferzellen freigesetzt wird, im Plasma von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen gemessen werden. Die Bindung des sezernierten IL-2 an die drei Ketten des IL-2R (α , β und γ) regt die Proliferation der T-Lymphozytenpopulationen an. Bei der Aktivierung der Zellen kommt es zur proteolytischen Abspaltung eines 42 kDa Fragments der α -Kette des IL-2 Rezeptors. Auch dieser lösliche IL-2 Rezeptor α soll in Plasmaproben der Tumorpatienten bestimmt werden.

Da sich nur 2% aller mononukleären Zellen im Blut befinden, haben auch die Zellen, die sich im Gewebe aufhalten, eine Bedeutung für die Tumorabwehr. Plattenepithelkarzinome im HNO-Bereich sind sowohl um den Tumor herum, als auch im Tumorstroma von mononukleären Zellen infiltriert. Daher sollten, Lymphozytenpopulationen mittels monoklonaler Antikörper im Primärtumor bzw. in metastasierten Lymphknoten untersucht werden. Durch Messung der Markerantigene CD45, CD3, CD8 und HLA-DR auf infiltrierenden Lymphozyten aus dem Primärtumor und auf Lymphozyten aus Lymphknotenmetastasen bzw. peripheren Blut soll die Eignung dieser Parameter als prognostische Marker untersucht werden.

II. Material

1. Geräte

Geräte	Hersteller
Auflichtmikroskop	Olympus IM/Japan
Begasungsbrutschrank	Heraeus/Hanau
Brutschrank	Heraeus/Hanau
elektrische Pipettierhilfe	Nunc/Wiesbaden
Facscan, fluoreszenz-aktivierter Zellsorter	Becton-Dickinson/Heidelberg
Fluorometer Arcus 1230	LKB-Wallac; Turku/Finland
Kühlschrank	Bosch/Stuttgart
mechanische Pipettierhilfe	Nunc/Wiesbaden
Mikrowelle	Bosch/Stuttgart
Minifuge RF mit Plattenrotor	Heraeus/Hanau
Photometer Model 550 („Elisa-Reader“)	Bio Rad/München
Schüttler	Heidolph/Kelkheim
sterile Werkbank (Sicherheitsstufe II)	Intermed und Ceag Schirp
Thoma-Kammer	Schreck/Hofheim
Tiefgefrierschrank (-20°C)	Bosch/Stuttgart
Vortex-Gerät Circomix	Braun/Melsungen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik /Burgwedel
Zentrifuge	Heraeus/Hanau

2. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Spezifizierung	Hersteller
Deckgläschen für Haemacytometer	20 x 26 mm	Menzel-Gläser
Deckgläser	25 x 50 mm	Menzel-Gläser
Einmaltransferpipette	3 ml	Elkay/Diezenbach
Eppendorf-Reagenzgefäße	1,5 ml	Eppendorf/Hamburg
Immunomodule	8 x 12 Vertiefungen	Nunc/Wiesbaden
Konisches Zentrifugenröhrchen; steril	11 ml, 50 ml	Nunc/Wiesbaden
Kryoröhrchen	4,5 ml, 1,8 ml	Nunc/Wiesbaden
Mikrotiterplatten; polysorb unsteril	96 Vertiefungen,	Nunc/Wiesbaden
Monovetten; 1,6 mg Kalium EDTA/ml Blut	2,7 ml, 10 ml	Sarstedt/Nürmbrecht
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen	200 µl, 1000 µl	Sarstedt/Nürmbrecht
Polypropylen Reagenzglas mit Rundboden (FACS-Röhrchen)	12 x 75 mm	Becton-Dickinson/ Heidelberg
Polystrol Einmalpipetten	5 ml, 10 ml	Nunc/Wiesbaden
Polystyrolzellkulturflasche	50 ml, 260 ml, 800 ml	Nunc/Wiesbaden
Zellkulturflaschen mit integrierten hydrophoben Filter in der Schraubdeckel	260 ml	Nunc/Wiesbaden
Multi-Adapter mit Luer-Konus		Sarstedt/Nürmbrecht
Venenpunktionsbesteck		Braun/Melsungen

3. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Formel	MG (g/mol)	Hersteller
3-Amino-9-ethylcerbazol	$C_{14}H_{14}N_2$	210,03	Sigma/Deisenhofen
Alkylphenylpolyethylenglykol (Triton X-100)	$C_{34}H_{62}O_{11}$	646,86	Merck/Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	141,96	Fluka/Neu-Ulm
Di-Natriumhydrogenphosphat- 2-hydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	177,99	Riedel-de-Haen/Seelze
Diethylentriaminopentaacetat (DTPA)	$C_{14}H_{23}N_3O_{10}$	393,35	Aldrich/Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	$(CH_3)_2SO$	78,13	Merck/Darmstadt
Ethanol (70 %, 95 %, 100 %)	CH_3CH_2OH	46,07	Apotheke Klinikum J.W.G.Universität
Europium (III) acetathydrat	$Eu (CH_3COO)_3 \cdot H_2O$	347	Aldrich/Steinheim
Formaldehyd (37 %)	H_2CO	30,03	Merck/Darmstadt
Glycin	$C_2H_5NO_2$	75,07	Sigma/Deisenhofen
Hydroxymethylaminomethan	$C_4H_{11}NO_3$	121,14	Riedel-de-Haen/Seelze
Kalciumchlorid	$CaCl_2$	110,99	Merck/Darmstadt
Kalium-Dihydrogenphosphat	KH_2PO_4	136,06	Merck/Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	74,55	Riedel-de-Haen/Seelze
Kalziumchlorid-2-hydrat	$CaCl \cdot 2H_2O$	147,02	Merck/Darmstadt
Magnesiumchlorid	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	203,30	Merck/Darmstadt
Methanol	CH_3OH	32,04	Riedel-de-Haen/Seelze

II. Material

Chemikalien/Reagenzien	Formel	MG (g/mol)	Hersteller
N,N-Dimethylformamid	C_3H_7NO	73,09	Sigma/Deisenhofen
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure	$C_8H_{18}N_2O_4S$		Gibco BRL/Eggenstein
Natriumacetat	$C_2H_3NaO_2$	82,03	Riedel-de Haen/Seelze
Natriumazid	NaN_3	65,01	Merck/Darmstadt
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	105,99	Merck/Darmstadt
Natriumchlorid	$NaCl$	58,44	Roth/Karlsruhe
Natriumchloridlösung; isotonisch	$NaCl$	58,44	Braun/Melsungen
Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	156,01	Merck/Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	84,01	Merck/Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	137,99	Merck/Darmstadt
Natriumhydroxid	$NaOH$	40,00	Merck/Darmstadt
Penicillin G (25.000.000 U)	$C_{16}H_{17}N_2O_2O_4SNa$	356,4	Sigma/Deisenhofen
Schwefelsäure	H_2SO_4	98,08	Merck/Darmstadt
Streptomycinsulfat		1457,39	Gibco BRL/Eggenstein
Tris-Hydrochlorid (Tris/HCl)	$C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$	157,64	Stratagene/Heidelberg
Wasserstoffperoxid (30 %)	H_2O_2	34,01	Merck/Darmstadt
Xylol	C_8H_{10}	106,17	Merck/Darmstadt
Zitronensäure Monohydrat	$C_6H_8O_7H_2O$	210,14	Roth/Karlsruhe

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Ficoll-Histopaque 1077 (d=1,077)	Sigma/Deisenhofen
Aquatex (wässriges Eindeckmittel)	Merck/Darmstadt
Desoxyribonukleinsäure (DNA)	Sigma/Deisenhofen
Dextransulfat	Sigma/Deisenhofen
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL/Eggenstein
Enhancement-Lösung (Delfia)	Pharmacia LKB/Freiburg
Folin-Ciocalteus Phenol Reagenz	Merck/Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco BRL/Eggenstein
Hämalaun nach Mayer	Apotheke Klinikum J.W.G. Universität
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Seromed/Berlin
Lysing-Solution	Becton-Dickinson Heidelberg
n-Interleukin-2 (2 x 10 ⁵ U/ml)	Biotest/Dreieich
Proteinase K	Sigma/Deisenhofen
Rinderserumalbumin	Sigma/Deisenhofen
Trypanblau	Sigma/Deisenhofen

4. Antikörper und Elisa-Testsysteme

Monoklonale Antikörper	Antigen	Hersteller
FITC-konjugiert Maus-anti-human	CD45	Becton-Dickinson/Heidelberg
FITC-konjugiert Maus-anti-human	CD45 Ra	Immunotech/Hamburg
FITC-konjugiert Maus-anti-human	CD2	Becton-Dickinson/Heidelberg
FITC-konjugiert Maus-anti-human	CD3	Becton-Dickinson/Heidelberg
FITC-konjugiert Maus-anti-human	CD16	Becton-Dickinson/Heidelberg
PE-konjugiert Maus-anti-human	CD19	Becton-Dickinson/Heidelberg
PE-konjugiert Maus-anti-human	CD25	Becton-Dickinson/Heidelberg
PE-konjugiert Maus-anti-human	CD56	Becton-Dickinson/Heidelberg
PE-konjugiert Maus-anti-human	HLA-DR	Becton-Dickinson/Heidelberg
PE-konjugiert Maus-anti-human	CD45R0	Immunotech/Hamburg
Simultest-Doppelfluoreszenz (FITC-, PE-) konjugiert Maus-anti-human	CD4/CD8	Becton-Dickinson/Heidelberg
Simultest-Doppelfluoreszenz (FITC-, PE-) konjugiert Maus-anti-human	CD3/CD19	Immunotech/Hamburg
Maus-anti-human	CD8	Dako/Hamburg
Maus-anti-human	CD45	Immunotech/Hamburg
Maus-anti-human; verdünnt	CD45	Immunotech/Hamburg
Kaninchen-anti-human	CD3	Dako/Hamburg
Maus-anti-human	HLA-DR	Dako/Hamburg
Maus-anti-human	CD25	Dako/Hamburg
Sekundärantikörper/konjugierte Enzyme		Hersteller
Ziege-anti-Maus konjugiert mit Biotin-SP		Dianova/Hamburg
Maus-anti-Ziege konjugiert mit Biotin-SP		Dianova/Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen konjugiert mit Biotin-SP		Dianova/Hamburg
Peroxidase konjugiert mit Streptavidin		Zymed/München
Elisa-Testsysteme		Hersteller
Interleukin-2-Rezeptor	CD25	Dako/Hamburg
Human IL-2 Immunoassay	IL-2	R & D System/Wiesbaden

5. Zelllinien

<i>Raji:</i>	Burkittlymphom	ATCC/USA
<i>K562:</i>	chronische myeloische Leukämie	ATCC/USA

6. Lösungen

6.1. Vitalitätstest

0,5% ige Trypanblaulösung

0,9 g NaCl
0,5 g Trypanblaufarbstoff
auf 100 ml H₂O dest auffüllen und mit 0.45 µm-Filter filtrieren

6.2. Dichtegradientenzentrifugation

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2 (I)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
0,5 mM	MgCl ₂ • 6H ₂ O
6,5 mM	Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
0,9 mM	CaCl • 2H ₂ O

6.3. Zytotoxizitätstest

Puffer A pH 7,4

50 mM	HEPES
93 mM	NaCl
5 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂ • 6H ₂ O

Markierungspuffer für Raji-Zellen

770 µl Puffer A
100 µl DTPA (25 mM in 0,01 M NaOH)
100 µl Eu-acetathydrat (10 mM)

Markierungspuffer für K562-Zellen

870 µl Puffer A
50 µl DTPA
50 µl Eu-acetathydrat

Inkubationsmedium pH 7,2

DMEM
10 % FKS
10 mM HEPES
18 mM NaHCO₃
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Waschmedium pH 7,2

DMEM
10 % FKS
10 mM HEPES
18 mM NaHCO₃
1,6 mM CaCl₂

6.4. Biotin-Streptavidin-Peroxidase Methode

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) pH 7,4

0,05 M	Tris/HCl
0,15 M	NaCl

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2 (2)

123 mM	NaCl
3,1 mM	KH ₂ PO ₄
10,4 mM	Na ₂ HPO ₄

Verdünnungspuffer für Primär- und Sekundärantikörper

100 mg	NaN ₃
500 mg	Rinderserumalbumin
100 ml	PBS

Verdünnungspuffer für Streptavidin-Konjugat

15 ml	PBS	
eine Spatelspitze		DNA und
Rinderserumalbumin		

AEC-Substrat-Lösung

4 mg	AEC in 1ml N,N-Dimethylformamid
14 ml	0,1 M Azetatpuffer pH 5,2
150 µl	30 %ige H ₂ O ₂ -Lösung

Die AEC-Substrat-Lösung wurde auf eine Temperatur von 19 - 20°C eingestellt und filtriert

III. Methoden

1. Patienten- und Kontrollgruppe

Von jedem Patient bzw. Proband wurde in regelmäßigen Abständen von 4 - 6 Wochen über einen Zeitraum von einem Jahr aus der Vorderarmvene ca. 20 ml Vollblut entnommen. Damit wurden folgende immunologische Untersuchungen durchgeführt:

- Phänotypisierung der Lymphozyten-Subpopulationen
- Funktionsanalyse der peripheren Blutlymphozyten (PBL)
- Bestimmung des Interleukin-2- und löslichen IL-2R α -Spiegel im Plasma

Insgesamt wurden 47 Patienten (45 Männer, 2 Frauen; Altersbereich 31 - 82 Jahre; mittleres Alter 56 Jahre) mit Plattenepithelkarzinom im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes für die Teilnahme an dieser klinische Studie ausgewählt (Tab.6a und Tab.6b). Die Patienten wurden die aufgeklärt. Die Probenentnahme erfolgte an den Tumorsprechstunden der HNO-Klinik der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt. Für die Ermittlung der intraindividuellen Schwankungen wurde ein Kontrollkollektiv mit 10 freiwilligen gesunden Probanden (5 Männer und 5 Frauen; Altersbereich 26 - 48 Jahre; mittleres Alter 37 Jahre) aufgestellt (Tab.3).

Tab.3.: Untersuchungszeitraum, Geschlecht und Alter der gesunden Probanden. Die Altersangabe ist auf den Untersuchungsbeginn bezogen.

Name	Alter [Jahre]	Untersuchungszeitraum
S. M	25	04.05.1993 - 10.08.1994
N. M	46	18.05.1993 - 12.10.1994
K. R	33	24.05.1993 - 27.10.1994
P-M.M	31	15.06.1993 - 11.10.1994
B. M	32	16.06.1993 - 10.08.1994
B. Ma	47	23.06.1993 - 04.08.1994
B. R	39	29.07.1993 - 24.11.1994
A. S	30	29.07.1993 - 10.03.1995
B-P. A	30	19.08.1993 - 11.10.1994
S. A	26	19.08.1993 - 13.04.1995

1.1. Auswahl der untersuchten Patienten nach klinischen Gesichtspunkten

Zur genauen Diagnostik der Tumorerkrankung gehörte neben Sonografie, Endoskopie oder Computertomografie in der Regel auch eine Untersuchung des verdächtigen Gewebes durch eine chirurgische Probeentnahme und anschließende feingeweblich-histologische Begutachtung. Die daraus resultierende Klassifizierung der Patienten unter Berücksichtigung des Primärtumors erfolgte anhand der UICC-Einteilung (Tab.4).

Tab.4.: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC (1987)

T	:	Größe und Ausdehnung des Primärtumors:
T0	:	Keine Evidenz für einen Primärtumor
T1, T2, T3, T4	:	Evidenz zunehmender Größe und/oder lokaler Ausdehnung des Primärtumors
Tx	:	Die Minimalerfordernisse zur Bestimmung des Ausbreitungsgrades des Tumors liegen nicht vor
N	:	Metastasierung in den regionalen Lymphknoten
N0	:	Kein Hinweis auf einen Befall regionärer Lymphknoten
N1, N2, N3	:	Evidenz zunehmenden Befalls regionärer Lymphknoten
N4	:	Hinweis auf einen Befall juxta-regionärer Lymphknoten
Nx	:	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung regionärer Lymphknoten liegen nicht vor
M	:	Anzahl der Fernmetastasen
M0	:	Keine Evidenz für Fernmetastasen
M1	:	Hinweis auf Fernmetastasen
Mx	:	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen sind nicht vorhanden
G	:	Malignitätsgrad (Differenzierungsverlust)
G1, G2, G3	:	Evidenz zunehmenden Differenzierungsverlustes
Gx	:	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Differenzierungsverlustes liegen nicht vor

Nach diesen Einteilungen richtete sich die Art der Therapie. Am Anfang der Behandlung stand bei vielen Tumorarten die Operation, in den meisten Fällen folgte eine Chemotherapie oder Strahlentherapie oder eine Kombination beider Therapiearten, teils zur höheren Sicherheit, teils um verbliebene Tumorreste zu entfernen (Tab.5).

Tab. 5.: Radikale Operation des Tumors, Strahlentherapie mit Gammastrahlen und Strahlendosis, Polychemotherapie mit unterschiedlich wirkenden Substanzen.

<p>Operative Entfernung des Tumors:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Laryngotomie – Pharyngotomie – Tracheotomie – Neck dissection <p>(radikale Halslymphknoten-Ausräumung)</p>	<p>Polychemotherapie:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Cisplatin – Folinsäure – 5-Fluoruracil (5-FU) – Fortecortin <p>Frequenz: 5 mal pro Woche (4 Zyklen)</p>												
<p>Strahlentherapie:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Strahlenqualität Gammastrahlen – Einzeldosis 1,9 bis 51,3 Gy – Kumulative Summendosis 71,3 Gy <p>Fraktionierung: 5 mal pro Woche</p>	<p>Adjuvante Polychemotherapie:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">– Cisplatin</td> <td style="width: 33%;">Cisplatin</td> <td style="width: 33%;">Cisplatin</td> </tr> <tr> <td>– 5-Fu</td> <td>5-Fu</td> <td>5-Fu</td> </tr> <tr> <td>– Folinsäure</td> <td>RescuvoLin</td> <td>Folinsäure</td> </tr> <tr> <td>– Dexametason</td> <td></td> <td>Fortecortin</td> </tr> </table> <p>3 Zyklen + additive Strahlentherapie</p>	– Cisplatin	Cisplatin	Cisplatin	– 5-Fu	5-Fu	5-Fu	– Folinsäure	RescuvoLin	Folinsäure	– Dexametason		Fortecortin
– Cisplatin	Cisplatin	Cisplatin											
– 5-Fu	5-Fu	5-Fu											
– Folinsäure	RescuvoLin	Folinsäure											
– Dexametason		Fortecortin											

III. Methoden

Tab. 6a: Angaben zu den Patienten: Altersangabe bezogen auf den Untersuchungsbeginn, Tumorlokalisation, Staging/Grading, Art der Tumorbehandlung (Operation, Chemotherapie, Strahlentherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie), Untersuchungszeitraum der einzelnen Patienten sowie Sterblichkeit während der Studie.

Name	Alter [Jahre]	Tumorlokalisation	Staging/Grading	Therapie	Untersuchungszeitraum
B.K.	54	Larynx / Schilddrüse	T4N2M1G1	Operation, Strahlentherapie	09.06.1993 - 15.02.1995
B.H.	61	Sinus piriformis/ Pharynx	T4N1M0G2	Operation, Chemotherapie	09.06.1993 - 05.12.1994
K.H.	57	unbek. Primarius Lymphknoten	T0N2MXG1	Operation, Strahlentherapie	29.07.1993 - 14.09.1994
Schn.K.H.	48	Zungenkörper Zungengrund/Tonsille weicher Gaumen/Hals- lymphknotenmetastase	T4N1M0G2 T0N1M0G1	Operation, Chemotherapie	29.07.1993 - 02.11.1994
Schö.H.	49	Zungengrund	T3N3MXG2	Operation, Strahlentherapie	29.07.1993 - 14.09.1994
H.K.	62	Nasen-Rachenraum	T1N3M0G2	Operation, Strahlentherapie	25.11.1993 - 15.02.1995
T.D.	51	Stimmband	T2N0MXG2	Operation, ohne Nachbehandlung	15.04.1994 - 12.07.1995
M.L.	50	Mundboden/Zungenrand	T3N0MXG2	Operation, Chemotherapie	23.06.1994 - 20.09.1995
T.S.	41	Gaumenbogen	T1N0MXG2	Operation, Chemotherapie	22.06.1994 - 25.10.1995
F.P.	58	Hypopharynx	T4N3M0G3	kombinierte Therapie	23.06.1994 - 01.11.1995
S.B.	60	Primariuslokal. unklar	T0N3M0G3	Operation, Chemotherapie	29.06.1993 - 10.01.1996
K.E.	67	Zungengrund	T1N1MXG3	Operation, Chemotherapie	20.07.1993 - 15.11.1995
B.L.	48	Pharynxhinterwand	T2N1M0	Operation, Chemotherapie	28.10.1993 - 07.02.1996
P.G.	61	Epiglottis/Sinus piriformis Halslymphknoten	T3N2MXG3	Operation, kombinierte Therapie	29.10.1993 - 24.08.1994 † (Juli 1995)
M.Ha.	45	Tonsille	T4N1M0G2	Strahlentherapie	25.11.1993 - 19.07.1995
K.K.	65	Stimmband	T1N0M0G2	Operation, ohne Nachbehandlung	16.12.1993 - 08.03.1995
F.U.	37	Primariuslokal. unklar	TXN2MXG3	Operation, kombinierte Therapie	23.02.1994 - 07.02.1996 † (20.04.1996)
H.A.	63	Epiglottis	T2N1MXG2	Operation, ohne Nachbehandlung	27.05.1994 - 20.12.1995
Schi.H.	54	Gaumenbogen/Tonsille Zungengrund	T3N0MXG1	Operation, Chemotherapie	22.06.1994 - 10.01.1996
G.J.	48	Hypopharynx	T2N2MXG2	Operation, kombinierte Therapie	22.07.1994 - 31.01.1996 † (10.07.1996)
H.H.	55	Epiglottis	T1N0M0G1	Operation, ohne Nachbehandlung	22.07.1994 - 10.01.1996

III. Methoden

Tab. 6b: Angaben zu den Patienten: Altersangabe bezogen auf den Untersuchungsbeginn, Tumorlokalisation, Staging/Grading, Art der Tumorbehandlung (Operation, Chemotherapie, Strahlentherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie), Untersuchungszeitraum der einzelnen Patienten sowie Sterblichkeit während der Studie.

Name	Alter [Jahre]	Tumorlokalisation	Staging/Grading	Therapie	Untersuchungszeitraum
K.M.	38	Larynx	T3N1M0G2	Operation, Strahlentherapie	22.07.1994 - 10.01.1996
R.H.	50	Stimmband	T1N0M0G2	Operation, ohne Nachbehandlung	23.02.1994 - 15.02.1995
Sch.Ri	57	Supraglottis	T3N2M0G2	Operation, Strahlentherapie	25.08.1993 - 18.11.1993 † (22.11.1993)
Sch.Ru	56	Supraglottis/Zungengrund	T4N2M0G2	Operation, kombinierte Therapie	29.06.1993 - 16.02.1994
W.A.	51	Epiglottis/Halslymphknotenmetastase	T2N2M0G2	Operation, kombinierte Therapie	15.04.1994 - 25.05.1994 † (25.09.1994)
Sch.P.	52	Zungengrund Sinus piriformis	T4N3MX	Operation, Strahlentherapie	27.05.1994 - 02.11.1994 † (18.01.1995)
Schm.K	68	Stimmband	T3N0M0G2	Operation, Chemotherapie	30.06.1993 - 03.11.1993 † (10.02.1994)
S.D.	49	Stimmband	T2N0M0G1	Operation, ohne Nachbehandlung	14.07.1994 - 01.02.1995
St.F.	59	dorsale Pharynxwand	T3N0M0G2	Operation, Strahlentherapie	17.08.1994 - 19.04.1995
G. H.	49	Hypopharynx	T4N3M0G2	Operation, kombinierte Therapie	23.02.1994 - 01.06.1994 † (29.07.1994)
Ru. H.	49	Tonsille	T1N1M0G2	Operation, kombinierte Therapie	29.04.1994 - 20.09.1995
W. M.	58	hintere Pharynxwand Supraglottis	T4N0M0G2	Operation, kombinierte Therapie	27.05.1994 - 22.06.1994
R.L.	74	vordere Kommissur	T1N0M0G3	ohne Therapie	28.10.1993 - 28.10.1993
Hä. H.	68	Zungengrund	T1N2MXG2	ohne Therapie	27.10.1993 - 27.10.1993
B. P.	68	Stimmband	T3N0M0	ohne Therapie	28.10.1993 - 28.10.1993
M. H.	82	Supraglottis/Halslymphknotenmetastase	T4N0M0G2	ohne Therapie	18.05.1994 - 18.05.1994
Schm. Ro	57	Panlarynxgeal	T4N2M0G2	ohne Therapie	03.03.1994 - 03.03.1994 † (27.10.1994)
H.G.	67	weicher Gaumen	T2N2M0G2	ohne Therapie	14.07.1994 - 14.07.1994
Ro.H.	57	Tonsille/Halslymphknoten	T4N2MXG2	ohne Therapie	29.04.1994 - 29.04.1994 † (16.10.1994)
R.R.	60	Hypopharynx/Lungen-Metastase	T4N1M1G3	ohne Therapie	27.05.1994 - 27.05.1994 † (17.06.1994)
R.K-D.	54	Hypopharynx	T4N3MXG2	ohne Therapie	23.06.1994 - 23.06.1994 † (29.11.1994)
T.G.	68	unbekannt	unbekannt	ohne Therapie	25.11.1993 - 25.11.1993
K.A.	31	unbekannt	unbekannt	ohne Therapie	23.02.1994 - 23.02.1994
H.S.	57	unbekannt	unbekannt	ohne Therapie	22.06.1994 - 22.06.1994
H.J.	62	unbekannt	unbekannt	ohne Therapie	23.11.1994 - 07.06.1995

2. Zellkultivierung

Alle Maßnahmen für die Kultivierung der Zelllinien (*Raji* und *K562*) und Lymphozyten wie z.B. Vorbereitung des Mediums oder Mediumwechsel wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Ein Mediumwechsel wird notwendig, wenn der Farbindikator Phenolrot von rot nach gelb umschlägt und damit einen absinkenden pH-Wert im Medium anzeigt. Die Zelllinien und Lymphozyten wurden in einer feuchten mit 5 % CO₂ angereicherten Atmosphäre bei 37 °C kultiviert.

2.1. Kultivierung der Zelllinien *Raji* und *K562*

Die Subkultivierung der Zelllinien *Raji* und *K562* erfolgte dreimal pro Woche. Hierbei wurden die in Suspension wachsenden Zellen mittels Zentrifugation (10 min, 350 g) sedimentiert und in frischem DMEM-Medium (pH 7,2) resuspendiert und weiter kultiviert. Das DMEM-Medium wurde komplementiert mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES, 18 mM NaHCO₃. Das im Kulturmedium enthaltene FKS wurde zur Inaktivierung von Komplementkomponenten vor Gebrauch 30 min auf 56 °C erhitzt.

2.2. Kultivierung der Lymphozyten

Die aus peripherem Blut isolierten Lymphozyten wurden 5 - 7 Tage im komplementierten DMEM-Medium (siehe III.2.1) kultiviert. Um die IL-2 Rezeptoren der Zellen zu aktivieren und somit eine verstärkte Proliferation und Zellteilung der Lymphozyten-Zellkultur zu erreichen, wurden 200 U/ml nIL-2 zu dem Kulturmedium gegeben.

3. Routinemethoden

3.1. Bestimmung der Zellzahl mittels Thoma-Zählkammer

Die Thomakammer besteht aus 9 großen Quadraten. Jedes große Quadrat hat eine Fläche von 1 mm², dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl. Man zähle mindestens 4 große Quadrate aus und errechne den Mittelwert. Dabei muß darauf geachtet werden, daß Zellen, die auf den Linien liegen, nicht zweimal gezählt werden. Dies kann dadurch vermieden werden, daß nur solche Zellen mitgezählt werden, die beispielweise oben und links vom Betrachter auf den Linien liegen.

Zunächst wurde die Oberfläche der Zählkammer mit 70 %igen Ethanol gut gereinigt. Das ebenfalls mit Alkohol gereinigte Deckglas wurde leicht angefeuchtet und auf die Zählkammer gelegt. Das Erscheinen von sog. Newton'schen Ringen zeigte an, daß das Deckglas richtig angebracht wurde. Danach wurde 20 µl Zellsuspension in die Zählkammer gefüllt. Die Bestimmung der Zellzahl wurde bei 400facher Vergrößerung folgendermaßen vorgenommen:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{gezählte Zellen (Mittelwert)} \times 10^4 \times (\text{Verdünnungsfaktor})$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Volumen der Zellsuspension} \times \text{Zellzahl / ml}$$

3.2. Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung

Der Test basiert auf der Annahme, daß nur bei defekten oder toten Zellen bestimmte Farbstoffe in das Zellinnere gelangen können, während intakte Zellen nicht angefärbt werden. Der gebräuchlichste Vitalitätstest ist der sog. Trypanblaufärbetest.

100 µl der Zellsuspension wurde mit gleichem Volumen einer 0,5 % (w/v) Trypanblaulösung vorsichtig vermischt und ca. 2 - 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Testansatz nochmal gut durchmischt und in der Thoma-Zählkammer sofort ausgezählt, da Trypanblau zytotoxisch für die Zellen ist. Der Prozentsatz intakter Zellen errechnet sich mit folgender Formel:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

3.3. Kryokonservierung von Zellen

Nach 10 minutiger Zentrifugation bei 350 g wurde das Zellpellet in Einfriermedium (FKS mit 10 % Dimethylsulfoxid, DMSO) aufgenommen, portionsweise auf Kryoröhrchen verteilt, bei 80 °C über Nacht tiefgefroren und schließlich bei -196 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Gefrierschutzsubstanz DMSO verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas.

4. Immunologische Methoden

4.1. Isolierung mononukleären Zellen aus peripherem Blut mittels Dichtegradienten- Zentrifugation (Ficoll-Hypaque)

Lymphozyten können von anderen Blut-Bestandteilen aufgrund ihrer spezifischen Dichte isoliert werden. Die Dichte des Lymphozyten-Trennmediums ($d = 1,077$) ist höher als die der Lymphozyten und geringer als die der Erythrozyten und Granulozyten. Dadurch reichern sich die Lymphozyten/ Monozyten an der Phasengrenze Blut/ Ficoll an, die dichteren Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren durch das Gradientenmedium auf den Boden des Zentrifugationsgefäßes.

Die mononukleären Zellen, Monozyten und Lymphozyten wurden mittels Gradientenzentrifugation nach der Methode Böyum (1968) innerhalb 24 h nach Probenentnahme separiert. Dazu wurde 20 ml EDTA-Blut in ein 50 ml steriles, konisches Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 min/ 350 g/ RT abzentrifugiert.

Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und für weitere Untersuchungen bei -20 °C aufbewahrt (siehe III.4.4). Das verbliebene Blutsediment wurde mit PBS 1:1 verdünnt und auf das gleiche Volumen Trennmedium (Ficoll-Hypaque) ohne Vermischung überschichtet.

Die Dichtezentrifugation erfolgte für 30 min bei 350 g bei ungebremsten Auslauf in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge. Die mononukleären Zellen, die sich in der Bande unmittelbar oberhalb des Trennmediums befanden, wurden langsam und vorsichtig entnommen, zweimal mit PBS 10 min/ 350 g/ RT gewaschen und schließlich in Kulturmedium in einer Konzentration von $2 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml aufgenommen.

4.2. Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen mittels Durchflußzytometrie

Mit der Durchflußzytometrie hat sich ein Verfahren etabliert, das eine immunologische Phänotypisierung von Zellsuspensionen erlaubt. Es wird mittlerweile insbesondere in der klinischen Diagnostik, vor allem zur Immunphänotypisierung von lymphatischen Zellen sowie zur DNA-Analyse von Tumoren eingesetzt [Schmitz & Rothe 1993].

Zur Trennung im fluoreszenzaktivierten Zellsorter (FACS) müssen die gewünschten Zellen mit einem spezifischen Antikörper markiert werden, an den ein fluoreszierender Farbstoff (Fluorescein-isothiocyanat = FITC, Phycoerythrin = PE) gekoppelt ist. Die markierten suspendierten Zellen werden durch Druckluft vom Probegefäß in eine vibrierende Fließkammer transportiert. Dort werden sie durch eine Düse gepreßt, so daß ein Strom einzelner Zellen entsteht. Ein in dem Gerät integrierter Argonlaser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm generiert, trifft auf die vorbeifließenden Zellen, wobei Photodetektoren die erzeugte Lichtstreuung und die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe messen.

Neben der Vorwärts-(FSC) und Seitwärtslichtstreuung (SSC) als Maß für Größe und Granularität können simultan drei verschiedene Fluoreszenzspektren, FL1 (530 nm: grün), FL2 (585 nm: orange) und FL3 (> 650 nm: rot) gemessen werden, was eine simultane Untersuchung von drei Oberflächenantigenen erlaubt. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale ermöglicht eine genaue Typisierung der Zelloberfläche und damit eine quantitative und qualitative Untersuchung der jeweiligen Subpopulation.

Die Informationen werden im Computer registriert, aufgearbeitet und auf dem Bildschirm zu unterschiedlichen Darstellungen gebracht.

4.2.1. Durchführung der Phänotypisierung

Pro Ansatz wurden Antikörper gegen zwei verschiedene Antigene eingesetzt. Jeweils 5 µl mit unterschiedlichen Fluorochromen (FITC oder PE) markierte monoklonale Antikörper wurden in verschiedenen Kombinationen in ein Zentrifugationsröhrchen einpipettiert:

CD4_{FITC}/CD8_{PE}, CD3_{FITC}/CD19_{PE}, CD16_{FITC}/CD56_{PE},
CD2_{FITC}/CD25_{PE}, CD45_{FITC}/HLA-DR_{PE}

Desweiteren wurde für die Detektierung der Antigene CD45RO (Antikörper-„PE“ gekoppelt) und CD45RA (Antikörper „FITC“ gekoppelt) eine Einfachmarkierung durchgeführt.

Als negativ-Kontrolle diente eine Vollblutprobe ohne Primärantikörper. Zu den vorgelegten µl Vollblut hinzugegeben und gründlich mit dem Vortex-Gerät gemischt. Die Reaktion der fluoreszenzmarkierten Antikörper mit den Antigenen der Zelle fand für 30 min im Eisbad unter Lichtabschirmung statt. Erythrozyten wurden durch 10 min Inkubation bei 4 °C mit einer Lysing-Solution zerstört.

Um überflüssige, nicht gebundene Antikörper sowie lysierte Erythrozyten zu entfernen, wurde der Testansatz 10 min bei 4 °C/ 350 g zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstands zweimal mit je 2 ml PBS/ 0,1% Natriumazid (v/g) gewaschen. Nach anschließender Fixierung der Zellen mit 2 ml PBS/ 1,85 % Formaldehyd/ 0,1 % Natriumazid (v/v/g) für 30 min wurden die Proben erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Sediment in 350 µl PBS/ 0,1% Natriumazid aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und mit dem Durchflußzytometer (FACScan) gemessen.

4.2.2. Auswertung

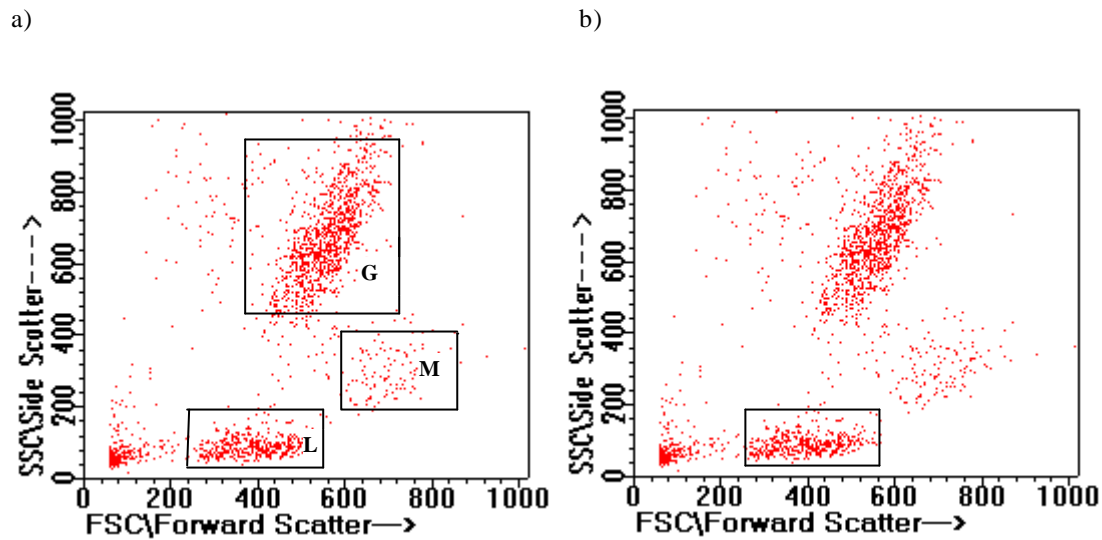


Abb.3: a) Die einzelnen Zellpopulationen des peripheren Blutes werden in einem FSC / SSC-Koordinatensystem lokalisiert, welche die Zellen nach Größe (x-Achse) und Granularität (y-Achse) trennt G: Granulozyten, M: Monozyten, L: Lymphozyten b) Die zu untersuchende Zellpopulation (Lymphozyten) wird mit einem Fenster (Gate) eingegrenzt. Alle weiteren Analysen der Daten beziehen sich ausschließlich auf die Zellen innerhalb der Grenzen des Gates.

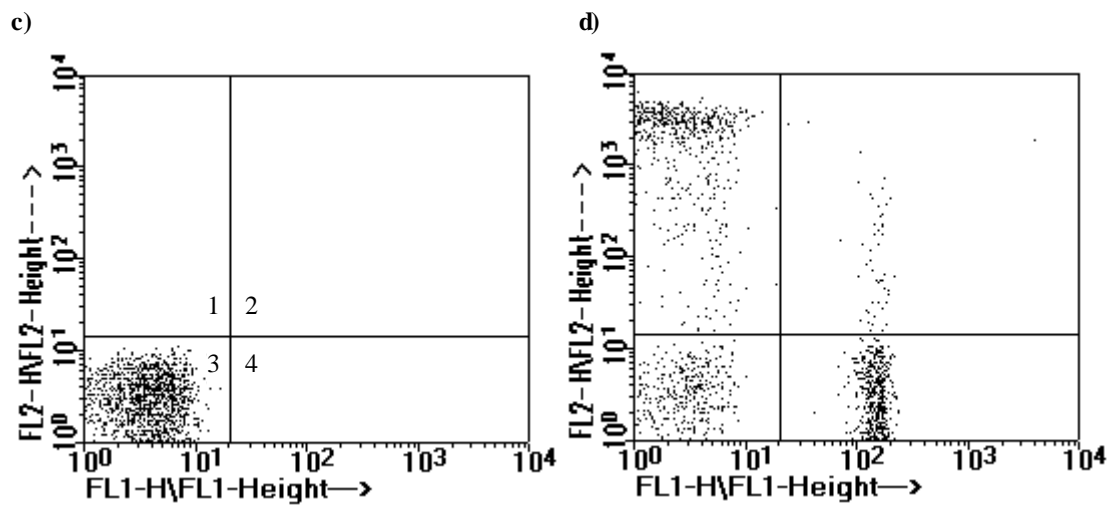


Abb.3: Messung der Lymphozyten-Oberflächenmarker eines gesunden Probanden. Die Zellen werden anhand ihrer Fluoreszenzen, FL1 (FITC) gegen FL2 (PE) logarithmisch dargestellt. Durch Setzen eines Fadenkreuzes wird das Diagramm in Quadranten unterteilt. Quadrant 1 enthält die PE-positiven, Quadrant 2 PE- und FITC-doppelt-positiven, Quadrant 3 die negativen, Quadrant 4 FITC-positiven Zellen. c) unmarkierte Zellen als Negativ-Kontrolle d) Simultane Messung FL1: CD4 und FL2: CD8

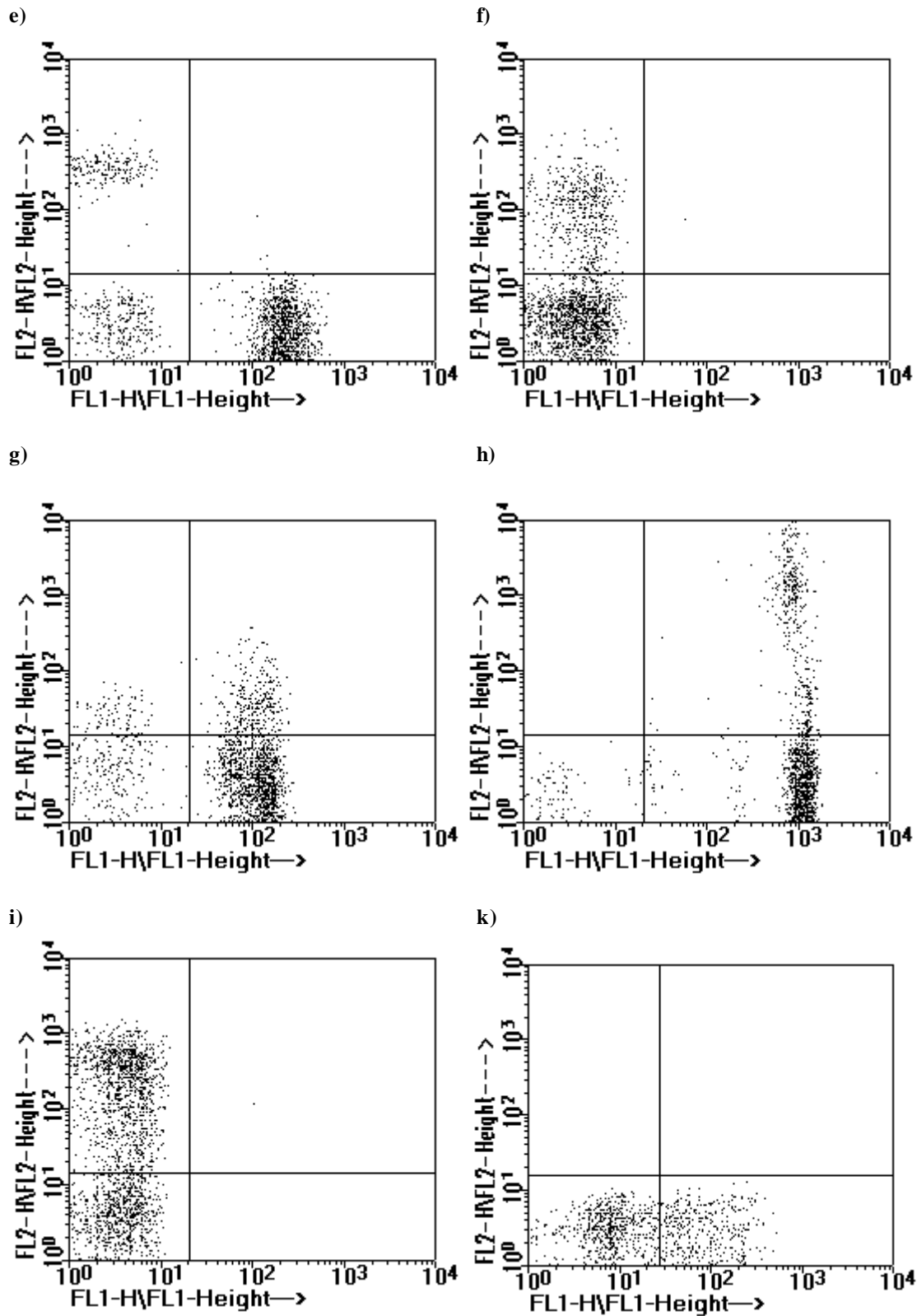


Abb. 3: Simultane Messung: e) FL1: CD3 und FL2: CD19 f) FL1:CD16 und FL2: CD56 g) FL1: CD2 und FL2: CD25 h) FL1: CD45 und HLA-DR. Nichtsimultane Messung: i) FL2: CD45RO k) FL1: CD45RA.

4.3. Messung der Zytotoxizität mit dem Europiumfreisetzungstest

Der Europiumfreisetzungstest wurde zur Bestimmung der zellvermittelten zytotoxischen Aktivität peripherer Blutlymphozyten herangezogen.

Der auf Volgmann und Mitarbeiter (1989) zurückgehende Fluoreszenztest beruht auf der Markierung der Zielzellen mit einem Europium-Chelat-Komplex (Eudiethyltriaminpentaacetat), welcher in die Zellen eingebracht wird und an Zytoplasmaproteine bindet. Die so markierten Zielzellen werden zusammen mit Effektorzellen inkubiert. Nach der Zytolyse, verursacht durch die Effektorzellen, wird der Eu^{3+} -Komplex durch die lysierten Zielzellen in den Zellüberstand freigesetzt.

Die Zugabe von β -Naphthoyltrifluoroacetat, das in der sogenannte „Enhancement“-Lösung enthalten ist, induziert die Bindung eines fluoreszierenden Chelates, welches mit einem Fluorometer gemessen werden kann.

Die Ermittlung der lymphokin-aktivierten Killerzellaktivität erfolgte mit einer NK-Zell resistente Myelom-Zelllinie (*Raji*), während die NK-Zellaktivität durch den Einsatz der NK-Zell-sensiblen Erythroleukämie-Zelllinie (*K562*) bestimmt wurde. Hierbei dienten die beiden Tumorzelllinien als Zielzellen und die eingesetzten Lymphozyten als Effektorzellen.

4.3.1. Vorbereitung der Zielzelllinien

Die Vitalität der ein Tag vor dem Europium-Freisetzungstest subkultivierten Zelllinien wurde wie zuvor beschrieben bestimmt (siehe III.3.2). Danach wurden 1×10^7 / ml *Raji*-Zellen und

5×10^6 /ml *K562*-Zellen entnommen und zweimal gründlich mit physiologischer NaCl gewaschen. Die Zentrifugationsbedingungen waren 10 min bei 350 g. Nach dem letzten Waschen wurde zu dem Zellsediment Markierungspuffer, sowie 33 μl Dextranlösung (100 mg/ ml Dextransulfat in H_2O dest) zugefügt und vorsichtig resuspendiert. Um eine optimale Europium-Markierung zu erhalten, wurde der Ansatz 30 min im Eisbad inkubiert und in 10 min Intervallen leicht geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 M CaCl_2 und 5 minütiger Inkubation gestoppt. Die mit Europium beladenen Zellen wurden viermal in 10 ml Waschmedium aufgenommen und zentrifugiert, im Anschluß mit frischem Medium auf eine Konzentration von 5×10^4 Zellen / ml eingestellt.

4.3.2. Vorbereitung der Effektorzellen

4×10^6 -Effektorzellen/ml wurden entnommen, bei 350 g / 30 °C / 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml Inkubationsmedium resuspendiert.

Vor der Zugabe der Zielzellen wurde die Mikrotiterplatte wie folgt vorbereitet:

Um die spontane Freisetzung von Europium feststellen zu können, wurden in drei Vertiefungen je 100 μ l DMEM-Medium mit 10 % FKS angesetzt, drei weitere Vertiefungen enthielten 100 μ l DMEM-Medium mit 5 % (v/v) Triton X-100, um die maximale Freisetzung von Europium zu erreichen. Die Effektorzellen wurden in einem Volumen von je 100 μ l in Dreifachansätzen in seriellen Verdünnungen: $2,5 \times 10^4$ -, 5×10^4 -, 1×10^5 - 2×10^5 - Zellen in die Vertiefungen gegeben. 5×10^3 -Zielzellen wurden in 100 μ l Medium zu den Effektorzellen zugegeben, so daß sich ein Verhältnis von Effektor zu Zielzellen 5:1, 10:1, 20:1 und 40:1 ergab.

Die Effektor-Zielzellen wurden 2,5 h bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert, dann folgte die Zentrifugation der Platten für 10 min bei 400 g. 20 μ l des Überstandes wurde aus jeder Bohrung abgenommen und in eine Spezialmikrotiterplatte übergeführt. Hierzu wurden jeweils 200 μ l Enhancementlösung zugefügt. Die Proben wurden fluorometrisch gemessen. Die spezifische Zielzell-Lyse wurde nach der folgenden Formel berechnet (E = gemessene Extinktion):

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{E(\text{Probe}) - E(\text{Spontan})}{E(\text{Maximal}) - E(\text{Spontan})} \times 100$$

4.4. Quantitative Bestimmung des Interleukin-2 Proteins und löslichen Interleukin-2-Rezeptors im Plasma mittels Sandwich-Elisa

Bei diesem Testsystem ist die Mikrotiterplatte mit monoklonalen Antikörpern (Fangantikörper) gegen ein Epitop des Testantigens beschichtet. Die zu bestimmende Probe und ein enzymmarkierter Antikörper (Detektorantikörper), der gegen ein anderes Epitop des Testantigens gerichtet ist, werden hinzugefügt. Das Testantigen bindet an den Antikörper auf der Platte, gebundenes Antigen wird anschließend durch den Detektorantikörper nachgewiesen.

Die Entwicklung eines farbigen Produktes wird durch die Oxidation des chromogenen Substrats durch eine enzymkatalysierte Reaktion erreicht. Die Menge des Testantigens wird über eine photometrische Bestimmung des umgesetzten Enzym-Substrat-Komplexes gemessen.

4.4.1. Vorbereitung des Elisa-Testsystems

Zur Bestimmung des Interleukin-2 Proteins und des löslichen IL-2 Rezeptors- α wurden zwei verschiedenen Testsysteme verwandt. Die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefrorenen Plasmaproben wurden einen Tag vor dem Elisa-Test aufgetaut. Benötigte Reagenzien wurden 30 min vor Gebrauch auf Raumtemperatur angewärmt.

Die Antikörper-Antigen-Reaktionen fanden in Mikrotiterplatten statt. Die unbekannt Konzentration an IL-2-Protein bzw. löslichem IL-2R α in den Plasmaproben wurde anhand einer Standardkurve ermittelt. Der IL-2 Standard wurde mit 5 ml Kalibrator-Diluent für 15 min aufgelöst und eine Verdünnungsreihe der Stammlösung mit den Konzentrationen: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,3 pg/ml, 0 pg/ml hergestellt.

Fünf separate IL-2R α Standards in den Konzentrationen 3100 U/ml, 1680 U/ml, 740 U/ml, 360 U/ml, 100 U/ml und 0 U/ml waren im Lieferumfang enthalten.

Tab.7: Vorbereitung der Mikrotiterplatten zu Bestimmung der IL-2 Protein und des löslichen IL-2R α (sIL-2R α)

	Interleukin-2 Protein	löslicher IL-2R α
Verdünnungspuffer	Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte • 100 μ l / Vertiefung	unbeschichtete Mikrotiterplatte • 200 μ l / Vertiefung
Standardproben und zu bestimmende Proben (Kontroll- und Patientenproben) im Doppelansatz	• 100 μ l / Vertiefung, mischen, mit einem Deckel schützen, im Dunkeln für 2h / RT inkubieren	• 50 μ l / Vertiefung, mischen auf einem Plattenschüttler für 3 min / RT / 210 Upm
Waschpuffer	• 3 x waschen	
Peroxidase-Konjugat (IL-2-Konjugat bzw. sIL-2R α -Konjugat)	• 200 μ l / Vertiefung der enzymkonjugierten polyklonalen Antikörper	Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte • 100 μ l / Vertiefung enzymkonjugierte monoklonale Antikörper (vorher Verdünnung in einem Verhältnis 1:10) • 100 μ l / Vertiefung verdünnten Proben, 2 h / RT inkubieren
Waschpuffer	• 4 x waschen	• 5 x waschen
Substrat-Lösung	• 200 μ l / Vertiefung für 20 Min / RT	• 100 μ l / Vertiefungen, mischen 10 min im Dunkeln inkubieren
Stopp-Lösung (2M H ₂ SO ₄)	• 50 μ l / Vertiefung	• 100 μ l / Vertiefung in einem Zeitintervall von 1-2 min
Messung der Farbintensität im Photometer	• bei zwei Wellenlängen, innerhalb 30 min 450 nm und 570 nm	• bei zwei Wellenlängen innerhalb von 1 h bei 450 nm und 620 nm

4.4.2. Erstellung der Standardkurve

Zur Erstellung der Standardkurve wurden für eine von der Firma vorgegebene Anzahl standardisierter Konzentrationen (B) die Extinktionen (A) gemessen. Nachfolgend wurde die Konzentration des Analyten (IL-2 Protein bzw. sIL-2R α) in der Probe mittels linearer Regression anhand der Standardkurve errechnet.

4.5. Nachweis von Lymphozyteninfiltration im Tumor mittels der Biotin-Streptavidin-Peroxidase Methode

Zur Lokalisierung von Lymphozyten im Primärtumor und in metastasierten Lymphknoten, die bestimmte Antigene exprimieren, wurde die Biotin-Streptavidin-Peroxidase Methode verwendet.

Hiefür wird die starke Affinität von Streptavidin (SA), einem Protein aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* (Mr 60 kD), zu dem Vitamin Biotin (Mr 244 D) ausgenützt. Die Affinität ist millionenfach stärker, als die Antigen-Antikörper-Interaktion, so daß die Biotin-Streptavidin-Bindung praktisch irreversibel ist. SA besitzt je vier Bindungstellen für Biotin. Aufgrund dieser multivalenten Bindungseigenschaft und der Tatsache, daß Proteine (z.B. Antikörper oder Enzyme) mit mehreren der relativ kleinen Biotinmoleküle gekoppelt werden können, beruht der Verstärkereffekt des Streptavidin-Biotin-Systems.

Dieses Nachweisverfahren, das identifizierte Antigene sichtbar macht, arbeitet mit einem primären antigenspezifischen monoklonalen Antikörper. Im zweiten Schritt wird ein erster Sekundärantikörper gegeben, der gegen die Spezies gerichtet, aus der der Primärantikörper stammt. Der zweite, sekundäre biotinylierte Antikörper richtet sich gegen die Spezies, aus welcher der erste Sekundärantikörper stammt. Mit Peroxidase markiertes Streptavidin reagiert mit dem biotinylierten zweiten Sekundärantikörper. Als Substrat kann 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) verwendet werden. Bei der Reaktion entsteht ein braunes Präzipitat, das sich unter dem Mikroskop leicht lokalisieren läßt.

4.5.1. Entparaffinierung

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden vier verschiedene paraffingängige monoklonale Antikörper gegen die Antigene CD45, CD3, CD8 und HLA-DR verwendet.

Damit die Antikörper in die Präparate eindringen konnten, wurde das Paraffin aus den Gewebeschnitten mit Xylol entfernt, welches seinerseits durch eine Serie von Waschschritten in Alkohollösungen mit abnehmender Konzentration ausgewaschen wurde. Dieser Vorgang wird als Rehydrierung bezeichnet.

Entparaffinieren:

- 2 x 5 min / 2x 10 min Xylol
- 1 x kurz / 1x 10 min 100 % Ethanol
- 1 x kurz / 1x 10 min 95 % Ethanol

Nach der Rehydrierung wurde der Objektträger zunächst für 10 min in 3 % H_2O_2 , gelöst in Methanol zur Hemmung von möglicher endogener Peroxidaseaktivität eingebracht und danach im Pufferbad wie folgt gewaschen:

- 4 min 0,1 % Triton-PBS
- 4 min PBS

gut spülen in Leitungswasser

4.5.2. Vorbehandlung der Gewebeschnitte bei Einsatz von Anti-CD3- und Anti-CD8-Antikörper

Damit der Antikörper an sein spezifisches Antigen CD3 in formalinfixiertem Gewebe besser binden kann, wurde das Gewebe mit der Protease Proteinase K (0,01 % in PBS) für 10 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer angedaut.

Eine Inkubation mit einem proteinabbauenden Enzym macht das Gewebe für Antikörper und Nachweis-Reagenzien zugänglicher. Das Enzym bewirkt eine Spaltung der Formalin verursachten Quervernetzungen der Proteine und setzt damit mehr antigene Bindungsstellen frei.

Für einen erfolgreichen Einsatz des Anti-CD8 Antikörpers wurde 0,01 M Zitratpuffer (pH 6) verwendet, um versteckte antigene Stellen zu enthüllen, ohne dabei die Morphologie des Gewebes zu beschädigen. Dabei wurden die Schnitte in eine mit 1:10 verdünnten Zitratpuffer gefüllte Küvette überführt und in der Mikrowelle zweimal jeweils für 5 min bei 800 W erhitzt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 20 min bei RT abgekühlt.

Die vorbehandelten Präparate wurden nachfolgend gründlich in Leitungswasser gespült, 3 min mit 2 % Glycin-PBS behandeln und anschließend 3 min mit PBS gewaschen.

Bei der Verwendung von Anti-CD45- und Anti-HLA-DR Antikörpern, bei denen eine Behandlung der Schnitte mit Proteinase K bzw. mit Zitratpuffer nicht notwendig war, entfiel dieser Waschvorgang.

4.5.3. Antikörperzugabe

Die verschiedenen Inkubationsschritte wurden in einer 37 °C warmen, feuchten Kammer durchgeführt. Die Zugabe der aktiven Reagenzien erfolgte in der Reihenfolge Primärantikörper, 1. Sekundärantikörper, 2. Sekundärantikörper und zuletzt Peroxidase-Streptavidin-Konjugat. Die Inkubationsschritten wurden durch gründliche Waschschrte mit Puffer unterbrochen, die überschüssiges, nicht gebundenes Reagenz entfernen sollten (siehe Tab.8).

Tab. 8: Zugabe der Antikörper und des Peroxidase-Streptavidin-Konjugats; jeweils 100 µl in verschiedenen Verdünnungen (siehe Tab. Ergebnisse) unter Berücksichtigung der Inkubationszeit. Alle Waschvorgänge nach Einsatz der aktiven Reagenzien wurden im Küvettenbad unter RT durchgeführt.

A	B	C	D
Primärantikörper	1. Sekundärantikörper	2. Sekundärantikörper	Peroxidase-Streptavidin-Konjugat
▪ 60 min	▪ 30 min	▪ 30 min	▪ 30 min
Waschvorgang:	Waschvorgang:	Waschvorgang:	Waschvorgang:
spülen in Leitungswasser	spüle spülen in Leitungswasser	spülen in Leitungswasser	spülen in Leitungswasser
▪ 4 min Azetatpuffer pH = 4	▪ 3 min PBS	▪ 4 min Azetatpuffer pH = 4	▪ 3 min PBS
▪ 3 min Triton-PBS		▪ 3 min 1% Triton-PBS	▪ 4 min Azetatpuffer pH = 4
▪ 3 min PBS		▪ 3 min PBS	

4.5.4. Substratzugabe

Die Umsetzung des Substrats AEC durch Peroxidase unter Mitwirkung von H₂O₂ (siehe II. 6.4) vollzog sich in einem Zeitintervall von 6 - 12 min, abhängig von den eingesetzten Antikörpern. Als Resultat bildete sich ein farbiger, unlöslicher Niederschlag an der Stelle, an der das Antigen lokalisiert wurde.

Da bei Verwendung von AEC das entstehende Reaktionsprodukt in Alkohol und organischen Lösungsmitteln löslich ist, wurden die Objektträger mit wässrigem Hämalaun, welches die Kerne und basophiles Zytoplasma blau färbt, für 1 min gegengefärbt und mit einem wässrigen Eindeckmedium (Aquatex) eingedeckt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Präparate vorsichtig mit Leitungswasser abgepült. Beim Eindecken wurde geachtet, daß unter dem Deckglas keine Luftblasen verbleiben.

4.5.5. Kontrolle

Als Positiv-Kontrolle dienten identisch vorbehandelte Paraffinschnitte der Tonsille, die Immunzellen beherbergen, die die fraglichen Antigene exprimieren.

Als Negativ-Kontrolle dienten Leerpräparate aus Primärtumor bzw. Lymphknotenmetastasen- und Tonsillengewebe, die anstelle des Primärantikörpers mit Puffer behandelt wurden.

4.5.6. Verwendete Schnitte

Tab. 9: Untersuchte Schnitte (Lymphknotenmetastasen und Primärtumor) sowie Kontrollschnitte (Tonsillen), die für das immunhistochemische Verfahren benutzt wurden.

Lymphknotenmetastasen	Primärtumor	Tonsille
N636a	N257 Tu, Pharynxwand li	N1025/95
N614aI	N259 PE, Sinus periformis	N1026/95
N606a	N260 PE, Hypopharynx	N1118/95
N792c	N797 Tu Sinus periformes	N1119/95
N504b	N799 Tu Oropharynxseitenwand	N1208/95
N770c		N1209/95
N835a		N1238/95
N795		N1239/95
		N276/95

4.5.7. Auswertung

Zunächst wurde der Tumor im Präparat unter 40-facher Vergrößerung lokalisiert und die positiven Zellen innerhalb und unmittelbar außerhalb des Tumors zu Berechnung miteinbezogen. Insgesamt wurden 10 Gesichtsfelder mit jeweils 100 Zellen ausgezählt, daraus der Mittelwert errechnet und aus der Gesamtzahl der Zellen die antigenpositiven Zellen in Prozent angegeben.

5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programmsystem Bias, Version 6. Die Überprüfung aller Daten auf das Vorliegen einer Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Goodness-of-Fit-Test vorgenommen.

Aus den Einzelergebnissen der Versuchsserien wurden der Mittelwert \pm Standardabweichung, der Median, 1.Quartil und 3.Quartil ermittelt. Die Mittelwerte dienen dem Vergleich mit anderen Arbeiten. Da die untersuchten Parameter nicht normal verteilt waren, wurden Mediane zur Ergebnisdarstellung in dieser Arbeit herangezogen.

Um die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Gruppen zu beurteilen, wurden zur Signifikanzprüfung nichtparametrische Testverfahren wie der Kruskal-Wallis-Test und der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet. Sie dienen dem Vergleich zweier bzw. mehrere unabhängiger Stichproben, die nicht die Voraussetzung der Normalverteilung

Bei den Korrelationsberechnungen wurde der Spearman Rang Korrelationskoeffizient verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

IV. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse beginnt mit der phänotypischen Charakterisierung der in der Funktionsanalyse als Zielzellen eingesetzten Zelllinien *Raji* und *K562*. Zur Etablierung der Biotin-Streptavidin-Methode wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, die ermittelten Verdünnungen und die optimale Behandlung der Schnitte werden in der Tabelle 11 aufgeführt.

Die klinische Studie umfaßt die Daten der Immunphänotypisierung und der Funktionsanalysen von Tumorpatienten und Kontrollen. Die Patienten wurden nach folgenden Kriterien verschiedenen Gruppen zugeteilt: Tumorgröße, Tumormalignität, Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und Therapiemodalitäten. Die Ergebnisse werden graphisch präsentiert, hierbei werden für jeweils zwei Immunparameter die Werte der Patientengruppen und Kontrollen gegenübergestellt.

Danach schließt sich die Betrachtung der humoralen Parameter an. Dargestellt ist der IL-2-Spiegel bei Patienten mit Tumoren im Gaumen, bzw. Zugenbereich, die den Gruppen T3 - T4, G2, Lymphknotenmetastasen, Chemo- und Bestrahlungstherapie zugeordnet wurden.

Zudem wird bei ausgewählten Patienten und Kontrollen der IL-2 Spiegel im zeitlichen Verlauf betrachtet. Bei der folgenden Darstellung der Daten für die sIL-2R α -Bestimmung erfolgte die Unterteilung der Patienten wiederum nach Tumorgröße, Tumormalignität, Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und Therapiemodalitäten.

In den Tabellen 50 bis 53 sind die Korrelationsanalysen aufgeführt. Korreliert werden zum einen die PBL-Phänotypen sowie die NK-Zell, bzw. LAK-Zellaktivität bei Patienten und Kontrollpersonen, zum anderen die IL-2- bzw. sIL-2R α -Plasmakonzentrationen bei Patienten und Kontrollpersonen mit den PBL-Phänotypen.

Der Ergebnisteil wird mit Untersuchungen zum Phänotyp tumorinfiltrierender Lymphozyten beendet.

1. Phänotypisierung der Zelllinien *Raji* und *K562*

Tab.10: Phänotypisierung der *Raji* und *K562* Zelllinien mit:CD4-, CD8-, CD3-, CD19-,CD16-,CD56-, CD2-,CD25-, HLA-DR-, CD45-, CD45RA-, CD45 RO-Antikörpern. Da die CD4, CD3, CD2,CD16 und CD25 Oberflächenmarker auf keiner der Zelllinien nachweisbar waren, wurden diese nicht in der Tabelle berücksichtigt. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

[%]	CD8	CD19	CD56	HLA-DR	CD45	CD45RA	CD45RO
<i>K562</i> (n = 4)							
MW ± SD	0,1 ± 0,08	-	0,1 ± 0,08	-	16 ± 3,5	-	0,7 ± 0,4
<i>Raji</i> (n = 4)							
MW ± SD	0,1 ± 0,04	95,5 ± 4,5	0,1 ± 0,12	74 ± 14	99,2 ± 0,82	74 ± 15,7	-

2. Etablierung der Biotin-Streptavidin Methode

Tab.11: Verdünnungen der verwendeten Antikörper und des Peroxidase-Streptavidin-Konjugats, Art der Vorbehandlung der Schnitte sowie benötigte Zeit für die AEC-Substratumsetzung durch Peroxidase

	CD3	CD45	HLA-DR	CD8
Vorbehandlung der Gewebeschnitte	Proteinkinase K	keine	keine	Zitratpuffer
Primärantikörper	Kaninchen anti-Human CD3 1:20	Maus anti-Human CD45 unverdünnt	Maus anti-Human HLA-DR 1:5	Maus anti-Human CD8 1:10
1.Sekundärantikörper	Ziege anti-Kaninchen 1:300	Ziege Anti-Maus 1:300	Ziege anti-Maus 1:150	Ziege anti-Maus 1:150
2.Sekundärantikörper	Maus anti-Ziege 1:300	Maus anti-Ziege 1:300	Maus anti-Ziege 1:150	Maus anti-Ziege 1:150
Peroxidase-Streptavidin-Konjugat	1:150	1:150	1:150	1:150
Zeit der AEC-Substratumsetzung	6 Minuten	6 Minuten	12 Minuten	6 Minuten

3. Zelluläres Immunprofil

Um die Frage aufzuklären, inwieweit Parameter des zellulären Immunsystems durch das Vorhandensein eines Tumors bei Patienten (n = 47) mit histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, Hypopharynx und Larynx verändert werden können, wurden die Patienten nach Tumorgröße (T), Tumormalignität (G) und Vorhandensein oder Fehlen von Lymphknotenmetastasen eingruppiert. Hierbei wurden nur Werte vor der Operation in Betracht gezogen. Weiterhin interessierte die Beeinflussung des Immunsystems durch operative Eingriffe, Chemo-, Bestrahlungs- und kombinierte Radio-Chemotherapie.

3.1. Zelluläres Immunprofil von Kontrollpersonen

Tab. 12: Normwerte der Kontrollpersonen (n=10). MW =Mittelwert; SD = Standardabweichung. Anzahl der Untersuchungen pro Parameter: M = 101; Bestimmung der LAK- und NK-Zellaktivität: Effektorzellen:Zielzellen = 40:1

Antigen	MW ± SD [%]	Median [%]	Minimum [%]	Maximum [%]	1. Quartil [%]	3. Quartil [%]
CD4	36,4 ± 10,7	37	10	62	30,5	43
CD8	34,8 ± 8,1	35	16	56	28	41
CD4 ⁺ CD8 ⁺	1,4 ± 1,0	1	0	5,1	0,6	2,1
CD3	65,1 ± 10,8	66	30	84	59,5	73
CD19	9,7 ± 4	10	1	24	6,5	12
CD56	22,8 ± 10,4	21	4	64	15	28
CD2	76 ± 7,7	77	54	91	71	81
CD25	19,7 ± 7,5	19	4	35	14	26
CD2 ⁻ CD25 ⁺	3,7 ± 2,0	4	0	10	2	5
CD2 ⁺ CD25 ⁺	16 ± 6,3	15	4	30	11	21
CD45	95,8 ± 4,2	97	80	100	94	98
HLA-DR	16,8 ± 6,3	16	6	47	13	19,5
LAK-Zellaktivität	18,8 ± 11,3	11	0	87	6	22,5
NK-Zellaktivität	58,9 ± 25,2	65	2	100	37,5	77,5

3.2. Zelluläres Immunprofil und Tumorgroße

Tab. 13: CD4- sowie CD8-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: keine Evidenz für einen Primärtumor (T0) und mit zunehmender Größe des Primärtumors (T1 - T4). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD4 [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1-T2 (n = 15; M = 15)	T3-T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	23 ± 9,6	31,2 ± 10,8	31,9 ± 13,2
Minimum	16	13	9
Maximum	34	51	54
Median	19	33	35
1. Quartil	16	24	20
3. Quartil	34	37	42
CD8 [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1-T2 (n = 15; M = 15)	T3-T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	30,7 ± 18	35,9 ± 4	35 ± 7,9
Minimum	17	21	18
Maximum	51	50	44
Median	24	34	35
1. Quartil	17	26	28
3. Quartil	51	45	42

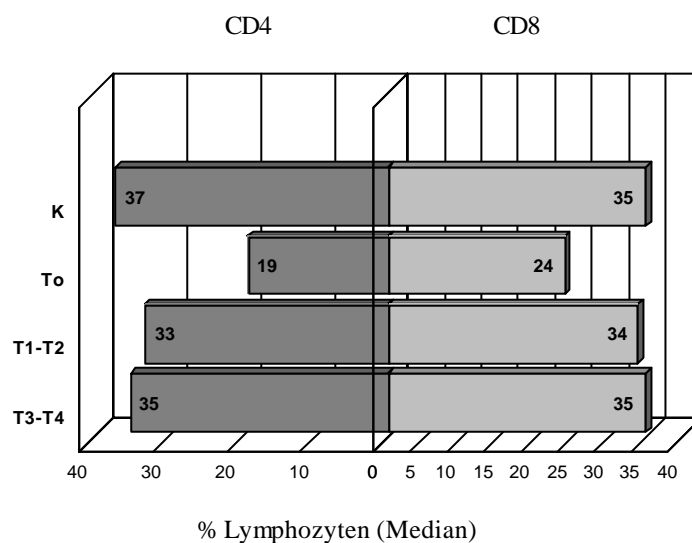


Abb. 4: Vergleich der CD4-Werte (T-Helferzellen) sowie der CD8-Werte (zytotoxische T-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Keine Evidenz für einen Primärtumor (T0), mit zunehmender - T4) und Kontrollgruppe (K)

Abb. 4 zeigt eine signifikante Abnahme der CD4-Population nur bei der Gruppe T0 ($p < 0,04$) gegenüber der Kontrollgruppe. Bezüglich der CD8-Population bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den nach Tumorgroße eingeteilten Patienten und dem Kontrollkollektiv.

IV. Ergebnisse

Tab. 14: CD4⁺CD8⁺-doppeltpositive Zellen und CD3-positive Zellen [%] bei Patientengruppen: keine Evidenz für einen Primärtumor (T0) und mit zunehmender Größe des Primärtumors (T1 - T4). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD4 ⁺ CD8 ⁺ [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1-T2 (n = 15; M = 15)	T3-T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	1,3 ± 0,4	2,3 ± 1,4	1,9 ± 1,6
Minimum	0,8	0	0,4
Maximum	1,6	6,2	5,5
Median	1,5	2,5	1,6
1. Quartil	0,8	1,7	0,8
3. Quartil	1,6	2,9	2,1
CD3 [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1-T2 (n = 15; M = 15)	T3-T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	49,3 ± 20,5	58,7 ± 16,7	58,2 ± 19,2
Minimum	29	30	24
Maximum	70	81	87
Median	49	62	59
1. Quartil	29	45	44
3. Quartil	70	74	72,5

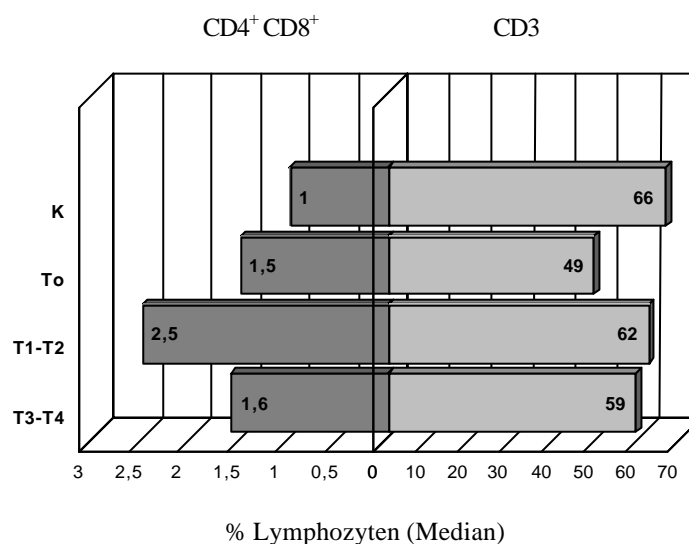


Abb. 5: Vergleich der CD4⁺CD8⁺-Werte (doppeltpositive T-Zellen) sowie der CD3-Werte (T-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Keine Evidenz für einen Primärtumor (T0), mit zunehmender Größe des Primärtumors (T1 - T4) und Kontrollgruppe (K)

Eine Erhöhung der CD4⁺CD8⁺-positiven Zellen bei der Gruppe T1 - T2 ($p < 0,005$) gegenüber dem Kontrollkollektiv ist hier zu sehen. Die Erhöhung der unreifen T-Zellen bei den Gruppen T0 (1,5 %) und T3 - T4 (1,6 %) wich von den Kontrollwerte nicht signifikant ab. Keine der Gruppen erreichte eine nennenswerte Verschiebung der CD3-positiven Zellen zu den Normalwerten.

- T4) und Kontrollgruppe (K)

Keine Unterschiede zu den Normwerten konnten bezüglich CD2-positiver und CD25-positiver Zellen bei allen Patientengruppen beobachtet werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 16: CD2⁺CD25⁺-doppeltpositive- sowie CD2⁻ CD25⁺-einfachpositive-Zellen [%] bei Patientengruppen: keine Evidenz für einen Primärtumor (T0) und mit zunehmender Größe des Primärtumors (T1 - T4). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD2 ⁺ CD25 ⁺ [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1-T2 (n = 15; M = 15)	T3-T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	20,3 ± 8,6	19,4 ± 11	18,3 ± 9,3
Minimum	11	6	2
Maximum	28	42	33
Median	22	14	16
1. Quartil	11	12	11,5
3. Quartil	28	24	26
CD2 ⁻ CD25 ⁺ [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1-T2 (n = 15; M = 15)	T3-T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	4,6 ± 2	4,2 ± 2,7	4,7 ± 3,5
Minimum	3	0	1
Maximum	7	10	13
Median	4	4	3
1. Quartil	3	2	2,5
3. Quartil	7	7	7

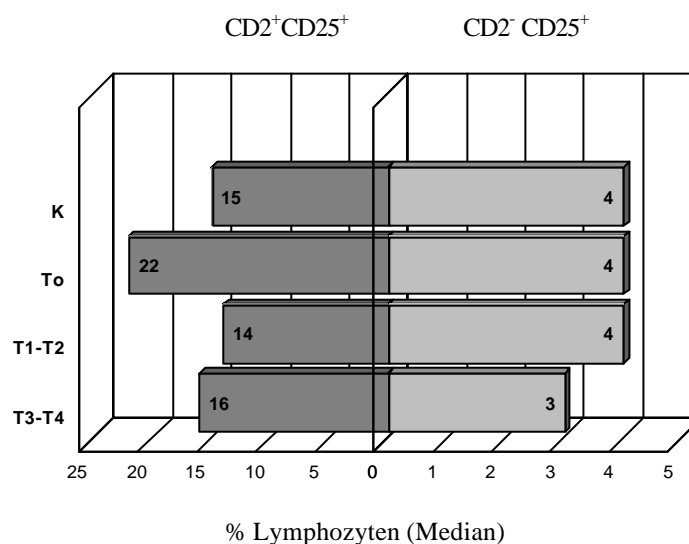


Abb. 7: Vergleich der CD25⁺CD2⁻-Werte (IL-2R α auf B-Zellen) sowie der CD25⁺CD2⁺-Werte (IL-2R α auf T-Zellen und NK-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Keine Evidenz für einen Primärtumor (T0), mit zunehmender Größe des Primärtumors (T1 - T4) und Kontrollgruppe (K)

Es konnte keine Verschiebung des Anteils CD25-positiver T bzw. NK-Zellen, sowie des Anteils CD25-positiver B-Lymphozyten im Vergleich zu den Kontrollpersonen festgestellt werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 17: CD19- sowie CD56-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: keine Evidenz für einen Primärtumor (T0) und mit zunehmender Größe des Primärtumors (T1 - T4). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD19 [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1 - T2 (n = 15; M = 15)	T3 - T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	18,6 ± 24,7	11,8 ± 9,3	13 ± 12,8
Minimum	2	1	3
Maximum	47	28	48
Median	7	9	7
1. Quartil	2	4	5
3. Quartil	47	17	18
CD56 [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1 - T2 (n = 15; M = 15)	T3 - T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	24 ± 12,5	29,5 ± 18,1	26,7 ± 15,4
Minimum	12	7	10
Maximum	37	66	68
Median	23	30	24
1. Quartil	12	11	14,5
3. Quartil	37	42	33,5

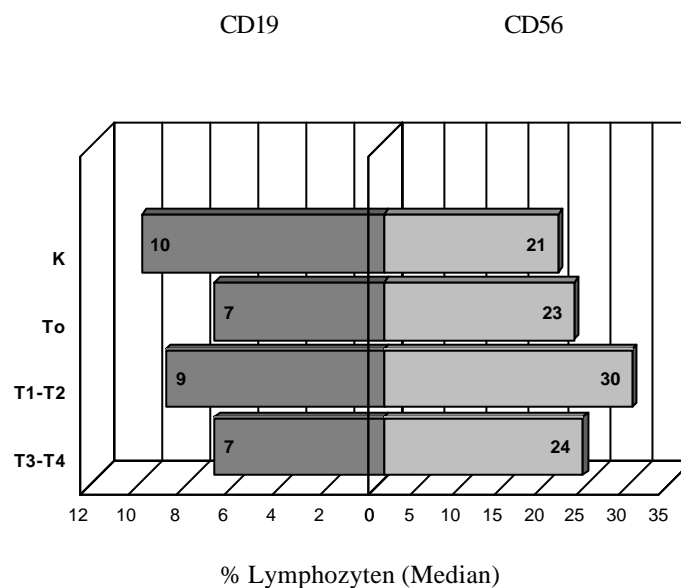


Abb. 8: Vergleich der CD19-Werte (B-Zellen) sowie der CD56-Werte (NK-Zellen) zwischen Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Keine Evidenz für einen Primärtumor (T0), mit zunehmender Größe r- tumors (T1 - T4) und Kontrollgruppe (K)

Zwischen den Patientengruppen und den Kontrollkollektiv konnten für die Parameter CD19 und CD56 keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 18: CD45- sowie HLA-DR positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: keine Evidenz für einen Primärtumor (T0) und mit zunehmender Größe des Primärtumors (T1 - T4). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD45 [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1 - T2 (n = 15; M = 15)	T3 - T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	97,3 ± 1,2	94,3 ± 7,4	97,6 ± 1,6
Minimum	96	71	95
Maximum	98	99	100
Median	98	98	98
1. Quartil	96	93	96
3. Quartil	98	99	99
HLA-DR [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1 - T2 (n = 15; M = 15)	T3 - T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	22,7 ± 6,3	18,9 ± 7,4	23,8 ± 11
Minimum	19	5	5
Maximum	30	32	50
Median	19	17	22
1. Quartil	19	13	17,5
3. Quartil	30	25	31

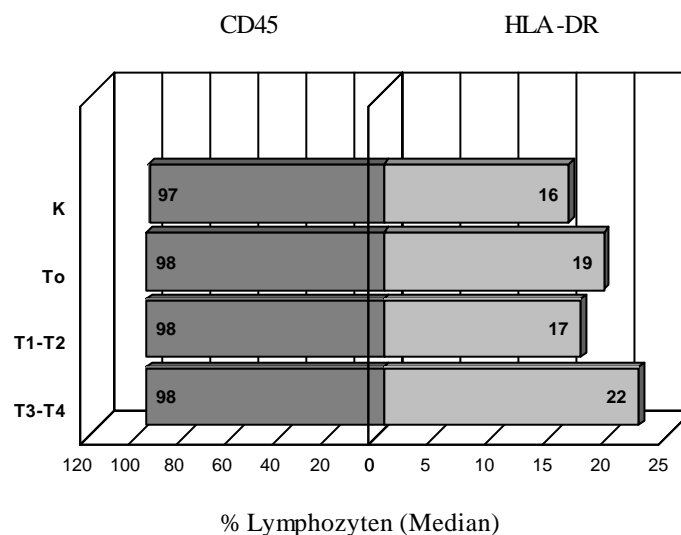


Abb. 9: Vergleich der CD45-Werte (Pan-Leukozyten) sowie der HLA-DR-Werte (MHC-Klasse II) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Keine Evidenz für einen Primärtumor (T0), mit zunehmender - T4) und Kontrollgruppe (K)

Der Anteil CD45-positiver PBL war bei allen Gruppen annähernd gleich. Der Anteil aktivierter Lymphozyten (HLA-DR-positiv) war bei der Gruppe T3 - T4 ($p = 0,003$) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

IV. Ergebnisse

Tab. 19: LAK-Zell- sowie NK-Zellaktivität [Zielzell-Lyse %] bei Patientengruppen: keine Evidenz für einen Primärtumor (T0) und mit zunehmender Größe des Primärtumors (T1 - T4). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

LAK-Zell-Aktivität [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1 - T2 (n = 15; M = 15)	T3 - T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	8,3 ± 4	19,3 ± 19,9	10,4 ± 8,8
Minimum	6	0	0
Maximum	13	69	28
Median	6	13	10
1. Quartil	6	6	2,5
3. Quartil	13	25	16,5
NK-Zell-Aktivität [%]	T0 (n = 3; M = 3)	T1 - T2 (n = 15; M = 15)	T3 - T4 (n = 3; M = 3)
MW ± SD	79,3 ± 16,5	69 ± 26,9	45,7 ± 23,7
Minimum	61	18	5
Maximum	93	100	77
Median	84	78	54
1. Quartil	61	42	20
3. Quartil	93	92	65

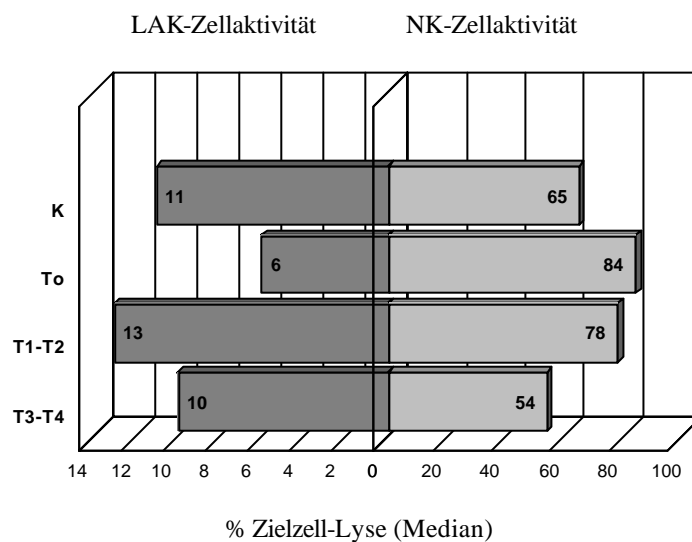


Abb. 10: Vergleich der LAK-Zellaktivität sowie der NK-Zellaktivität zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Keine Evidenz für einen Primärtumor (T0), mit zunehmender Größe einen Primärtumor (T1 - T4) und Kontrollgruppe (K)

Die LAK-Zell- sowie NK-Zellaktivitäten der Patienten unterscheiden sich nicht signifikant von den Normwerten.

3.3. Zelluläres Immunprofil und Tumormalignität

Tab. 20: CD4- sowie CD8-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3).
MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD4 [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	33,2 ± 6,1	30,5 ± 11,6	29,2 ± 13,6
Minimum	26	9	16
Maximum	42	51	54
Median	34	33	26,5
1. Quartil	27,5	20	18,2
3. Quartil	38,5	39	38,2
CD8 [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	33,2 ± 8,6	36 ± 8,4	30,2 ± 12,7
Minimum	24	21	17
Maximum	44	50	51
Median	35	35	30
1. Quartil	24,5	27	17,7
3. Quartil	41	42	39

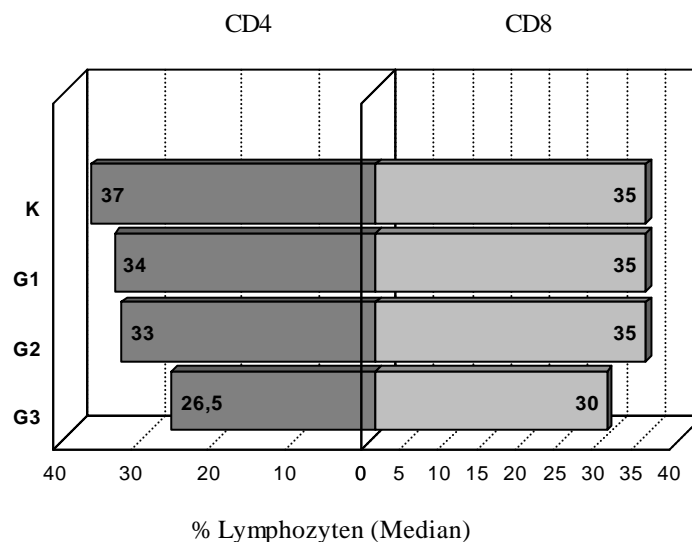


Abb. 11: Vergleich der CD4-Werte (T-Helferzellen) sowie der CD8-Werte (zytotoxische T-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3) und Kontrollgruppe (K)

Die Erniedrigung der CD4-Werte gegenüber den Kontrollen ist für die Gruppe G2 signifikant ($p = 0,04$). Die Erniedrigung der CD8-Werte bei der Gruppe G3 war im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv statistisch nicht abzusichern.

IV. Ergebnisse

Tab. 21: CD4⁺CD8⁺-doppeltpositive sowie CD3-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD4 ⁺ CD8 ⁺ [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	2 ± 0,5	2,4 ± 1,7	1,6 ± 1
Minimum	1,4	0,4	0,6
Maximum	2,6	6,2	3,3
Median	2	2	1,5
1. Quartil	1,4	0,9	0,7
3. Quartil	2,4	2,9	2,4
CD3 [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	70 ± 12,6	57,5 ± 17,9	50 ± 14,5
Minimum	56	24	29
Maximum	84	87	74
Median	70	62	49,5
1. Quartil	57,5	41	41
3. Quartil	82,5	71	58,2

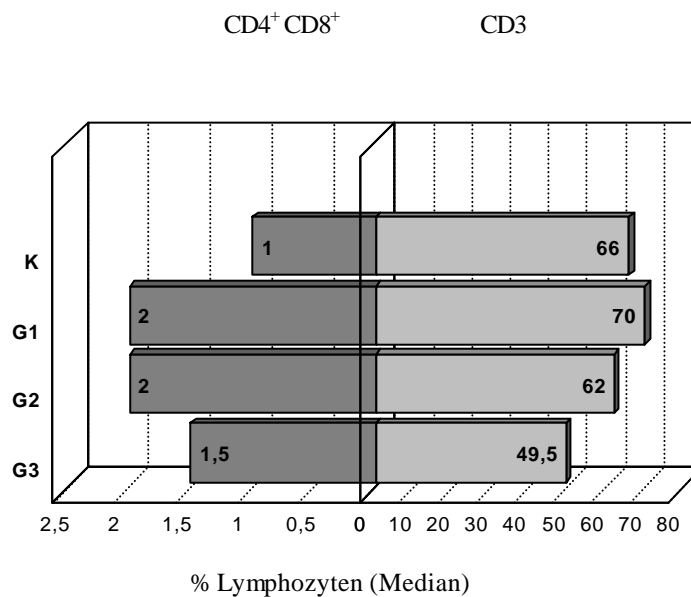


Abb. 12: Vergleich der CD4⁺CD8⁺-Werte (doppeltpositive T-Zellen) sowie der CD3-Werte (T-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3) und Kontrollgruppe (K)

Es zeigte sich eine Erhöhung der unreifen T-Zellen bei der Gruppe G2 ($p = 0,008$) gegenüber den Kontrollen. Bei der Gruppe G1 und G3 war diese Erhöhung nicht signifikant. Der CD3-Wert von 49,5 % bei der Gruppe G3 war im Vergleich zu Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ($p < 0,008$). Die Erhöhung der CD3-Werte bei der Gruppe G1 bzw. die Erniedrigung bei der Gruppe G2 war nicht signifikant gegenüber den Normwerten.

IV. Ergebnisse

Tab. 22: CD2- sowie CD25-positive Zellen [%] bei Patientengruppen mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD2 [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	79,8 ± 6,2	68,3 ± 18,8	68,8 ± 17,5
Minimum	71	31	36
Maximum	86	91	88
Median	82	77	72,5
1. Quartil	73,5	55	60
3. Quartil	85	83	79
CD25 [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	27,6 ± 10,7	22,9 ± 12,5	23,3 ± 6,8
Minimum	17	5	17
Maximum	43	49	35
Median	29	24	22
1. Quartil	17,5	11	17,7
3. Quartil	37	31	28,2

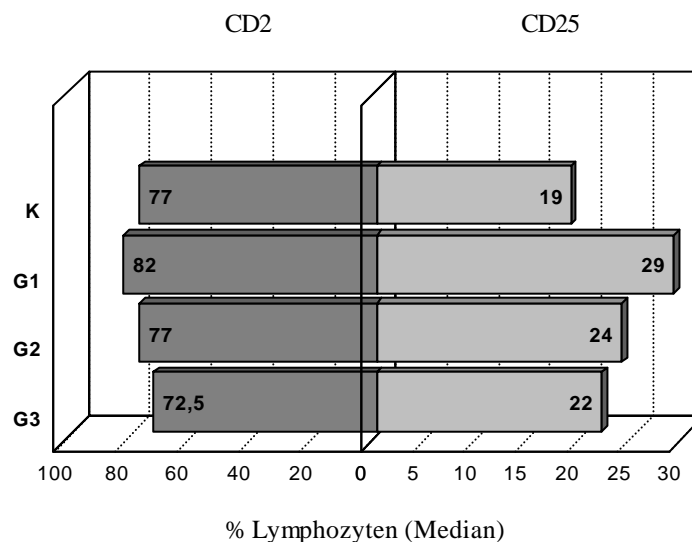


Abb. 13: Vergleich der CD2-Werte (Pan-T-Zellen, NK-Zellen) sowie der CD25-Werte (IL-2R α) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3) und Kontrollgruppe (K)

Die statistische Auswertung der Mediane für CD2 und CD25 in Abhängigkeit der Tumormalignität ergab keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Kontrollkollektiv.

IV. Ergebnisse

Tab. 23: CD2⁺CD25⁺-doppeltpositive- sowie CD2⁻CD25⁺-einfachpositive-Zellen [%] bei Patientengruppen mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD2 ⁺ CD25 ⁺ [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	23,2 ± 10,7	18,4 ± 10,8	19 ± 7,5
Minimum	12	2	11
Maximum	39	42	31
Median	21	16	19
1. Quartil	14	10	11,7
3. Quartil	33,5	24	24,2
CD2 ⁻ CD25 ⁺ [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	4,4 ± 2,3	4,5 ± 3,4	4,3 ± 2,3
Minimum	2	0	1
Maximum	8	13	7
Median	4	3	4
1. Quartil	2,5	2	2,5
3. Quartil	6,5	7	7

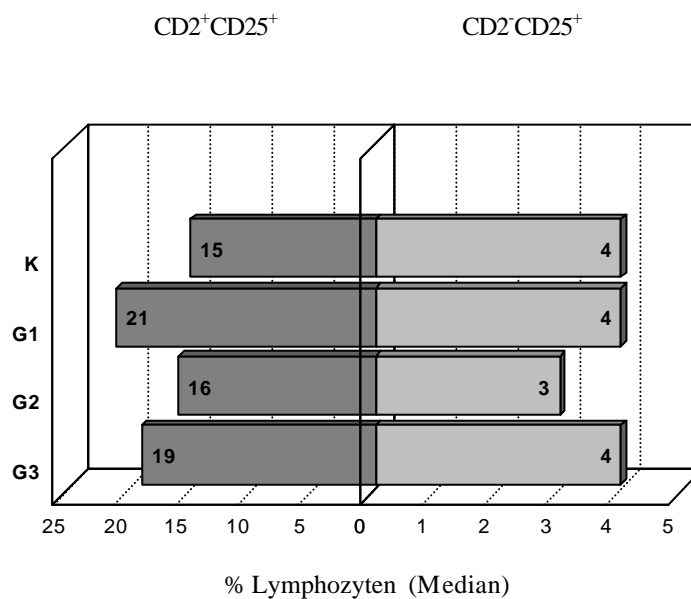


Abb. 14: Vergleich der CD2⁻CD25⁺-Werte (IL-2R α auf B-Zellen) sowie der CD2⁺CD25⁺-Werte (IL-2R α auf T-Zellen und NK-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3) und Kontrollgruppe (K)

Sowohl für CD25-Marker auf T-Zellen bzw. NK-Zellen als auch für CD25-Marker auf B-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe festgestellt werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 24: CD19- sowie CD56- positive-Zellen [%] bei Patientengruppen mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD19 [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	9,6 ± 9,2	13,8 ± 12,2	14,5 ± 16,5
Minimum	4	1	2
Maximum	26	48	47
Median	6	9	10,5
1. Quartil	4,5	4	3,5
3. Quartil	16,5	19	21,5
CD56 [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	24,2 ± 8,7	27,9 ± 17,4	28,5 ± 14,5
Minimum	11	7	11
Maximum	34	68	43
Median	23	24	31,5
1. Quartil	17	11	11,7
3. Quartil	32	39	42,2

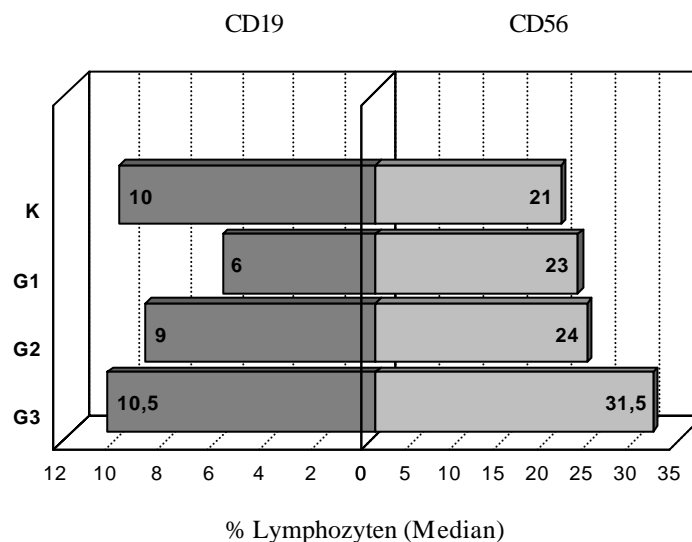


Abb. 15: Vergleich der CD19-Werte (B-Zellen) sowie der CD56-Werte (NK-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3) und Kontrollgruppe (K)

Es konnte kein signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen für den CD19-Marker festgestellt werden. Mit zunehmender Malignität konnte ein, statistisch aber nicht absicherbarer, Anstieg der CD56-Werten beobachtet werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 25: CD45- sowie HLA-DR positive-Zellen [%] bei Patientengruppen mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD45 [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	98,6 ± 0,9	96,9 ± 2,5	95,6 ± 4,5
Minimum	98	90	87
Maximum	100	100	99
Median	98	98	97
1. Quartil	98	95	93
3. Quartil	99,5	99	99
HLA-DR [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	21,4 ± 12,1	22,3 ± 9,9	20 ± 2,2
Minimum	5	5	17
Maximum	34	50	23
Median	25	19	19,5
1. Quartil	9	16	18,5
3. Quartil	32	28	22,2

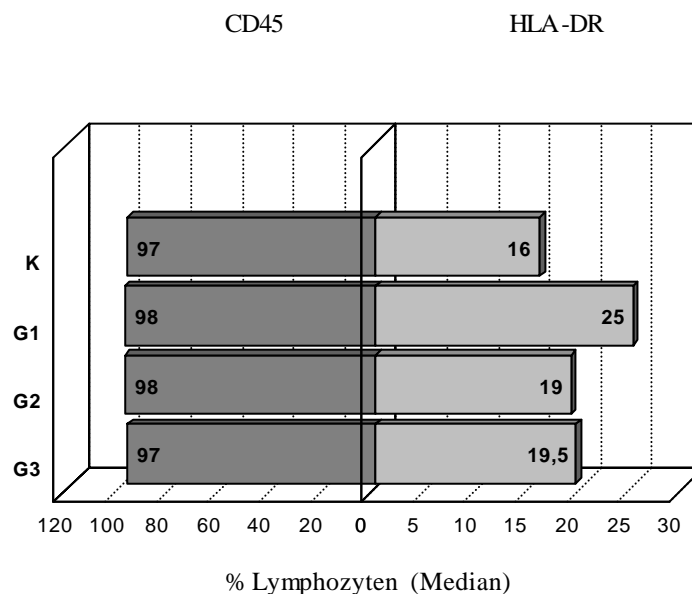


Abb. 16: Vergleich der CD45-Werte (Pan-Leukozyten) sowie der HLA-DR-Werte (MHC-Klasse II) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3) und Kontrollgruppe (K)

Die CD45-Werte aller Gruppen sind vergleichbar zu den CD45-Werten der Kontrollgruppe. Eine starke Erhöhung der HLA-DR-Werte konnte man bei der G1-Gruppe ($p = 0,006$) gegenüber dem Kontrollkollektiv beobachten. Die Erhöhung bei den Gruppen G2 und G3 war nicht absicherbar.

IV. Ergebnisse

Tab. 26: LAK-Zell- sowie NK-Zellaktivität [Zielzell-Lyse %] bei Patientengruppen mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

LAK-Zell-Aktivität [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	3,8 ± 4,7	18,5 ± 18,1	16,3 ± 16,7
Minimum	0	0	3
Maximum	11	69	41
Median	2	11	13
1. Quartil	0	8	5,2
3. Quartil	8,5	25	26,7
NK-Zell-Aktivität [%]	G1 (n = 5; M = 5)	G2 (n = 19; M = 19)	G3 (n = 6; M = 6)
MW ± SD	53 ± 27,6	67,7 ± 30,1	64,5 ± 24,6
Minimum	21	5	29
Maximum	84	100	93
Median	50	72	60,5
1. Quartil	26,5	41	46,2
3. Quartil	81	88	92,2

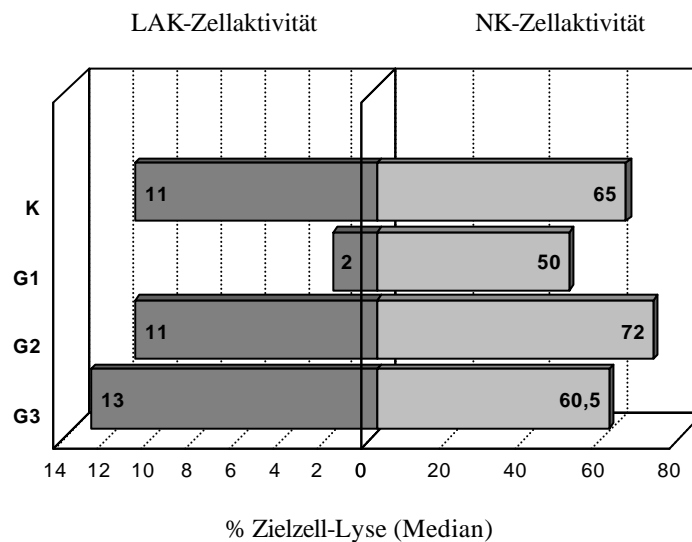


Abb. 17: Vergleich der LAK-Zellaktivität sowie der NK-Zellaktivität zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten mit zunehmender Tumormalignität (G1 - G3) und Kontrollgruppe (K)

Eine statistisch absicherbare Absenkung der LAK-Zellaktivität konnte im Vergleich zu Kontrollkollektiv nur bei der Gruppe G1 gefunden werden ($p < 0,02$). Die Erniedrigung der NK-Zellaktivität bei G1 und G3, sowie die Erhöhung bei der Gruppe G2 waren nicht signifikant.

3.4. Zelluläres Immunprofil und Lymphknotenmetastasen

Tab. 27: CD4- sowie CD8-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD4 [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	28,4 ± 12,2	32,8 ± 11
Minimum	9	16
Maximum	47	54
Median	27,5	33,5
1. Quartil	19	21,7
3. Quartil	38,2	41,2
CD8 [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	36,8 ± 7,5	32,9 ± 10
Minimum	25	17
Maximum	50	51
Median	36,5	32
1. Quartil	32,2	25,2
3. Quartil	42,5	41,5

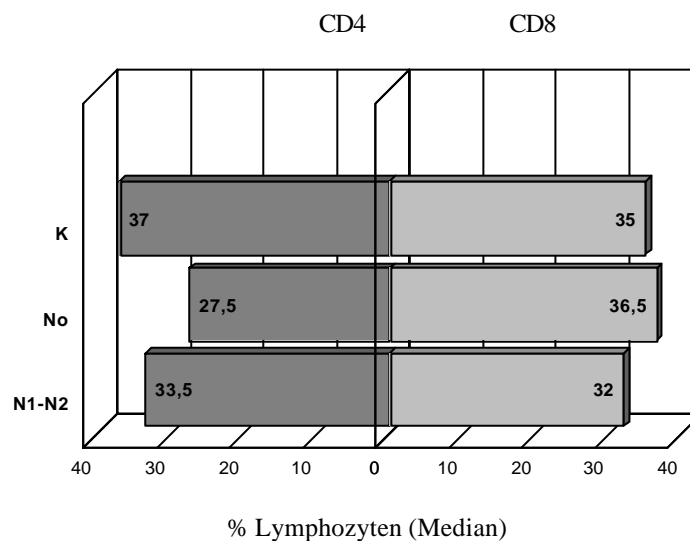


Abb. 18: Vergleich der CD4-Werte sowie der CD8-Werte zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0), mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2) und Kontrollgruppe (K)

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich wurde eine erniedrigte Zahl der CD4⁺-Zellen bei der Gruppe N0 (p = 0,04) im Vergleich zum Kontrollkollektiv festgestellt, während die Zahl der CD8⁺-Zellen nicht verändert war.

IV. Ergebnisse

Tab. 28: CD4⁺CD8⁺-doppeltpositive- sowie CD3-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD4 ⁺ CD8 ⁺ [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	2,3 ± 1,3	2,1 ± 1,5
Minimum	0,4	0,6
Maximum	5,4	6,2
Median	2,1	1,6
1. Quartil	1,5	1
3. Quartil	2,7	2,7
CD3 [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	55,6 ± 20,9	60 ± 15,4
Minimum	24	29
Maximum	84	87
Median	59	61
1. Quartil	31,7	49,2
3. Quartil	72,7	73,2

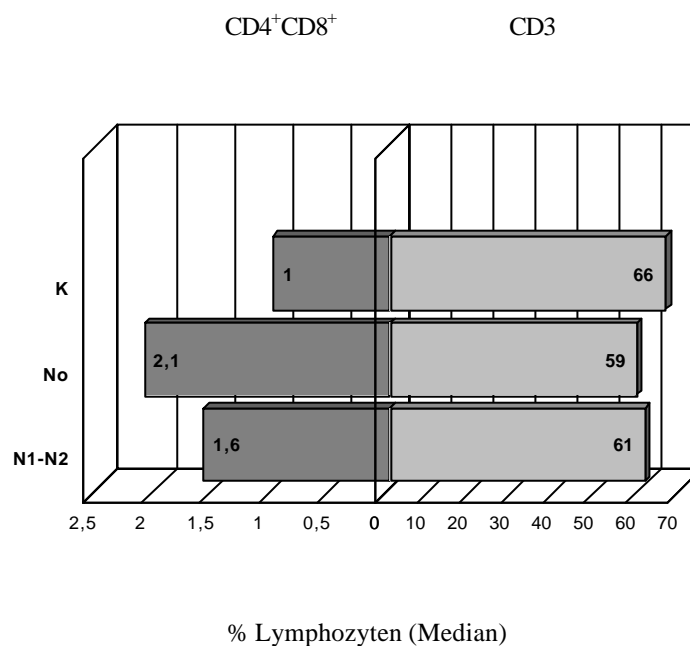


Abb. 19: Vergleich der CD4⁺CD8⁺-Werte (doppeltpositiven T-Zellen) sowie der CD3-Werte (T-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0), mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2) und Kontrollgruppe (K)

Eine Zunahme unreifer T-Lymphozyten ließ sich bei den Gruppen N1 - N2 ($p = 0,03$) und N0 ($p < 0,03$) im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen.

IV. Ergebnisse

Tab. 29: CD2- sowie CD25-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD2 [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	66,9 ± 19,7	72,4 ± 16,1
Minimum	31	36
Maximum	86	91
Median	74,5	76,5
1. Quartil	51,5	67,2
3. Quartil	84,2	82,7
CD25 [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	21,6 ± 11,7	24,8 ± 10,9
Minimum	5	9
Maximum	43	49
Median	21,5	24,5
1. Quartil	12,7	16,2
3. Quartil	29,2	32,5

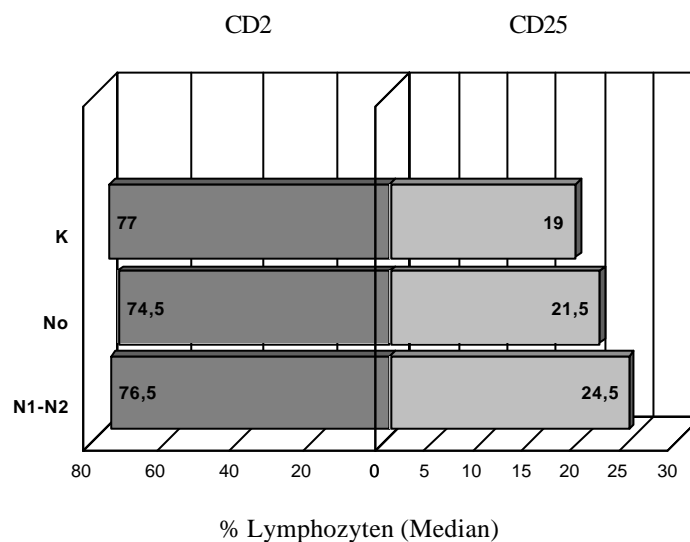


Abb. 20: Vergleich der CD2-Werte (Pan-T-Zellen, NK-Zellen) sowie der CD25-Werte (IL-2R α) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0), mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2) und Kontrollgruppe (K)

Weder für CD2 noch für CD25 konnten signifikanten Unterschiede zwischen Patientengruppen und Kontrollgruppe gefunden werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 30: CD2⁺CD25⁺-doppeltpositive- sowie CD2⁻CD25⁺-einfachpositive-Zellen [%] bei Patientengruppen: ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD2 ⁺ CD25 ⁺ [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	17,5 ± 10,6	20,1 ± 9,7
Minimum	2	8
Maximum	39	42
Median	16	19,5
1. Quartil	10,5	11,2
3. Quartil	24	28
CD2 ⁻ CD25 ⁺ [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	4,1 ± 2,4	4,6 ± 3,3
Minimum	0	1
Maximum	9	13
Median	4	3,5
1. Quartil	2,7	2,2
3. Quartil	5,2	7

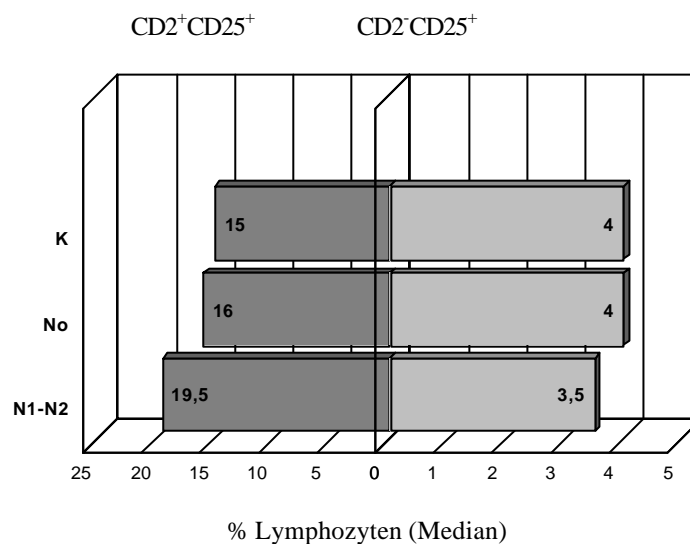


Abb. 21: Vergleich der CD2⁻CD25⁺-Werte (IL-2R α auf B-Zellen) sowie der CD2⁺CD25⁺-Werte (IL-2R α auf T-Zellen und NK-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0), mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2) und Kontrollgruppe (K)

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Anteile von CD2⁺CD25⁺- und CD2⁻CD25⁺-Zellen zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe gefunden werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 31: CD19- sowie CD56-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD19 [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	13 ± 9,4	13 ± 14
Minimum	1	2
Maximum	28	48
Median	11,5	7
1. Quartil	4,7	4
3. Quartil	20,7	16
CD56 [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	32,7 ± 20,1	24 ± 12,6
Minimum	11	7
Maximum	68	43
Median	27,5	23,5
1. Quartil	18,5	11
3. Quartil	45,7	36

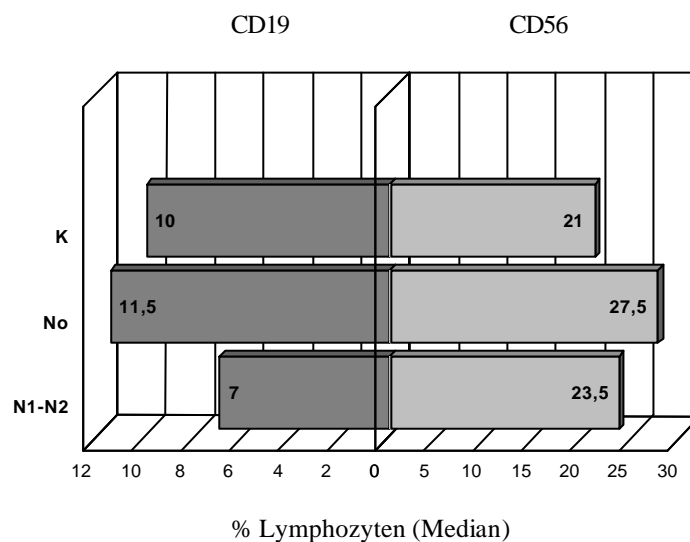


Abb.22 : Vergleich der CD19-Werte (B-Zellen) sowie der CD56-Werte (NK-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0), mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2) und Kontrollgruppe (K)

Die B-Zellanteile bei beiden Patientengruppe unterschieden sich nicht signifikant im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Für NK-Zellen mit CD56-Marker konnten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zu den Kontrollen festgestellt werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 32: CD45- sowie HLA-DR-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD45 [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	97,1 ± 2,7	96,7 ± 3
Minimum	90	87
Maximum	99	100
Median	98	97,5
1. Quartil	96	95
3. Quartil	99	99
HLA-DR [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	19,9 ± 8	22,5 ± 9,6
Minimum	5	5
Maximum	34	50
Median	20	19
1. Quartil	15,2	16,2
3. Quartil	25,5	29,5

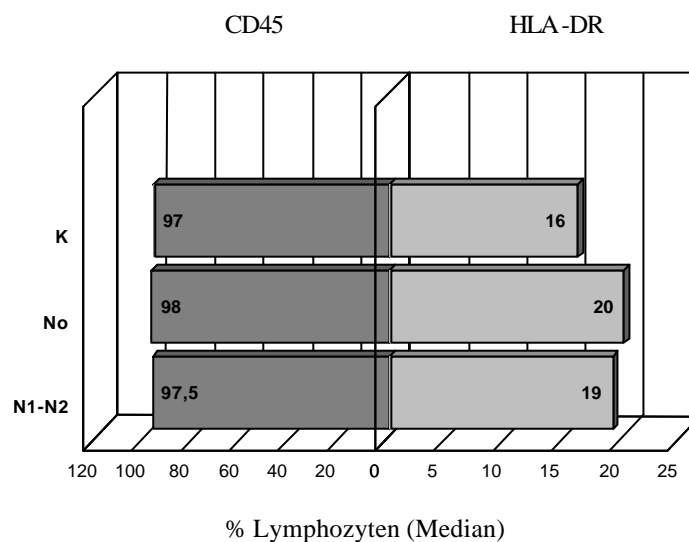


Abb. 23: Vergleich der CD45-Werte (Pan-Leukozyten) sowie der HLA-DR-Werte (MHC-Klasse II) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0), mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2) und Kontrollgruppe (K)

Die CD45 Median-Werte waren in Bezug zu dem Kontrollkollektiv nicht verändert. Dagegen war der HLA-DR-Marker bei der Gruppe N1 - N2 gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht ($p = 0,002$).

IV. Ergebnisse

Tab. 33: LAK-Zell- sowie NK-Zellaktivität [Zielzell-Lyse %] bei Patientengruppen: ohne Lymphknotenmetastasen (N0) und mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung ; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

LAK-Zell-Aktivität [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	9,1 ± 6,1	17,1 ± 18,4
Minimum	0	0
Maximum	22	69
Median	9	12
1. Quartil	5	3,7
3. Quartil	11,5	24,2
NK-Zell-Aktivität [%]	N0 (n = 10; M = 10)	N1 - N2 (n = 20; M = 20)
MW ± SD	69,6 ± 25	56,4 ± 28,6
Minimum	21	5
Maximum	100	93
Median	74,5	59,5
1. Quartil	53,7	29,7
3. Quartil	88,7	83,7

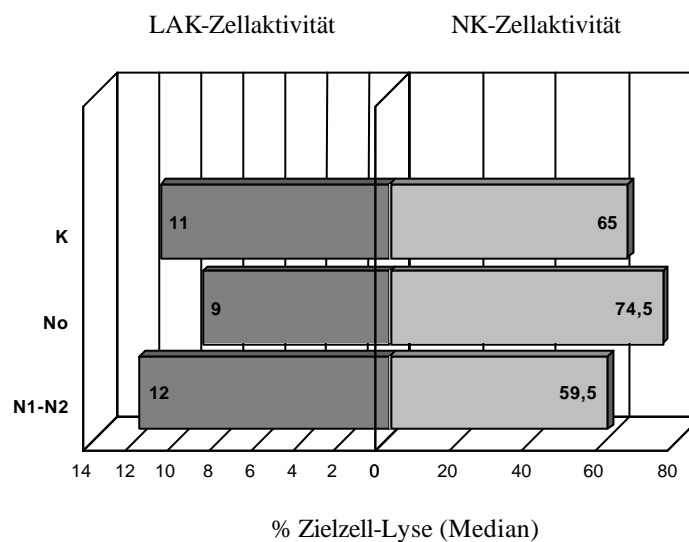


Abb. 24: Vergleich der LAK-Zellaktivität sowie der NK-Zellaktivität zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0), mit Lymphknotenmetastasen (N1 - N2) und Kontrollgruppe (K)

Die Aktivitäten der LAK- bzw. NK-Zellen wiesen in keiner der beiden Gruppen signifikante Unterschiede zu den Kontrollen auf.

3.5. Zelluläres Immunprofil und verschiedene Therapiemodalitäten

Tab.34 : CD4- sowie CD8-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen ohne Therapie, postoperativ, mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD4 [%]	ohne Therapie (n = 7; M = 33)	postoperativ (n = 31; M = 31)	Chemotherapie (n = 9; M = 59)	Bestrahlungstherapie (n = 11; M = 58)	Radio-Chemotherapie (n = 5; M = 14)
MW ± SD	32,7 ± 11	33,8 ± 9,5	34,7 ± 13,5	22,6 ± 8,4	35,7 ± 8,3
Minimum	16	13	8	6	21
Maximum	67	49	75	50	51
Median	31	35	35	21	36
1. Quartil	24,5	26	25	18	30
3. Quartil	40,5	41	39	25,2	42,2
CD8 [%]					
MW ± SD	30,4 ± 8,7	33,9 ± 10,4	37 ± 11,1	36,4 ± 10,4	28 ± 8,9
Minimum	14	14	9	18	13
Maximum	47	62	69	65	44
Median	30	33	38	36	28,5
1. Quartil	24	29	29	29	21,5
3. Quartil	38	42	44	44	35

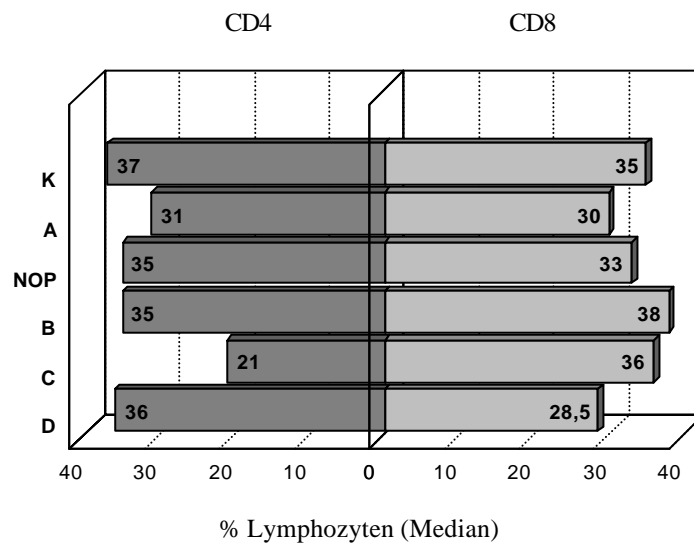


Abb. 25: Vergleich der CD4-Werte (T-Helferzellen) sowie der CD8-Werte (zytotoxische T-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Therapie (A), nach der Operation (NOP), mit Chemotherapie (B), Bestrahlungstherapie (C), kombinierte Radio-Chemotherapie (D) und Kontrollgruppe (K).

Es konnte eine signifikante Absenkung der T-Helferzellpopulationen (T_H) nur bei der Gruppe C im Vergleich zu Kontrollpersonen ($p < 0,001$) beobachtet werden. Gegenüber der Kontrollgruppe waren die CD8-Werte bei den Gruppen A ($p < 0,03$) und D ($p < 0,02$) erniedrigt. Keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen NOP, B und C.

IV. Ergebnisse

Tab.35 : CD4⁺sowie CD8⁺-doppeltpositive-Zellen [%] bei Patientengruppen ohne Therapie, postoperativ, mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie. MW = Mittelwert SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD4 ⁺ CD8 ⁺ [%]	ohne Therapie (n = 7; M = 33)	postoperativ (n = 31; M = 31)	Chemotherapie (n = 9; M = 59)	Bestrahlungstherapie (n = 11; M = 58)	Radio-Chemotherapie (n = 5; M = 14)
MW ± SD	2,5 ± 2,4	1,7 ± 1,1	2,7 ± 1,8	3,2 ± 3,1	1,6 ± 1,2
Minimum	0	0	0	0	0,4
Maximum	13	3,9	9,5	12	5
Median	1,7	1,5	2,2	1,9	1,1
1. Quartil	1,4	0,9	1,3	0,9	0,9
3. Quartil	3,1	2,6	3,9	4,6	2
CD3 [%]					
MW ± SD	52,8 ± 13,9	60,5 ± 15,7	63,6 ± 12,5	50 ± 15,1	57,1 ± 10
Minimum	13	30	31	16	43
Maximum	78	88	86	78	80
Median	51	61	64	51,5	56,5
1. Quartil	45,5	51	54	36,7	47,7
3. Quartil	63	74	74	63	64

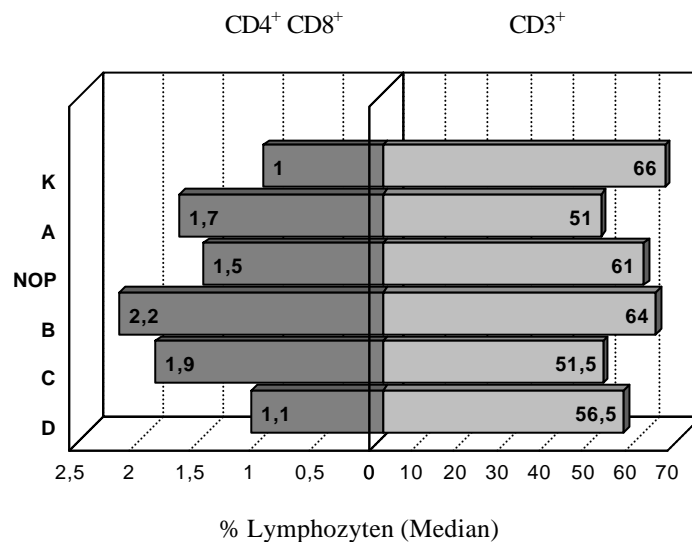


Abb. 26: Vergleich der CD4⁺CD8⁺-Werte (doppeltpositive Zellen) sowie der CD3-Werte (T-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Therapie (A), nach der Operation (NOP), mit Chemotherapie (B), Bestrahlungstherapie (C), kombinierte Radio-Chemotherapie (D) und Kontrollgruppe (K)

Im Vergleich zu Kontrollen kam es bei chemotherapeutisch behandelten Patienten zu einer Verdoppelung der doppeltpositiven CD4⁺ CD8⁺ -Thymozyten von 1% auf 2,2 % (p < 0.001). Sowohl Gruppe A mit 1,7 % (p = 0,001), als auch Gruppe C mit 1,9 % (p < 0,001) wiesen signifikant erhöhte Anteile unreifer T-Zellen auf. Bei den Patienten konnte postoperativ keine nennenswerte Veränderung dieser Population im Vergleich zu Kontrollen gefunden werden. Während bei Patienten der Gruppen NOP und B die CD3-Werte annähernd Normalwerte erreichten, wiesen Patienten der Gruppe A (p < 0,001), C (p < 0,001) und D (p < 0,02) eine signifikante Abnahme der T-Lymphozyten gegenüber den Kontrollen auf.

IV. Ergebnisse

Tab. 36: CD2- sowie CD25-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen ohne Therapie, postoperativ, mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie. MW = Mittelwert SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD2 [%]	ohne Therapie (n = 7; M = 33)	postoperativ (n = 31; M = 31)	Chemotherapie (n = 9; M = 59)	Bestrahlungstherapie (n = 11; M = 58)	Radio-Chemotherapie (n = 5; M = 14)
MW ± SD	72,2 ± 16,2	76 ± 12,1	76,4 ± 9,3	68 ± 12	70,7 ± 8
Minimum	8	49	53	41	57
Maximum	86	94	92	90	89
Median	76	78	77	70,5	70,5
1. Quartil	68,5	67	70	59,2	65,7
3. Quartil	83	86	83	76,2	74,5
CD25 [%]					
MW ± SD	30,8 ± 9,2	26,1 ± 11,8	24,8 ± 9,9	21,3 ± 9,3	31,5 ± 11,1
Minimum	6	5	5	7	9
Maximum	44	45	43	48	44
Median	31	28	25	19	34
1. Quartil	25,5	17	18	14	19,5
3. Quartil	38,5	37	34	27	40,2

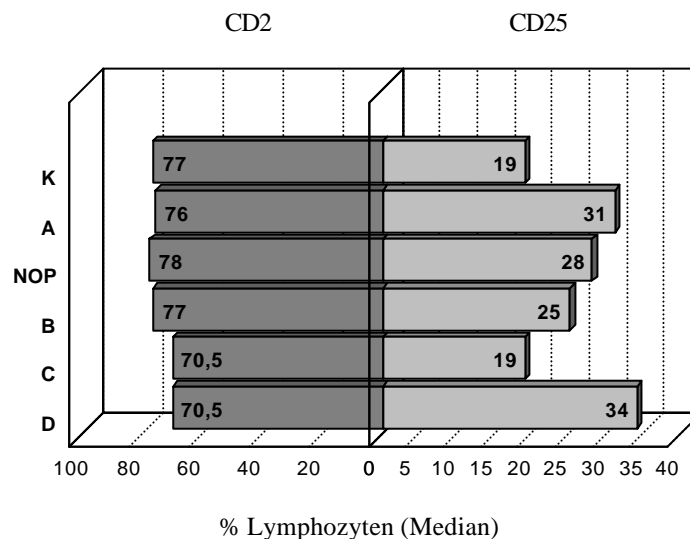


Abb. 27: Vergleich der CD2-Werte (Pan T-Zellen, NK-Zellen) sowie der CD25-Werte (IL-2R α) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. Patienten ohne Therapie (A), nach der Operation (NOP), mit Chemotherapie (B), Bestrahlungstherapie (C), kombinierte Radio-Chemotherapie (D) und Kontrollgruppe (K).

Ein Vergleich mit der Kontrollgruppe ergab für Gruppe C ($p < 0,001$) und Gruppe D ($p < 0,03$) signifikant verringerte CD2-Werte, während Gruppe NOP, A und B Normalwerte erreichten. Eine signifikante Zunahme der IL-2R α -Expression im Vergleich zum Kontrollkollektiv konnte bei Patienten der Gruppen NOP ($p = 0,004$), A ($p < 0,001$), B ($p = 0,002$) und D ($p < 0,001$) gefunden werden. Patienten unter Bestrahlungstherapie zeigten keine Veränderungen gegenüber den Kontrollwerten.

IV. Ergebnisse

Tab.37 : CD2⁻CD25⁺- einfachpositive- sowie doppeltpositive CD2⁺CD25⁺-Zellen [%] bei Patientengruppen ohne Therapie, postoperativ, mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD2 ⁺ CD25 ⁺ [%]	ohne Therapie (n = 7; M = 33)	postoperativ (n = 31; M = 31)	Chemotherapie (n = 9; M = 59)	Bestrahlungstherapie (n = 11; M = 58)	Radio-Chemotherapie (n = 5; M = 14)
MW ± SD	26,4 ± 8,7	22,2 ± 10,2	20,7 ± 8,5	17,1 ± 8,2	26,3 ± 8,9
Minimum	5	4	3	5	6
Maximum	39	40	38	44	36
Median	27	23	20	16	29,5
1. Quartil	21,5	13	14	11	18,5
3. Quartil	33,5	30	27	21	33
CD2 ⁻ CD25 ⁺ [%]					
MW ± SD	4,5 ± 2	3,9 ± 2,9	4,1 ± 2,7	4,2 ± 2,5	5,1 ± 2,8
Minimum	1	1	0	0	1
Maximum	8	13	12	11	9
Median	4	4	4	4	6
1. Quartil	3	2	2	2	2
3. Quartil	6	4	6	6	7,2

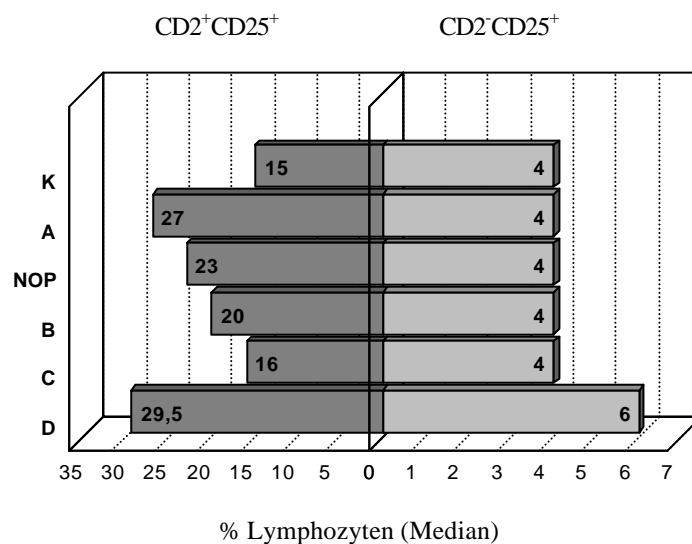


Abb. 28: Vergleich der CD2⁻CD25⁺-Werte (IL-2R α auf B-Zellen) sowie der CD2⁺CD25⁺-Werte (IL-2R α auf T-Zellen und NK-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen: Patienten ohne Therapie (A), nach der Operation (NOP), mit Chemotherapie (B), Bestrahlungstherapie (C), kombinierte Radio-Chemotherapie (D) und und Kontrollgruppe (K)

Der Anteil IL-2R α -positiver T-Lymphozyten war im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei Patienten der Gruppe NOP ($p = 0,001$), B ($p = 0,001$), D ($p < 0,001$) und A ($p < 0,001$) statistisch signifikant erhöht. Die Gruppe C blieb mit einem Median von 16 % im Normbereich. Für die IL-2R α -positiven B-Lymphozyten konnte zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

IV. Ergebnisse

Tab. 38: CD19- sowie CD56-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen ohne Therapie, postoperativ, mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD19 [%]	ohne Therapie (n = 7; M = 33)	postoperativ (n = 31; M = 31)	Chemotherapie (n = 9; M = 59)	Bestrahlungs- therapie (n = 11; M = 58)	Radio-Chemo- therapie (n = 5; M = 14)
MW ± SD	7 ± 4,8	9 ± 5,9	8,8 ± 5,5	9,4 ± 7,9	9,6 ± 5,9
Minimum	1	2	2	1	3
Maximum	19	24	26	36	21
Median	5	8	8	8	8
1. Quartil	3	4	4	3	5,2
3. Quartil	11	13	11	12,5	12,5
CD56 [%]					
MW ± SD	31,2 ± 11,1	26,7 ± 11,7	27,1 ± 10,9	29,7 ± 11,7	25,5 ± 6,3
Minimum	9	6	6	5	15
Maximum	48	54	56	58	38
Median	29	26	26	29,5	26,5
1. Quartil	26,5	18	20	21,7	19
3. Quartil	41	32	34	38,2	29,2

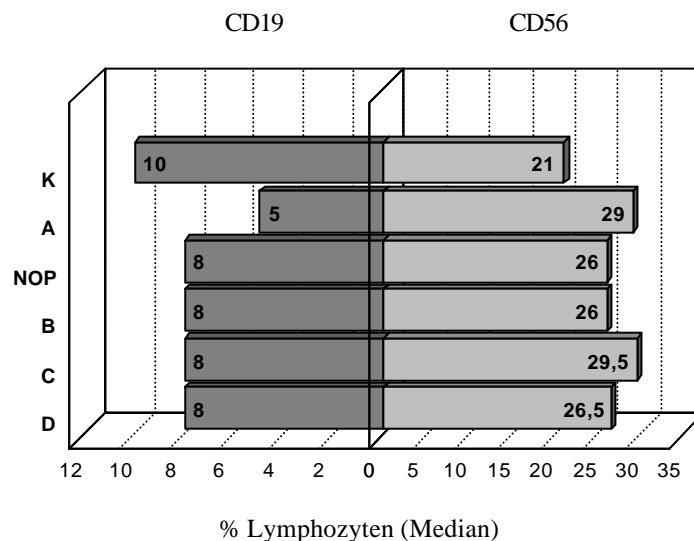


Abb. 29: Vergleich der CD19-Werte (B-Zellen) sowie der CD56-Werte (NK-Zellen) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen. ohne Therapie (A), nach der Operation (NOP), mit Chemotherapie (B), Bestrahlungstherapie (C), kombinierte Radio-Chemotherapie (D) und Kontrollgruppe (K).

Es konnte im Vergleich zu den Kontrollen eine starke Minderung des B-Lymphozytenanteils bei Patienten ohne Therapie ($p = 0,002$) und eine leichte Erniedrigung bei Patienten unter Bestrahlungstherapie ($p = 0,03$) festgestellt werden. Keine signifikanten Unterschiede konnten für die Gruppen NOP, B und D gefunden werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine Erhöhung der NK-Zellpopulation bei den Gruppen A ($p < 0,001$), B ($p < 0,009$) und C ($p < 0,001$) gemessen. Die Gruppen NOP und D unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

IV. Ergebnisse

Tab. 39: CD45- sowie HLA-DR-positive-Zellen [%] bei Patientengruppen: ohne Therapie, postoperativ, mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

CD45 [%]	ohne Therapie (n = 7; M = 33)	postoperativ (n = 31; M = 31)	Chemotherapie (n = 9; M = 59)	Bestrahlungstherapie (n = 11; M = 58)	Radio-Chemotherapie (n = 5; M = 14)
MW ± SD	94,3 ± 8,4	94,5 ± 7,1	95 ± 8,5	92,9 ± 7,7	95,8 ± 4,8
Minimum	63	71	54	73	84
Maximum	100	100	100	100	100
Median	98	97	98	96	97,5
1. Quartil	94	92	94	90,7	93,7
3. Quartil	99	99	99	98	99
HLA-DR [%]					
MW ± SD	19,3 ± 7	18,6 ± 5,2	17,4 ± 7,2	21,3 ± 8,5	21,5 ± 5,4
Minimum	9	9	6	7	14
Maximum	50	29	44	42	31
Median	19	18	17	21	21,5
1. Quartil	15,5	15	12	14,7	17
3. Quartil	21	22	22	27,2	25,5

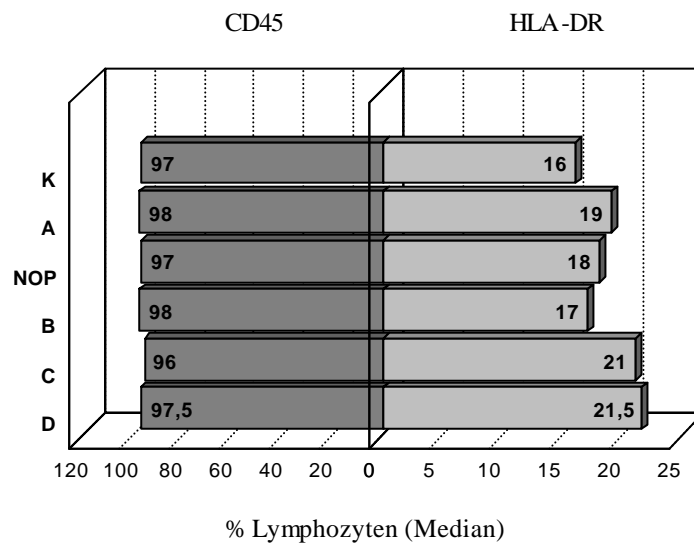


Abb. 30: Vergleich der CD45-Werte (Pan-Leukozyten) sowie der HLA-DR (MHC-Klasse-II-Komplex) zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen: Patienten ohne Therapie (A), nach der Operation (NOP), mit Chemotherapie (B), Bestrahlungstherapie (C), kombinierte Radio-Chemotherapie (D) und Kontrollgruppe (K).

Keine signifikanten Unterschiede der CD45-Werte der Patientengruppen konnten im Vergleich zum Kontrollkollektiv festgestellt werden. Wie in der Tabelle ersichtlich, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der HLA-DR-Werte bei den Gruppen A ($p < 0,03$), C ($p < 0,001$) und D ($p = 0,005$) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

IV. Ergebnisse

Tab. 40: LAK-Zell- sowie NK-Zellaktivität [Zielzell-Lyse %] bei Patientengruppen ohne Therapie, postoperativ, mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Patienten; M = Messwerte

LAK-Zellaktivität [%]	ohne Therapie (n = 7; M = 33)	postoperativ (n = 31; M = 31)	Chemotherapie (n = 9; M = 59)	Bestrahlungstherapie (n = 11; M = 58)	Radio-Chemotherapie (n = 5; M = 14)
MW ± SD	16,9 ± 18	13,8 ± 12,3	10,8 ± 11,6	13,6 ± 15,8	21 ± 15,2
Minimum	0	1	0	0	0
Maximum	72	62	59	83	46
Median	12	11	7	8	15,5
1. Quartil	4,5	6	4	2,7	10
3. Quartil	23,5	16	13	17,2	35,7
NK-Zellaktivität [%]					
MW ± SD	54,9 ± 28,7	58,7 ± 21,8	56,5 ± 26,7	52,9 ± 28,8	51 ± 25,2
Minimum	1	16	5	4	0
Maximum	100	94	100	100	89
Median	62	61	57	56	50,5
1. Quartil	28,5	42	33	26	34,5
3. Quartil	80	78	78	77,5	75,5

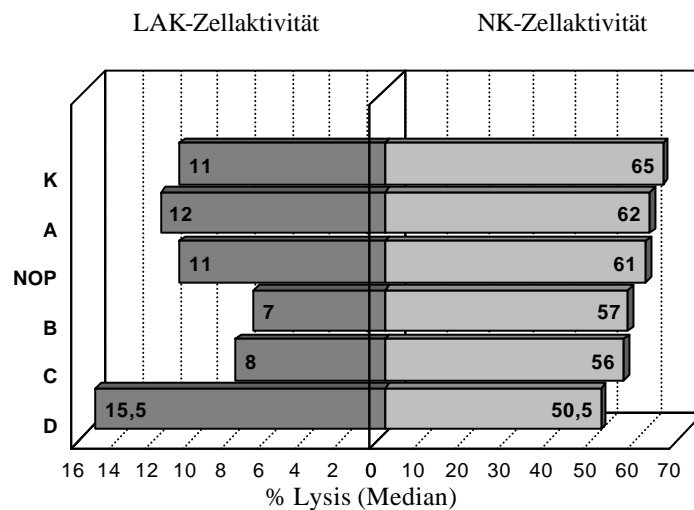


Abb. 31: Vergleich der LAK-Zell- sowie der NK-Zellaktivität zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen Patienten ohne Therapie (A), nach der Operation (NOP), mit Chemotherapie (B), Bestrahlungstherapie (C), kombinierte Radio-Chemotherapie (D) und Kontrollgruppe (K).

Periphere Blutlymphozyten von Patienten unter Chemotherapie ($p= 0,02$) zeigten eine stärkere LAK-Zellaktivität als Lymphozyten von Kontrollpersonen. Die Werte der anderen Therapiegruppen blieben im Normbereich. Eine veränderte NK-Zellaktivität wurde bei keiner Patientengruppe beobachtet.

4. Interleukin-2 Spiegel

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob die Interleukin-2-Konzentration durch bestimmte Tumorstadien und verschiedene Therapiemodalitäten verändert wird.

4.1 Interleukin-2 Spiegel bei Tumorpatienten

Tab. 41: Interleukin-2-Konzentration [pg/ml] bei Kontrollen und Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes. MW = Mittelwert; SD= Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

IL-2 [pg/ml]	Kontrollpersonen (n = 4; M =16)	Tumor-Patienten (n = 7; M = 26)
MW ± SD	25,3 ± 9,5	24 ± 12,5
Minimum	13,7	3,8
Maximum	45,8	65,6
Median	23,6	23,6
1. Quartil	16,8	18
3. Quartil	33,5	26

Tab. 42: Interleukin-2-Konzentration [pg/ml] bei Kontrollen und Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes in Abhängigkeit vom Tumorstadium. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

IL-2 [pg/ml]	Kontrollpersonen (n = 4; M =16)	T3-T4 (n = 5; M = 7)	G2 (n =4; M = 5)	mit Lymphknotenmetastasen (n = 6; M = 8)
MW ± SD	25,3 ± 9,5	28,8 ± 3,4	22,1 ± 3,7	20,2 ± 7,4
Minimum	13,7	16,2	16,2	3,8
Maximum	45,8	26	26	26
Median	23,6	23,6	23,6	23,6
1. Quartil	16,8	21,1	18,7	16
3. Quartil	33,5	26	24,8	25,4

Tab. 43: Interleukin-2-Konzentration [pg/ml] bei Kontrollen und Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes unter Einfluß verschiedene Therapiemodalitäten. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M =Anzahl der Messwerte.

IL-2 [pg/ml]	Kontrollpersonen (n = 4 ; M =16)	postoperativ (n = 7; M = 7)	Chemotherapie (n = 5; M = 7)	Bestrahlungstherapie (n = 2; M = 3)
MW ± SD	25,3 ± 9,5	21,1 ± 9,3	26,4 ± 18,8	35,9 ± 11,3
Minimum	13,7	6,3	6,3	26
Maximum	45,8	35,9	65,6	48,3
Median	23,6	21,1	23,6	33,5
1. Quartil	16,8	13,7	16,2	26
3. Quartil	33,5	26	28,5	48,3

Bei der Gegenüberstellung der Kontrollpersonen und der HNO-Tumorpatienten zeigten sich keine Unterschiede in der IL-2-Konzentration. Auch blieben die Werte der Patienten durch bestimmte Tumorstadien und Therapiemodalitäten unbeeinflusst.

4.2. Interleukin-2 Spiegel und Besonderheiten des Kontrollkollektivs

Tab. 44: Interleukin-2-Konzentrationen [pg/ml] innerhalb des Kontrollkollektivs. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

IL-2 [pg/ml]	Kontrollpersonen Insgesamt (n = 6; M = 23)	Kontrollpersonen (n = 4; M = 16)	Personen mit bekannte chronische Entzündung (n = 2; M = 7)
MW ± SD	52,7 ± 45,4	25,3 ± 9,5	115,4 ± 27,1
Minimum	13,7	13,7	80,5
Maximum	147,3	45,8	147,3
Median	33,5	23,6	112,6
1. Quartil	18,6	16,8	85,2
3. Quartil	85,2	33,5	144,8

Bei zwei Kontrollen (M = 7) konnte ein deutlich höherer Interleukin-2-Spiegel im Vergleich zu den anderen Kontrollwerten ($p < 0,001$) gefunden werden. Diese Kontrollpersonen litten nach eigenen Angaben an einer chronischen Entzündung. Da die Werte durch die Personen mit chronischer Entzündung stark beeinflusst wurden, erschien es sinnvoll, sie bei diesen Untersuchungen aus dem Kontrollkollektiv auszuschließen.

4.3. Interleukin-2 Spiegel im zeitlichen Verlauf

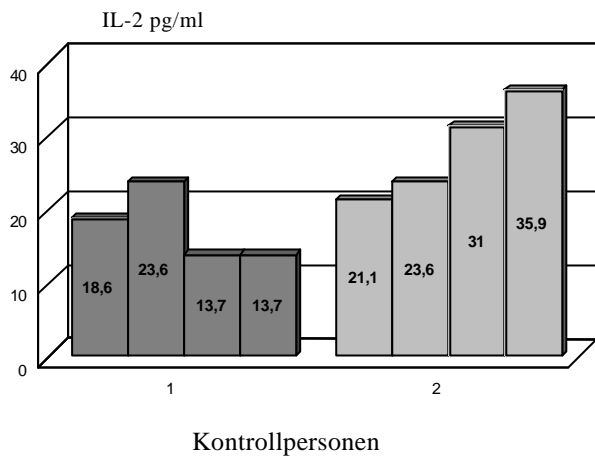


Abb. 32: IL-2 Profil im Verlauf: Kontrolle 1 und Kontrolle 2 ohne bekannte chronische Entzündung an vier Messtagen

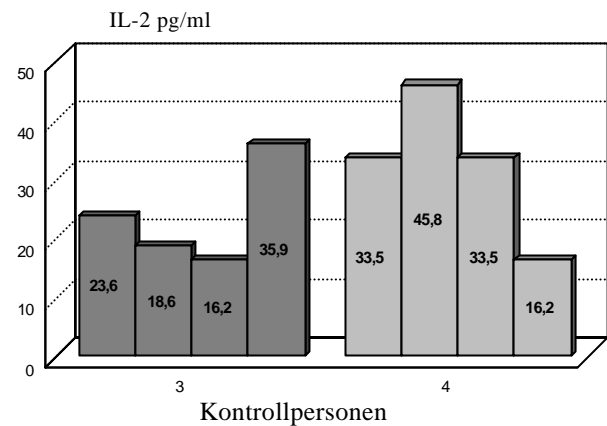


Abb. 33: IL-2 Profil im Verlauf: Kontrolle 3 und Kontrolle 4 ohne bekannte chronische Entzündung an vier Messtagen

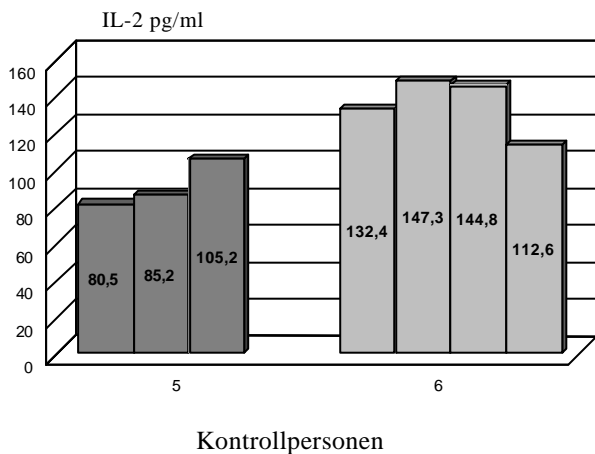


Abb. 34: IL-2 Profil im Verlauf: Kontrolle 5 und Kontrolle 6 mit bekannter chronischer Entzündung an drei bzw. vier Messtagen

Jede Kontrolle zeigte ein individuelles IL-2-Profil, welches um einen bestimmten Mittelwert schwankte. $K1 = 17,3 \text{ pg/ml}$, $K2 = 27,9 \text{ pg/ml}$, $K3 = 23,5 \text{ pg/ml}$, $K4 = 32,2 \text{ pg/ml}$, $K5 = 90,3 \text{ pg/ml}$, $K6 = 134,2 \text{ pg/ml}$. Die Erhöhung der IL-2-Werte innerhalb eines Profil läßt auf eine Infektion schließen.

IV. Ergebnisse

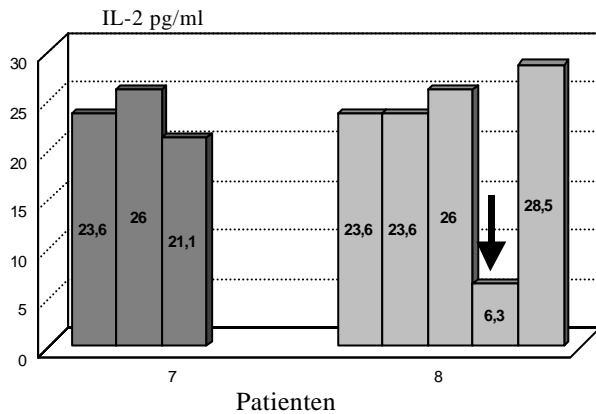


Abb. 35: IL-2 Profil im Verlauf: Patient 7 und Patient 8, drei bzw. fünf Messtage. Pfeil: Radiotherapie

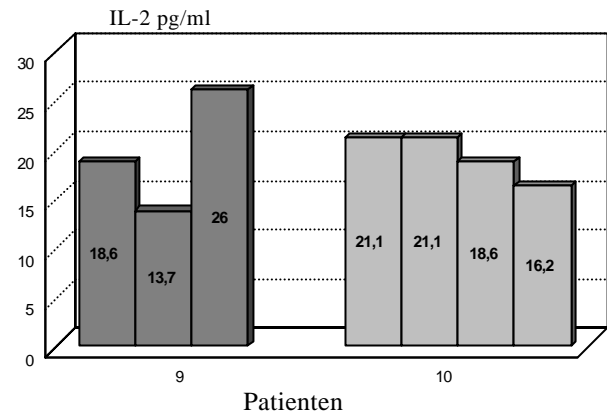


Abb. 36: IL-2 Profil im Verlauf: Patient 9 und Patient 10, drei bzw. vier Messtage

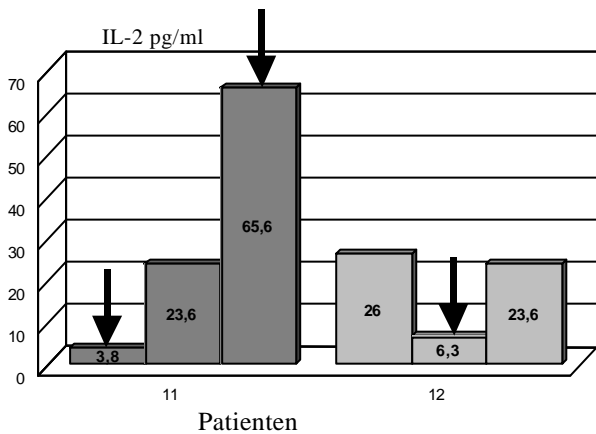


Abb. 37: IL-2 Profil im Verlauf: Patient 11 und Patient 12, drei Messtage. Pfeil von links nach rechts. Operation, Chemotherapie, Radiotherapie

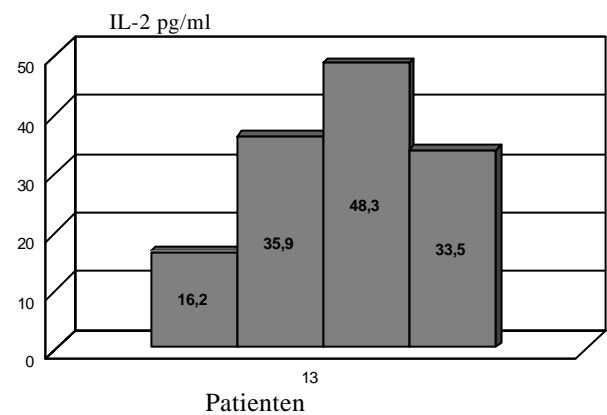


Abb. 38: IL-2 Profil im Verlauf: Patient 13, vier Messtage

Die individuellen IL-2-Profile der HNO-Patienten schwankten um folgenden Werte: P7 = 24,3 pg/ml P8 = 21,1 pg/ml, P9 = 19,4 pg/ml, P10 = 19,2 pg/ml, P11= 31 pg/ml, P12 = 18,3 pg/ml und P13 = 39,2 pg/ml. Die IL-2 Verlaufsprofile bei HNO-Tumorpatienten zeigten durch operative Eingriffe, Chemotherapie und Betrahlungstherapie drastische Veränderungen.

5. Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α

Tab. 45: Löslicher IL-2R α (sIL-2R α)- Konzentration [U/ml] bei Patientengruppen mit zunehmender Größe des - T3). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; M = Anzahl der Messwerte

sIL-2R α [U/ml]	Kontrollpersonen (n = 10; M = 34)	T1 - T2 (n = 6; M = 6)	T3 (n = 5; M = 5)
MW \pm SD	738 \pm 196	686 \pm 93	1294 \pm 166
Minimum	437	571	1079
Maximum	1094	788	1459
Median	694	698	1336
1. Quartil	615	591	1122
3. Quartil	844	771	1445

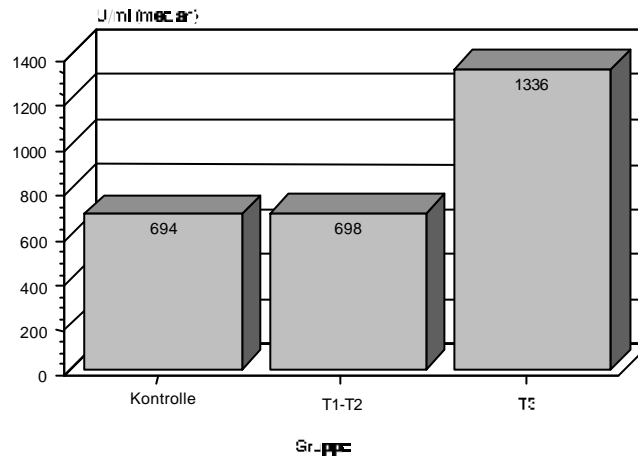


Abb. 39: sIL-2R α [U/ml] bei Patientengruppen mit zunehmender Größe des Primärtumors. Median-Werte

Eine signifikante Erhöhung der sIL-2R α -Konzentration gegenüber den Kontrollpersonen wurde bei Patienten mit Primärtumoren der Größe T1 - T2 ($p < 0,005$) trotz ähnlicher Medianwerte gefunden. Die Erhöhung der Werte bei der Gruppe T3 gegenüber den Kontrollen konnte ebenfalls statistisch abgesichert werden ($p < 0,001$).

IV. Ergebnisse

Tab. 46: sIL-2R α -Konzentration [U/ml] bei Patientengruppen mit zunehmenden Malignitätsgrad (G1 - G3). MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

sIL-2R α [U/ml]	Kontrollpersonen (n = 10; M = 34)	G1 (n = 3; M = 3)	G2 (n = 4; M = 4)	G3 (n = 4; M = 4)
MW \pm SD	738 \pm 196	1122 \pm 456	941 \pm 346	865 \pm 300
Minimum	437	598	750	571
Maximum	1094	1432	1459	1165
Median	694	1336	777	862
1. Quartil	615	598	754	590
3. Quartil	844	1432	1291	1143

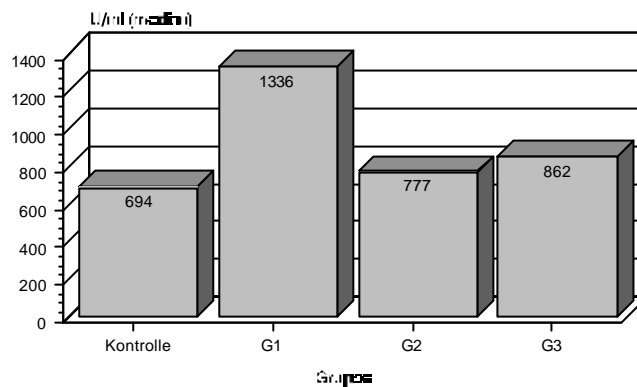


Abb.40 : sIL-2R α [U/ml] bei Patientengruppen mit zunehmenden Malignitätsgrad. Median-Werte

Höhere Konzentrationen des löslichen IL-2R α wurden bei Patienten mit einem Tumormalignitätsgrad G1 im Vergleich zu Kontrollpersonen gefunden. Der Befund ließ sich aber nicht statistisch absichern.

IV. Ergebnisse

Tab. 47: sIL-2R α -Konzentration [U/ml] bei Patientengruppen ohne Lymphknotenmetastasen und mit Lymphknotenmetastasen. n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

sIL-2R α [U/ml]	Kontrollpersonen (n = 10; M = 34)	ohne Lymphknotenmetastasen (n = 6; M = 6)	mit Lymphknotenmetastasen (n = 5; M = 5)
MW \pm SD	738 \pm 196	1057 \pm 392	850 \pm 262
Minimum	437	598	571
Maximum	1094	1459	1165
Median	694	1051	788
1. Quartil	615	712	609
3. Quartil	844	1439	1122

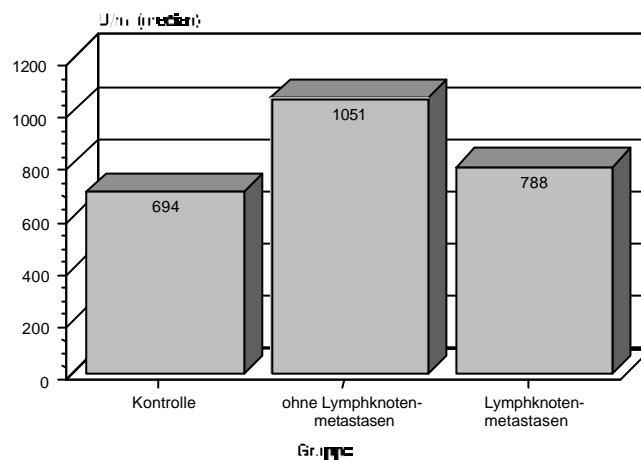


Abb. 41: sIL-2R α [U/ml] bei Patientengruppen, ohne Lymphknotenmetastasen und mit Lymphknotenmetastasen. Median-Werte

Weder Patienten mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen zeigten statistisch signifikante Unterschiede der IL-2 Konzentration im Vergleich zu den Kontrollpersonen.

IV. Ergebnisse

Tab. 48: sIL-2R α -Konzentration [U/ml] bei Patientengruppen, ohne Therapie und unter verschiedenen Therapiearten. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

sIL-2R α [U/ml]	Kontroll- personen (n = 10; M = 34)	ohne Therapie (n = 5; M = 7)	postoperativ (NOP) (n = 11; M = 11)	Chemo- therapie (n = 7; M = 25)	Bestrahlun- gstherapie (n = 5; M = 24)	Radio- Chemo- therapie (n = 2; M = 4)
MW \pm SD	738 \pm 196	1205 \pm 464	1115 \pm 387	1254 \pm 577	861 \pm 43	1027 \pm 46
Minimum	437	735	706	395	525	979
Maximum	1094	1729	1886	2158	1381	1073
Median	694	969	1058	1400	840	1027
1. Quartil	615	802	802	676	636	983
3. Quartil	844	1702	1430	1828	1070	1069

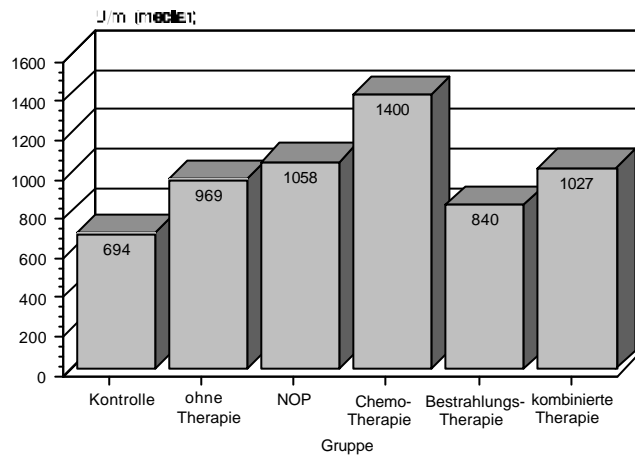


Abb. 42: sIL-2R α [U/ml] bei Patientengruppen: ohne Therapie und unter verschiedenen Therapiearten. Median-Werte

Im Plasma der Patienten wurden erhöhte Konzentrationen von löslichem IL-2R α nach der Operation ($p < 0,001$) und unter dem Einfluß von Chemo- ($p < 0,002$), Bestrahlungs- ($p = 0,05$) und kombinierter- ($p = 0,005$) Radio-Chemotherapie im Vergleich zu Kontrollpersonen gefunden. Auch die Werte der Patienten ohne Therapie ($p < 0,003$) lagen höher als die der Kontrollen.

5.1. Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α und Besonderheiten des Kontrollkollektivs

Tab. 49: unterschiedliche lösliche Interleukin-2-Rezeptor α (sIL-2R α)-Konzentrationen [U/ml] innerhalb des Kontrollkollektivs. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

sIL-2R α [U/ml]	Kontrollpersonen Insgesamt (n = 12; M = 47)	Kontrollpersonen (n = 10; M = 34)	Personen mit bekannter chronischer Entzündung (n = 2; M = 13)
MW \pm SD	1416 \pm 1140	738 \pm 196	3111 \pm 565
Minimum	437	437	2366
Maximum	4171	1094	4171
Median	795	694	2995
1. Quartil	642	615	2626
3. Quartil	2510	844	3611

Ähnlich wie der Interleukin-2-Spiegel war die sIL-2R α -Konzentrationen bei zwei Kontrollpersonen gegenüber den anderen Probanden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ erhöht. Da diese Personen eine chronische Entzündung hatten und diese Eigenschaft die gesamten Werte des Kontrollkollektivs beeinflussten, wurden sie nicht in der Auswertung berücksichtigt.

6. Korrelationsanalysen

Tab. 50: Korrelation der PBL-Phänotypen sowie der NK-Zell- und der LAK-Zellaktivität untereinander bei den Kontrollpersonen. Leeres Feld = keine Korrelation. Die Tabelle berücksichtigt nur vorhandenen Korrelationen.

	CD8	CD3	CD19	CD56	CD2	CD25	CD2- CD25+	CD45	HLA-DR	LAK- Zellaktivität	NK-Zell- Aktivität
CD4	r = 0,7 p < 0,001	r = 0,7 p < 0,001		r = -0,7 p < 0,001	r = 0,4 p < 0,001	r = 0,4 p < 0,001					
CD8		r = -0,4 p < 0,001		r = 0,6 p < 0,01			r = 0,3 p < 0,001				
CD3			r = -0,3 p < 0,01	r = -0,6 p < 0,001	r = 0,7 p < 0,001		r = -0,4 p < 0,001		r = -0,4 p < 0,001	r = 0,3 p < 0,03	r = 0,2 p < 0,03
CD19					r = 0,4 p < 0,001				r = 0,6 p < 0,01		
CD56					r = -0,3 p < 0,007						
CD2							r = -0,3 p < 0,01		r = -0,4 p < 0,001		
CD25								r = 0,2 p < 0,04			
CD2+ CD25+						r = 1 p < 0,001	r = 0,5 p < 0,001	r = 0,2 p < 0,05			
CD45											r = 0,2 p < 0,04
LAK-Zell- aktivität											r = 0,6 p < 0,001

Tab. 51: Korrelation der PBL-Phänotypen untereinander bei Patientengruppen ohne Therapie, postoperativ, mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie, kombinierte Radio-Chemotherapie. Leeres Feld = keine Korrelation. Die Tabelle berücksichtigt nur vorhandenen Korrelationen.

	CD3	CD19	CD56	CD25	CD2
Operation					
CD2+CD25+				r = 0,97 p < 0,001	
Chemotherapie					
CD4+ CD8+			r = 0,5 p < 0,001		
Radio-Chemotherapie					
CD3					r = 0,7 p = 0,001
Bestrahlungstherapie					
CD4	r = 0,5 p < 0,001		r = -0,5 p = 0,001		
CD3		r = -0,4 p < 0,001			
CD56	r = -0,3 p = 0,02				
Ohne Therapie					
CD8			r = 0,5 p < 0,006		
CD3		r = -0,3 p < 0,05			
CD2+ CD25+	r = 0,5 p = 0,004				

IV. Ergebnisse

Tab. 52: Korrelation der IL-2-Plasmakonzentration mit PBL-Phänotypen und der NK- sowie der LAK-Zellaktivität. Leeres Feld = keine Korrelation. Die Tabelle berücksichtigt nur vorhandene Korrelationen. Da bei den Patientengruppen unter Bestrahlungstherapie und G2 zu wenig Messwerte vorhanden waren, konnten für diese keine Korrelationsanalysen durchgeführt werden.

	CD8	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD3	CD19	CD56	NK-Zell-Aktivität	LAK-Zell-Aktivität
Kontrollpersonen (n = 4; M = 16)				r = 0,5 p = 0,05			
Personen mit bekannter chronischer Entzündung (n = 2; M = 7)	r = 0,75 p = 0,05					r = 0,89 p = 0,02	r = 0,89 p = 0,02
mit Lymphknotenmetastasen (n = 6; M = 8)			r = 0,97 p = 0,02		r = - 0,97 p = 0,02		
Chemotherapie (n = 5; M = 7)		r = 0,74 p = 0,05					

Tab. 53: Korrelation des sIL-2R α mit PBL-Phänotypen und der NK-Zellaktivität. Leeres Feld = keine Korrelation. Die Tabelle berücksichtigt nur vorhandene Korrelationen. Da bei den Patientengruppen G1 und kombinierte Radio-Chemotherapie zu wenig Messwerte vorhanden waren, konnten für diese keine Korrelationsanalysen durchgeführt werden. n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte; RD = Rezeptordichte

	CD8	CD3	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD19	CD56	CD45	CD2 ⁺ CD25 ⁺	CD2 ⁻ CD25 ⁺	CD25	CD25 RD	NK-Zell-Aktivität
Kontrollpersonen (n = 10; M = 34)				r = - 0,4 p < 0,02		r = - 0,3 p < 0,05					
Personen mit chronischer Entzündung (n = 2; M = 13)	r = - 0,7 p = 0,02		r = - 0,6 p = 0,05								
Tumorgroße T1 - T2 (n = 5, M = 5)										r = -1 p = 0,02	
mit Lymphknotenmetastasen (n = 5; M = 5)	r = - 0,9 p = 0,02										
ohne Therapie (n = 5; M = 7)		r = 0,9 p = 0,02			r = - 0,8 p = 0,05						
Chemotherapie (n = 7; M = 25)	r = 0,4 p = 0,05	r = 0,6 p = 0,01			r = - 0,6 p = 0,01						
Bestrahlungstherapie (n = 5; M = 24)		r = 0,6 p = 0,01		r = 0,5 p = 0,02	r = - 0,4 p = 0,05		r = 0,5 p = 0,02		r = 0,5 p = 0,02	r = 0,5 p = 0,02	r = - 0,5 p = 0,05

7. Untersuchung immunkompetenter Zellen innerhalb des Tumors und im peripheren Blut

7.1. Lymphozyten-Infiltrate im Primärtumor und metastasierten Lymphknoten

Tab. 54: Leukozyten und T-Zell-Subpopulationen [%] im Primärtumor bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

n = 6; M = 6	MW ± SD	Minimum	Maximum	Median	1. Quartil	3. Quartil
CD45	7 ± 6,8	2,3	20,5	4,2	3,1	10,5
CD3	8 ± 6,3	0	18	7,4	2,7	13
CD8	12,4 ± 2,2	9,8	15,2	12,4	9,9	14,7
HLA-DR	3,3 ± 2	0	5,4	3,2	1,9	5,3

Tab. 55: Leukozyten und T-Zell-Subpopulationen [%] im metastasierten Lymphknoten bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

n = 8; M = 8	MW ± SD	Minimum	Maximum	Median	1. Quartil	3. Quartil
CD45	13,8 ± 8,2	0	27,7	14,5	8,8	18,7
CD3	15,6 ± 4	9,2	21,9	16	12,5	18,7
CD8	10,3 ± 4,8	4,9	18	8,4	6,2	14,9
HLA-DR	3,3 ± 3,4	0	10,7	2,1	1,3	5

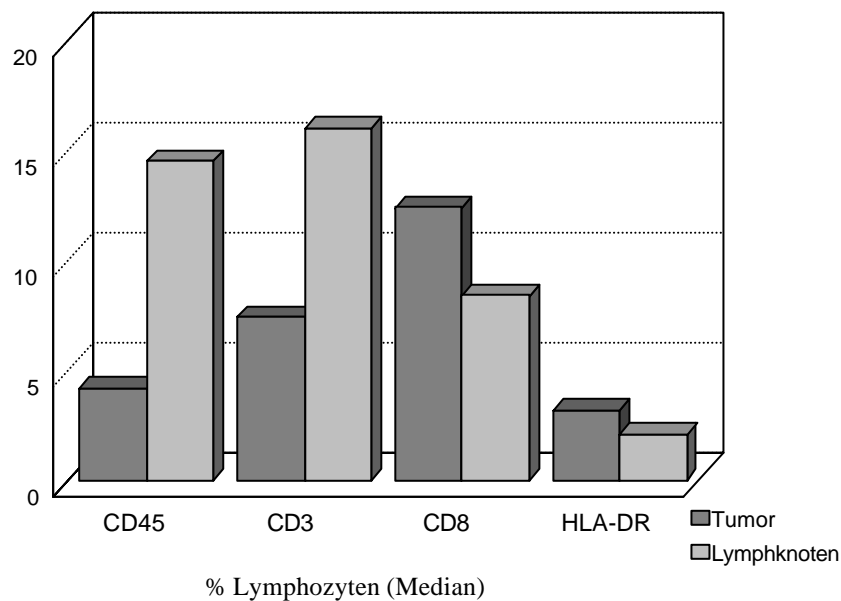


Abb. 43: Anteile [%] der in den Primärtumor- und metastasierten Lymphknoten infiltrierten Lymphozyten mit CD45-, CD3-, CD8-, HLA-DR-Oberflächenmarker. Medianwerte [siehe Auswertung III.4.5.7.]

Im Primärtumor konnte im Vergleich zu metastasierten Lymphknoten eine starke Erniedrigung der CD3-positiven Zellen ($p < 0,03$) festgestellt werden. Die in der Graphik gezeigte Erhöhung der Median-Werte für CD8 und HLA-DR, sowie die Erniedrigung der CD45-Population im Primärtumor war gegenüber den Werten der Lymphknotenmetastasen nicht signifikant.

7.2. Periphere Blutlymphozyten bei Patienten mit Primärtumor und Lymphknotenmetastasen

Tab. 56: Leukozyten und T-Zell-Subpopulationen [%] im peripheren Blut bei Kontrollpersonen. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

n = 10; M = 101	MW ± SD	Minimum	Maximum	Median	1. Quartil	3. Quartil
CD45	95,8 ± 4,2	80	100	97	94	98
CD3	65,1 ± 10,8	30	84	66	59,5	73
CD8	34,8 ± 8,1	16	56	35	28	41
HLA-DR	16,8 ± 6,3	6	47	16	13	19,5

Tab. 57: Leukozyten und T-Zell-Subpopulationen [%] im peripheren Blut bei Patienten mit Primärtumor ohne Metastasen. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

n = 6; M = 6	MW ± SD	Minimum	Maximum	Median	1. Quartil	3. Quartil
CD45	93,5 ± 1,6	92	95	93,5	92	95
CD3	75 ± 1	74	76	75	74	76
CD8	40 ± 24	18	62	40	18	62
HLA-DR	17,5 ± 6	12	23	17,5	12	23

Tab. 58: Leukozyten und T-Zell-Subpopulationen [%] im peripheren Blut bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen. MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

n = 8; M = 8	MW ± SD	Minimum	Maximum	Median	1. Quartil	3. Quartil
CD45	97,1 ± 2,5	93	100	98	95	99
CD3	64,6 ± 14,4	36	75	72,5	53,2	74
CD8	31,1 ± 10,7	18	47	31	19,7	39,7
HLA-DR	22,9 ± 11,5	15	50	20,5	15,2	23

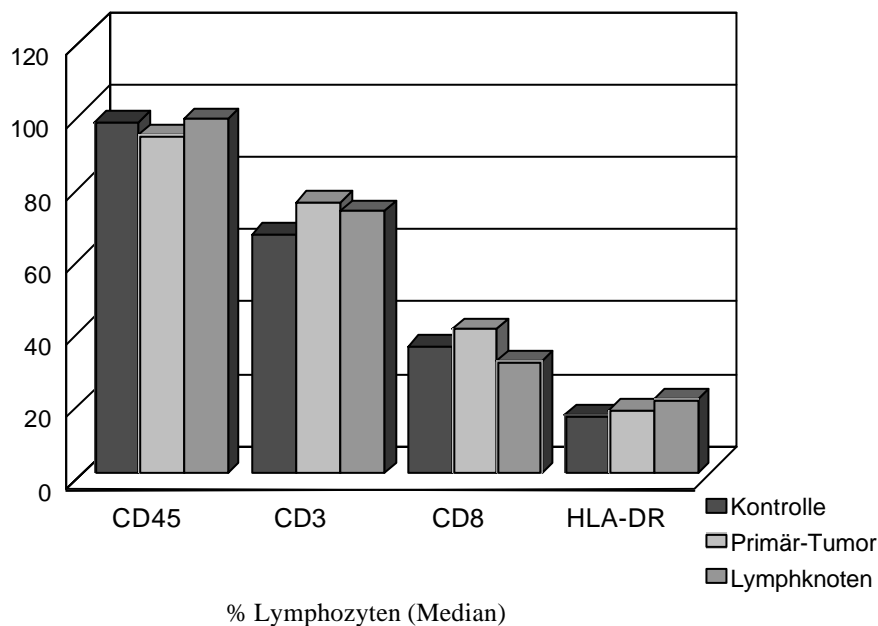


Abb. 44: Anteile [%] der im peripheren Blut zirkulierende Lymphozyten mit CD45-, CD3-, CD8-, HLA-DR-Oberflächenmarker. Von links nach rechts jeweils Kontrolle (dunkel Säule), Patienten mit Primärtumor (hellgrau), Patienten zusätzlich mit Lymphknotenmetastasen (mittelgrau). [siehe Auswertung III.4.5.7.]

Der Anteil CD3-positiver PBL war bei Patienten mit Primärtumor signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen ($p < 0,008$). Die CD45-Werte hingegen waren bei diesen Patienten signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrollen ($p < 0,02$). Patienten mit Lymphknotenmetastasen hatten eine signifikant erhöhte HLA-DR-Expression auf PBL ($p < 0,05$) gegenüber den Kontrollen.

Die CD3-Werte der Gruppe Primärtumor waren signifikant erhöht gegenüber der Patientengruppe mit Lymphknotenmetastasen ($p = 0,04$). Bei den Letztgenannten war der Anteil CD45-positiver PBL signifikant höher, als bei Patienten mit Primärtumor ($p < 0,02$). Für die Marker CD8 und HLA-DR konnte zwischen diesen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

7.3. Korrelationsanalysen

Tab. 59a: Korrelation der Phänotypen CD45, CD3, CD8 und HLA-DR zwischen PBL und tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) bei Patienten nur mit Primärtumor. Leere Felder = keine Korrelation; n = Anzahl der Probanden; M = Anzahl der Messwerte

Patienten mit Primärtumor	CD45	CD3	CD8	HLA-DR
PBL – TIL (n = 6; M = 6)	r = 0,9 p = 0,05			

Tab. 59b: Korrelation der Phänotypen CD45, CD3, CD8 und HLA-DR zwischen PBL und Lymphknotenmetastaseninfiltrierenden Lymphozyten (LNML) bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen. Leere Felder = keine Korrelation; n = Anzahl der Probanden M = Anzahl der Messwerte

Patienten mit Lymphknotenmetastasen	CD45	CD3	CD8	HLA-DR
PBL – LNML (n = 8; M = 8)				

V. Diskussion

1. Methoden

1.1. Europiumfreisetzungstest

Die übliche Standardmethode zur Messung der zytotoxischen Aktivität von Makrophagen, CTL-, NK- und LAK-Zellen ist der $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest, der von Brunner et al. (1968) entwickelt wurde. Dieser Methode liefert akzeptable Ergebnisse, ist aber mit dem Problem des Umgangs mit einem radioaktiven Isotop, welches γ -Strahlen emittiert, behaftet.

Zur Funktionsmessung zytotoxischer Lymphozyten stehen alternative, nicht radioaktive Techniken zur Verfügung, z.B. Durchflußzytometrie, sofortige Fluorometrie, Enzymfreisetzungstests und zeitlich aufgelöste Fluorometrie [Lövgren, et al. 1994].

Um die höheren Risiken der Arbeit mit $^{51}\text{Chrom}$ zu vermeiden, wurde der nichtradioaktive Europiumfreisetzungstest für die Bestimmung der zytotoxischen Lymphozyten-Aktivität in dieser Arbeit ausgewählt, der sich neben einer hohen Sensitivität auch durch kurze Inkubationszeiten auszeichnet [Volgmann et al. 1989, von Zons et al. 1997].

Durch in vitro Stimulation von PBL mit nIL-2 kann LAK-Zellaktivität induziert werden, während NK-Zellen auch ohne vorherige Stimulierung oder Anwesenheit von MHC-Molekülen Zielzellen lysieren [Ahrens et al. 1993].

Da nicht alle Zelltypen von NK-Zellen lysiert werden, mußte eine geeignete Zielzelle, *K562*, für die Funktionsanalyse peripherer Blutlymphozyten eingesetzt werden. Die kontinuierliche Zelllinie *K562* wurde aus dem Pleuraerguß einer 53 Jahre alten Frau mit chronischer myeloischer Leukämie im terminalen Blastenstadium etabliert [Lozzio & Lozzio 1975]. Die Zellpopulation wurde als hochgradig undifferenziert und zur Granulozytenreihe gehörig beschrieben [Lozzio & Lozzio 1979]. Die *K562* Zelllinie hat weite Verwendung als hochsensitive in vitro Zielzelle für den NK-Zell-Assay gefunden [Ortaldo et al. 1977]. *K562* Zellen sind NK-Zell-sensitiv und MHC-Klasse-I negativ.

Zelltötungstests für LAK-Zellen unterscheiden sich etwas von den Tests für die Bestimmung der NK-Zellaktivität. Man nimmt an, daß es sich bei den Vorläufern von LAK-Zellen in erster Linie um NK-Zellen handelt.

Deshalb ist zu erwarten, daß auch nach einer Aktivierung dieser Zellen mittels einer mindestens 24 stündigen Inkubation mit IL-2 ein Rest von Zellen zurückbleibt, der nach wie vor NK-Aktivität besitzt. Damit das Ergebnis keine Mischung aus NK- und LAK-vermittelter Zelltötung darstellt, wurde die NK-resistente *Raji*-Zelllinie als Zielzelle für die Zytotoxizitätstests ausgewählt. Die Zellen der *Raji*-Linie sind Lymphoblasten-ähnlich und wurden von Pulvertaft (1964) aus einem Burkittlymphom des Oberkiefers eines 11 Jahre alten schwarzen Jungen etabliert. Als weitere Eigenschaft der *Raji*-Zellen ist die starke Expression von MHC-Klasse-I- Rezeptoren zu nennen.

Die Zielzellen *K562* und *Raji* wurden durch das im Markierungspuffer enthaltene Dextran-sulfat permeabilisiert. Dadurch waren sie in der Lage, den Eu-DTPA-Komplex zu inkorporieren.

Die Stabilitätskonstante des Eu-DTPA-Komplexes ist hoch genug, daß keine Bindung an nicht-spezifisches Material, wie z.B. Proteine oder Zellfragmente, stattfindet, die eine Freisetzung des Europiumkomplexes aus der lysierten Zelle stören würde [Blomberg et al. 1986].

Die Zielzellen wurden zusammen mit PBL von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Aerodigestivtraktes bzw. mit PBL von Kontrollpersonen inkubiert. Das dabei aus den lysierten Zielzellen freigesetzte Eu-DTPA bildet nach Zugabe einer Fluoreszenz-verstärkenden sogenannten „Enhancement-Lösung“ einen stabilen Chelatkomplex, der fluorometrisch bestimmt wird [Hemmilä et al. 1984, Volgmann et al. 1989].

1.2. Sandwich Elisa zum Nachweis von Interleukin-2 und löslichem Interleukin-2-Rezeptor α

Unter dem Begriff Enzymimmunoassay (EIA) werden alle Immunoassays zusammengefasst, bei denen die Konzentration des Analyten über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym ermittelt wird. Beim EIA finden somit zwei Reaktionen statt, die immunologische und die enzymatische.

Die EIA-Techniken kann man nach immunologischen Reaktionsprinzipien einteilen. Es gibt einerseits kompetitive Techniken, bei der sowohl Makromoleküle, als auch Haptene mit nur einem reaktiven Epitop quantifiziert werden können, andererseits den nichtkompetitiven EIA, der mindestens zwei Epitope am zu bestimmenden Molekül voraussetzt.

Die nichtkompetitiven EIA sind sämtlich Festphasenassays und werden auf Grund ihres Reaktionsaufbaus auch als Sandwich-Tests bezeichnet. Zum Nachweis von sIL-2R α wurde in der vorliegende Arbeit ein symmetrischer Sandwich-Test benutzt. Die Mikrotiterplatte war mit monoklonalen Antikörpern gegen das Testantigen beschichtet. Das Testantigen wurde hinzugefügt und band an den Antikörper auf der Platte. Gebundenes Antigen wurde anschließend durch Zugabe eines monoklonalen Antikörpers, der ein anderen Epitop von sIL-2R α erkennt, nachgewiesen. Dieser Antikörper ist mit Peroxidase konjugiert [Kazim et al. 1998a, Kazim et al. 1998b].

Die Quantifizierung des Interleukin-2-Proteins erfolgte dagegen durch einen asymmetrischen Sandwich-Elisa unter Anwendung eines monoklonalen Fangantikörpers und eines Peroxidase konjugierten polyklonalen Detektorantikörpers [Gehman et al. 1984, Brandt et al. 1986]. Diese Methode ist spezifischer als die gebräuchlichen Bioassays zur Quantifizierung von IL-2, bei denen der mitogene Effekt von IL-2 auf eine geeignete Zelllinie gemessen wird [Gehman et al. 1984].

Während bei dem Nachweis von sIL-2R α die zu bestimmende Probe und der enzymmarkierte Antikörper simultan pipettiert werden, erfolgte bei der Interleukin-2-Protein-Bestimmung eine sukzessive Zugabe des Analyten und des enzymmarkierten Antikörpers.

Die Nachweisgrenze des Kits lag für die Bestimmung von sIL-2R α bei 30 U/ml. Der Bereich der Standardkonzentrationen betrug bei Versuch 1: 0 bis 3100 U/ml, bei Versuch 2: 0 bis 3150 U/ml und bei Versuch 3: 0 bis 2940 U/ml.

Die Nachweisgrenze bei quantitativer Analyse des IL-2 Proteins lag bei 10 µg/ml mit einem Standardkonzentrationsbereich von 0 bis 2000 pg/ml.

Die auf sIL-2R α und IL-2 untersuchten Plasmaproben wurden nach dem Auftauen nur einmal für die Elisa-Versuche verwendet, da durch mehrmaliges Einfrieren und wieder auftauen die Peptide degenerieren. Dies wurde anhand eines Vorversuches zur Konzentrationsbestimmung von sIL-2R α bestätigt, da die gemessenen Konzentrationen nach Verwendung der selben Probe von 3508 U/ml auf 5489 U/ml bzw. von 3714 U/ml auf 5401 U/ml nach zweimaligen Auftauen zunahmen. Dieses Phänomen läßt sich so erklären, daß Bruchstücke des zerfallenden Proteins ebenfalls von dem Test erfasst wurden und somit falsch-positive Ergebnisse lieferten.

1.2.2. Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit monoklonalen Antikörpern gegen CD25-Antigen zum Nachweis des löslichen Interleukin-2-Rezeptors

Nachdem die Konzentrationen von sIL-2R α der Plasmaproben mit dem Kit der Firma Dako bestimmt worden waren, ergab sich die Frage, ob ein selbst hergestellter Kit reproduzierbare Ergebnisse liefern könnte. Für dieses Vorhaben wurde die Mikrotiterplatte zum Nachweis von sIL-2R α mit monoklonalen Antikörpern gegen das CD25-Antigen beschichtet und die erfolgreiche Beschichtung durch die höchste sIL-2R α -Standard-Konzentration (3100 U/ml) der Firma Dako überprüft.

Zuerst wurden die Antikörper mit Beschichtungspuffer (15 mM Na₂CO₃/35 mM NaHCO₃ pH 9,6) in einem Verhältnis 1:10, 1:20, 1:30 und 1:40 versetzt. Danach wurden 100 µl der gelösten Antikörper im Doppelansatz in jede Vertiefung einer 96 Mikrotiterplatte einpipettiert und der Inhalt auf einem Plattenschüttler 30 min/RT/210 Upm gemischt. Damit die Antikörper an der Platte besser haften konnten, wurde über Nacht bei - 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Nach Beendigung des Inkubationsvorganges am folgenden Tag wurden freie Liganden dreimal mit 10x Waschpuffer (1,45 M NaCl /50 mM Tris /0,05 % Tween-20) ausgewaschen und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Klopfen auf ein sauberes, trockenes Tuch entfernt.

Alle freigebliebenen Bindungsstellen wurden 1h bei 37 °C mit 200 µl Nachbeschichtungspuffer, sog. Blockierungspuffer (50 mM Phosphatpuffer pH 7,4/ 1 % BSA), belegt.

Nachdem die Mikrotiterplatte erneut dreimal mit dem gleichen Puffer gewaschen wurde, wurden 100 µl Antigen-Lösung (3100 U/ml) in jeden Napf hinzugegeben. Die Bindung des in der Probe vorhandenen sIL-2R α mit den an die Mikrotiterplatte angelagerten Antikörpern vollzog sich im Dunklen für 2,5 h/ 37 °C. Ungebundene Proteine wurden anschließend durch dreimaliges Waschen entfernt.

Zum Schluß wurden 100 µl Peroxidase-Konjugat pro Vertiefung zugegeben. Nach 1h bei 37°C und anschließendem dreimaligen Waschen wurden 100 µl Substrat hinzugegeben und die Enzym-Reaktion nach 10 min durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure (0,5 M H₂SO₄) beendet. Die Farbintensität wurde simultan bei den Wellenlängen 450 nm und 620 nm im Photometer gemessen.

Eine Extinktion von 0,863 wurde bei einer Beschichtung der Mikrotiterplatte mit monoklonalen Antikörper gegen CD25-Antigen (1:40; 0,15 mg/ml) erzielt, die einer sIL-2R α -Konzentration vom 2940 U/ml entspricht. Die Beschichtung der Mikrotiterplatte, unter den angegebenen Bedingungen, war somit erfolgreich.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. Phänotypisierung der *Raji* und *K562*

Tab. 10

Um das Wirkprinzip von *Raji*- und *K562* als Targetzellen in einem zytotoxischen Test verstehen zu können, muß man sich mit den Oberflächenrezeptoren dieser Zellen beschäftigen. Zur Charakterisierung der Zelllinien *Raji* und *K562* wurden die Zellen wie unter Punkt III 2.1. beschrieben, kultiviert und vier Tage lang die Expression der folgende Oberflächenantigene mit dem Durchflußzytometer (siehe III 4.2.1) gemessen: CD4, CD8, CD3, CD19, CD16, CD56, CD2, CD25, HLA-DR, CD45, CD45RA und CD45RO.

Rath (1997) wies die Genexpression des CD45-Moleküls auf der myeloischen *K562* Zelllinie mittels RT-PCR nach. In der vorliegende Arbeit wurden mittels FACS 16 % CD45-positive Zellen und 0,7 % Gedächtniszellen (CD45RO) gefunden. Wie auch andere Studien zeigen, werden weder CD19- noch HLA-DR-Antigen auf der Oberfläche der *K562*-Zellen exprimiert [Mahmoud et al. 1996].

Die Expression der Oberflächenmoleküle CD19, HLA-DR und CD45 auf *Raji* Zellen wurde von Aberer et al. (1987), Harris et al. (1995) und Mahmoud et al. (1996) auf genetischer Ebene detektiert. Nach durchflußzytometrischen Untersuchungen in dieser Arbeit exprimieren die *Raji*-Zellen CD19- zu 95,5 %, HLA-DR- zu 99,2 %, CD45- zu 99,2 % und CD45RA-Antigen zu 74 %. CD45 RO-positive Zellen sind nicht vorhanden.

T-Zellmarker wie CD4, CD3, CD2, NK-Zellmarker CD16 und Aktivierungsmarker CD25 wurden bei keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Die Oberflächenmarker CD8 und CD56 wurden von beiden Zelllinien mit je 0,1 % positiven Zellen nur minimal exprimiert. Die positive Bewertung dieser Resultate muß durch weitere Versuche verifiziert werden.

2.2. Etablierung der Biotin-Streptavidin Methode

Tab. 11

Alle für die Biotin-Streptavidin-Methode verwendeten Primärantikörper gegen menschliches CD45, CD3, CD8 und HLA-DR-Antigene eigneten sich für Untersuchungen an formaldehyd-fixiertem Paraffinmaterial [Adams et al. 1983, Mason et al. 1992, Leong 1993].

Um die in der Tab. 11 aufgeführten optimalen Verdünnungen der verschiedenen zur Detektion mononukleärer Zellen im Tumor- und in Lymphknotenmetastasen zu ermitteln, mußte eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt werden. Die verschiedenen Verdünnungen wurden aufgrund des reichen Vorkommens an mononukleären Zellen an Tonsillenschnitten ausprobiert. Diese Tonsillenschnitte wurden nach der Etablierung der Biotin-Streptavidin-Methode als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Die Ermittlung der geeigneten Verdünnung für den Einsatz von paraffingängigen monoklonalen Antikörpern gegen die Antigene CD45, CD3, CD8 und HLA-DR vollzog sich nach folgende Muster:

Tab. 60: Verdünnungsmuster am Beispiel der Primärantikörperverdünnung (Verhältnis 1:50)

Primärantikörper	1:50	1:50	1:50
1. Sekundärantikörper	1:300	1:300	1:150
2. Sekundärantikörper	1:300	1:150	1:150
Peroxidase-Streptavidin Konjugat	1:150	1:150	1:150

Die Verdünnung der Primärantikörper wurde von niedrigen zu höheren Konzentrationen im Verhältnis 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:5, bei gleichbleibender Verdünnung des 1. Sekundärantikörpers, des 2. Sekundärantikörpers und des Peroxidase-Streptavidin-Konjugats (Tab. 60) vorgenommen. Um eine möglichst große Spezifität zu gewährleisten, wurde als passende Verdünnung diejenige gewählt, die bei einer geringen Antikörper Konzentration eine vergleichsweise intensive Färbung der Zellen erlaubte.

Während der Fixierung, meistens mit Formalin, entstehen Aldehydvernetzungen, welche eine Bindung des Antikörpers verhindern können. Auch kann sich dadurch die dreidimensionale Struktur eines Proteins (Antigens) verändern und so für den Antikörper nicht mehr erkennbar sein (Antigenmaskierung) [Shi et al. 1997].

Ein Beispiel hierfür waren die CD8- und CD3-Antigene, bei denen eine Detektion anfangs unmöglich war. Die Behandlung der Präparate mit einem proteolytischen Enzym, in diesem Fall Proteinkinase K [Miller et al. 1995], machte das Epitop für den Einsatz der anti-CD8 Antikörper zugänglich. Ebenfalls wurden Bindungen nach Formaldehydfixierung durch intensives Waschen der Paraffinschnitte mit Zitratpuffer gelöst [Leong et al. 1996], was die Immunreaktivität für die Verwendung der anti-CD3 Antikörper verbesserte. Anscheinend werden sowohl CD45, als auch die HLA-DR-Moleküle durch die genannte Fixierung nicht beeinträchtigt, so dass hier keine Vorbehandlung benötigt wurde.

Der Begriff „paraffingängige“ Antikörper ist irreführend, denn die Antikörper müssen nicht das Paraffin passieren, da dieses durch das Xylol bereits herausgelöst wurde. Vielmehr ist damit gemeint, daß die Antikörper an formalinfixiertem Material und nachfolgender Paraffineinbettung zum Einsatz kommen. Das Problem für die Antikörper ist also nicht das Paraffin, sondern das Formalin.

Niederschläge können mit positiver Anfärbung verwechselt werden, deswegen wurde als Gegenmaßnahme das Chromogen vor Gebrauch filtriert. Im Gewebe vorhandene Enzyme reagieren mit dem Substrat und bewirken eine positive Anfärbung, deswegen wurde die endogene Peroxidaseaktivität zu Beginn des Testansatzes unterdrückt [Shi et al. 1997]. Die Umsetzung den Nachweis von HLA-DR-positiven Zellen dauerte vergleichsweise doppelt so lang (12 min) wie der Nachweis von CD45-, CD3- und CD8- positiven Zellen.

2.3. Zelluläres Immunprofil

Besonders bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Halsbereichs sind immunologische Funktionsstörungen bekannt [Gottschlich et al. 1997]. Im Rahmen der Tumorerkrankungen eines Patienten hat man mit zumindest drei individuellen Stellgliedern zu tun, die sich innerhalb der Erkrankung teilweise eigenständig entwickeln und somit die Tumorerkrankung immer wieder neu beeinflussen und verändern können: den Tumor mit seinen unterschiedlichen Varianten, den Patienten mit seinem individuellen Verhalten sowie das Immunsystem des Patienten. Die Tumorerkrankung koordiniert diese verschiedenen Stellglieder so, daß die Tumorentwicklung mehr oder weniger ungehindert fortschreiten kann [Klehr 1992].

Die von den Patienten wahrgenommenen entzündlichen Reaktionen am Ort des Tumors bzw. dessen Metastasen und die hieraus resultierenden Veränderungen des Schmerzcharakters in loco stehen im unmittelbaren Zusammenhang mit der Immunreaktion [Klehr 1992].

Hier spielen die Lymphozyten in der Regulation der Immunantwort eine zentrale Rolle und können daher als repräsentativ für das gesamte Immunsystem angesehen werden. Unter Zuhilfenahme des Blutes als Transportweg zirkulieren sie kontinuierlich zwischen lymphatischen und nicht lymphatischen Organen [Pabst et al. 1988, Westermann et al. 1990]. Veränderte Lymphozyten-Subpopulationen können daher für die Diagnose, Prognose und therapeutischen Fragen in der klinischen Onkologie hilfreich sein. Die Untersuchung der Lymphozyten wurde schon in früheren Studien als nützliches prognostisches Instrument bei Tumorerkrankungen beschrieben [Koldovsky et al. 1987, Donnerstag et al. 1993a, Donnerstag et al. 1994].

2.3.1. Zelluläres Immunprofil von Kontrollpersonen

Tab. 12

Die hier ermittelten Normwerte der Anteile der Lymphozytenpopulationen stimmen mit den von Henzel (1995) dargestellten Median-Werten überein.

Tab. 61: Vergleich der Lymphozytenpopulationen [% Medianwerte] bei Kontrollpersonen, jeweils linke Spalte: eigene Werte. Jeweils rechte Spalte: Henzel (1995)

	CD4		CD8		CD4 ⁺ CD8 ⁺		CD3		CD56		CD2	
[%]	37	37,5	35	36,5	1	2,5	66	70	21	22	77	83
	CD25		CD2 ⁻ CD25 ⁺		CD2 ⁺ CD25 ⁺		CD45		HLA-DR			
[%]	19	22	4	4	15	19	97	99	16	20		

Da die Variationen in der Verteilung von Lymphozyten-Subpopulationen des peripheren Blutes jedoch nicht notwendigerweise auf pathologische Veränderung anderer Organe hinweisen [Westermann et al. 1992], ist es essentiell, zusätzlich zur Phänotypisierung auch die zytotoxische Aktivität der PBL zu ermitteln [Donnerstag et al. 1993a, Donnerstag et al. 1994].

Bislang existiert nur eine Langzeitstudie, in der periphere Blutlymphozyten phänotypisch charakterisiert und simultan die LAK- und NK-Zellaktivität bei gesunden Freiwilligen im Zeitverlauf bestimmt worden ist [Henzel 1995].

Um die bei der Untersuchung des Patientenblutes erhaltenen Werte vergleichen zu können, wurden ebenfalls Normwerte im Verlauf erstellt.

Die von Henzel (1995) erstellte Erhebung der zytotoxischen Lymphozytenfunktion kam zu erniedrigten Median-Werten der NK-Zellaktivität (49 % gegenüber 65 % in der vorliegenden Arbeit). Die hier ermittelte LAK-Zellaktivität von 11 % war vergleichbar mit den Werten von Henzel (10 %).

Die von Donnerstag et al. (1993b) ermittelte Funktion der zytotoxischen Lymphozyten ohne MHC-Restriktion ergab höhere Aktivitäten als die hier aufgeführten: für die LAK-Zellen wird im Median eine Lysisrate von 21,4 % und für die NK-Zellen 77,4 % genannt.

Die Mediane der NK-Zell- und LAK-Zellaktivität der erwähnten Autoren liegen jeweils zwischen dem unterem und dem oberem Quartil der in dieser Arbeit ermittelten Werte:

NK-Zellaktivität = 37,5 %-77,5 % und LAK-Zellaktivität = 6 % - 22,5 %.

Da die bei der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse der Funktionsanalyse peripherer Blutlymphozyten bei Kontrollpersonen genauso wie bei Henzel (1995) in regelmäßigen Abständen im Zeitverlauf gewonnen wurden und die Probenanzahl in etwa übereinstimmt, können die differierenden Werte der NK-Zellaktivität mit Veränderungen, z.B. Alterung der Zelllinie K562, erklärt werden. Diese Zellen werden über Jahre in permanenter Kultur gehalten.

Die niedrigere Werte gegenüber Donnerstag (1993b) kommen wahrscheinlich dadurch zustande, daß in der vorliegenden Arbeit der Immunstatus von 10 Freiwilligen im regelmäßigen zeitlichen Abstand untersucht wurde. Daher gingen auch z.B. durch grippale Infekte beeinflusste Werte mit in die Auswertung ein, während Donnerstag (1993b) die Probanden nur einmalig auf ihre immunologischen Parameter hin untersuchte. Auch die Tatsache, daß in der vorliegenden Untersuchung fast doppelt so viele Daten in die Auswertung mit eingingen, mag zu den differierenden Werten beigetragen haben.

Ein ähnlicher Mittelwert von 58 % für die NK-Zellaktivität bei Probanden wurde von Blomberg und Mitarbeiter (1986) beobachtet, die mittlere NK-Zellaktivität beträgt in meiner Arbeit 57,2 %.

Auffällig ist der extrem niedrige Anteil der CD4-Population bei der Gruppe ohne Evidenz auf einen Primärtumor T0 (n = 3; M = 3) und die starke Generierung doppelpositiver CD4⁺ CD8⁺-Zellen bei der Patienten-Gruppe T1 - T2 (n = 15; M = 15). Zusätzlich wurde eine Erhöhung von HLA-DR auf den Immunzellen bei der Gruppe T3 - T4 (n = 3; M = 3) festgestellt.

Tab. 20 – Tab. 26 (Abb. 11 - Abb. 17)

Abhängigkeit von der Tumormalignität

Eine deutliche Erhöhung der HLA-DR-Werte und eine Absenkung der LAK-Zellaktivität konnte bei der Patienten-Gruppe G1 (n = 5; M = 5) ermittelt werden. Patienten im G2-Stadium (n = 19; M = 19) erfahren zudem sowohl eine Erniedrigung der CD4-Population, als auch eine Erhöhung der unreifen T-Zellen. Bei Patienten mit einer Tumormalignität G3 (n = 6; M = 6) ist eine Reduzierung der CD3-Population zu verzeichnen.

Tab. 27 - Tab. 33 (Abb. 18 - Abb. 24)

Abhängigkeit von Lymphknotenmetastasen

Tumor-Patienten ohne Befall regionärer Lymphknoten N0 (n = 10; M = 10) zeigten eine erniedrigte Zahl von CD4-positiven Zellen sowie eine Zunahme unreifer T-Lymphozyten. Ebenfalls konnte eine Zunahme der unreifen T-Lymphozyten, sowie eine Erhöhung des HLA-DR-Markers bei der Patientengruppe N1 - N2 (n = 20; M = 20) festgestellt werden.

Tab. 62: Analyse peripherer Blut-Lymphozyten-Subpopulationen mittels FACScan bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf und Hals-/Bereich. (–) = Phänotypen wurden nicht untersucht.

	T-Zellen	T-Helferzellen	Zytotoxische T-Zellen	NK-Zellen	B-Zellen	HLA-DR-positive Zellen
Dawson (1985)	normal	normal Th1: erniedrigt	normal	normal	normal	normal
Furusaka (1986)	normal	normal	normal	–	–	–
Wolf (1987)	normal	normal	normal	normal	–	–
Gonzalez (1994)	erniedrigt	erniedrigt	–	–	–	–
Eskinazi (1987)	normal	normal	normal	erhöht	normal	–
Farace (1994)	erniedrigt (ζ-Kette)	–	–	–	–	–
Dammer (1997)	normal	normal	normal	normal	erniedrigt	erhöht
Kuss (1999)	erniedrigt (ζ-Kette)	erniedrigt	normal	–	–	–
Penna-Martinez (2001)	erniedrigt	erniedrigt	normal	normal	normal	erhöht

In einem Punkt stimmen alle Autoren überein, daß der Anteil der zytotoxischen T-Zellpopulationen in HNSSC-Patienten Normalwerten entspricht.

Eskinazi et al. (1987) konnten im Gegensatz zu den in meiner Arbeit vorgestellten und in der Tab.62 zusammengefaßten Daten einen erhöhten prozentualen Anteil von NK-Zellen bei Karzinompatienten ermitteln. Der genannte Autor benutzte für die Detektierung der NK-Zellpopulation einen Antikörper, der sich gegen das CD57-Molekül richtete. Da dieser Antikörper nicht nur an Oberflächenmarker von NK-Zellen, sondern auch an T-Zell-Subgruppen binden kann, ist anzunehmen, daß diese Zellpopulation in der Phänotypisierung miterfaßt wurde und daher erhöhte NK-Zell-Werte lieferte.

Mit Ausnahme von Dammer et al. (1997) wurde in allen Veröffentlichungen keine Änderung der B-Zellanteile bei HNO-Tumorpatienten gefunden. Der Autor Dammer untersuchte 46 Patienten mit manifesten oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, alle übrigen Arbeiten dagegen befaßten sich mit verschiedenen Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes. Vielleicht ist die von Dammer beobachtete Minderung der B-Lymphozyten für die untersuchte Tumorenart spezifisch.

Wie bereits in Untersuchungen von Dammer et al. (1997) gezeigt wurde, erzielten die HNO-Tumorpatienten bei dem Gruppenvergleich charakteristisch höhere HLA-DR-Werte. Der erwähnte Autor wählte im Gegensatz zu dieser Arbeit als Vergleichsgruppen Alkoholiker, Raucher und Präkarzinompatienten. Dammer et al. (1997) beobachtete, daß hauptsächlich T-Lymphozyten HLA-DR exprimieren. In meiner Studie konnte man leider nicht unterscheiden ob T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten HLA-DR positiv sind, da bei der Messung HLA-DR auf Lymphozyten ohne eine weitere Differenzierung bestimmt worden ist.

Studien von Dawson et al. (1985), Furusaka et al. (1986), Wolf et al. (1987) Eskinazi et al. (1987) und Dammer et al. (1997) berichten über einen normalen T-Zell- und T-Helferzellanteil bei Patienten mit HNO-Tumoren. Abgesehen von Wolf et al. (1987) und in meiner Arbeit unterteilte niemand die Patienten gezielt nach der Tumorgroße, dem Tumormalignitätsgrad und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. So konnte in meiner Doktorarbeit erst bei Patienten mit einem höheren Malignitätsgrad G3 eine Reduzierung der CD3-Lymphozytenpopulationen beobachtet werden.

Wolf et al. (1987) berücksichtigten bei der Einteilung der Patienten die Ausdehnung des Tumors und die befallenen Lymphknoten. Da der Differenzierungsgrad des Tumors nicht berücksichtigt worden ist, wurde die Minderung der CD3-positiven Zellen nicht gefunden. Er beobachtete jedoch, daß die Zunahme der CD4-Population mit einer Zunahme der Tumorgroße und dem Befall der Lymphknoten in Verbindung steht. Auch in meiner Arbeit konnte die gleiche Tendenz festgestellt werden. Die CD4-Lymphozyten Anteile betragen bei den Gruppen T0 = 19 %, T1 - T2 = 33 %, T3 - T4 = 35 % und Gruppen N0 = 27,5 %, N1 - N2 = 33,6 %. Die CD4-Lymphozytenpopulationen in den Grading Gruppen verhalten sich dagegen umgekehrt: G1 = 34 %, G2 = 33 %, G3 = 26,5 %. Weiterhin beobachteten Dawson et al. (1985) keine Veränderung der CD4-Population, jedoch eine Minderung einer Subpopulation der T-Helferzellen, die IL-2 produzieren.

Nachdem eine allgemeine Auseinandersetzung mit der Literatur bezüglich der Lymphozyten im peripheren Blut durchgeführt worden ist, erscheint es von Interesse, die von Veränderungen betroffenen immunkompetenten Zellen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich im einzelnen zu diskutieren:

T-Lymphozyten

Bei dem Gruppenvergleich wurde in der vorliegende Arbeit ein T-Zell-Mangel bei den Karzinompatienten mit einer Tumormalignität G3 festgestellt.

Die Zelloberflächenexpression des TCR-Moleküls, wie auch seine Funktion bei der Aktivierung der T-Zellen ist vom CD3-Antigen abhängig. Dieser Oberflächenmarker ist ein Komplex bestehend aus vier bis fünf Proteinen. Einer davon ist die ϵ -Kette [Borst et al. 1984], die mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper detektiert wurde. Whiteside et al. (1999) zeigten im peripheren Blut von HNO-Tumorpatienten genau wie hier eine reduzierte Anzahl von Zellen, die die ϵ -Kette exprimierten. Auch über die Expression der ζ -Kette, einen weiteren Teil des CD3-Rezeptor-Komplexes, deren Hauptanteil im Zytoplasma liegt und für die Signaltransduktion benötigt wird, [Sussmann et al. 1988] wurde auf zirkulierenden Lymphozyten von HNSCC-Patienten berichtet. Die reduzierte Expression der ζ -Kette ist sowohl bei $CD8^+$ -, als auch $CD4^+$ -T-Zellen wie auch bei $CD3^-CD56^+CD16^+$ -NK-Zellen nachweisbar [Kuss et al. 1999]. Die Veränderung der Expression der ζ -Kette bei peripheren T-Lymphozyten bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wird mit den Untergang diese Population durch Apoptose in Verbindung gebracht [Saito et al. 1999].

T-Helferzellen

Eine Störung des Gleichgewichts im Immunsystems innerhalb des Patientenkollektiv wird ersichtlich anhand des signifikanten Abfalls des Anteils peripherer $CD4^+$ -Zellen in den Gruppen T0, G2 und N0 und der Zunahme unreifer $CD4^+CD8^+$ -Zellen in den Gruppen T1 - T2, G2, N0.

Naive T-Helferzellen produzieren nach einem ersten Antigenkontakt hauptsächlich IL-2. Kurze Antigenstimulation führt zur Entwicklung von T_H0 -Zellen, die ein weites Spektrum von Zytokinen freisetzen können. Nach chronischer Stimulation entstehen die spezialisierten T_H1 und T_H2 -Zellen.

Einige Zytokine werden von beiden Zelltypen freigesetzt (IL-3, GM-CSF und $TNF\alpha$). T_H1 -Zellen setzen IL-2 und $IFN\gamma$ frei, während T_H2 -Zellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 produzieren [Romagnani et al. 1991, Mosmann et al. 1996]. Die beiden Zellsorten beeinflussen sich derart, daß $IFN\gamma$ die Proliferation von T_H2 -Zellen und IL-4 zusammen mit IL-10 die Funktionen von T_H1 -Zellen hemmen [Mosmann et al. 1996].

Dawson et al. (1985) sieht speziell eine Minderung der IL-2 produzierenden CD4-T-Helferzellen, Vetto et al. (1997) weisen auf eine GM-CSF-Produktion durch inaktivierte CD4-Populationen im peripheren Blut der Tumorpatienten hin.

Die T-Helferzellen produzieren, wie bereits erwähnt, nach ihrer Aktivierung eine Vielzahl von Zytokinen und spielen eine wichtige Rolle als T_H1-Zellen in der zellvermittelten Immunität bei der Aktivierung und/oder Proliferation zytotoxischer T-Lymphozyten, anderer T-Helferzellen und Monozyten/ Makrophagen. Die T_H2-Zellen helfen B-Zellen Antikörper zu bilden [Abbas et al. 1996]. Wichtig ist, daß viele Tumorzellen IL-10 synthetisieren und sezernieren, d.h. ein T_H2-Zytokin, das die T_H1-Effektorzellen inhibiert und damit die antitumorale Aktivität des Immunsystems behindert [Birk et al. 2001].

CD8⁺-T-Lymphozyten sind zytotoxische T-Lymphozyten, die Targetzellen über den direkten Zellkontakt lysieren und eine Rolle bei der Abtötung virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen spielen. Während sie selbst durch T-Helferzellen aktiviert werden, üben sie im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus eine hemmende Wirkung auf CD4⁺-T-Lymphozyten [Nollert et al. 1999]. Dies könnte die CD4⁺ Minderung bei Tumorpatienten erklären.

Zudem können CD4⁺-T-Zellen als Induktoren eine Immunantwort vom Typ der verzögerten Hypersensitivität entwickeln und darauf hin Lymphokine wie Granulozyten-Makrophagenkoloniestimulierende-Faktor (GM-CSF), IFN γ und IL-2 freisetzen. Diese Zytokine aktivieren unspezifische, tumortoxische Effektorzellen, wie Makrophagen und NK Zellen. T-Helferzellen haben somit eine wesentliche Bedeutung bei der Tumorabwehr, unabhängig davon, ob auch CTL-Antworten die Tumorabstoßung beeinflussen [Wustrow et al. 1995].

Im Unterschied zu Wolf et al. (1987), Strome et al. (1987) und Eskinazi (1987) konnte eine Veränderung der CD4/CD8-Ratio bei den untersuchten Tumorpatientengruppen nicht bestätigt werden. Unterschiede ergaben sich aber in der Zunahme der unreifen T-Zellen.

Heranreifende Thymozyten exprimieren sowohl CD8 als auch CD4-Moleküle auf ihre Oberfläche. Die Interaktion dieser Moleküle mit HLA-Molekülen verursacht eine Herunterregulierung der einen und eine Hochregulierung der anderen Moleküle. Daraus resultieren reife T-Zellen des CD4⁺CD8⁻- oder CD4⁻CD8⁺-Typus [Goldrath et al. 1999]. Da weniger CD4⁺-T-Zellen zu finden sind, wird möglicherweise das CD4⁺-Reservoir mit heranreifenden T-Zellen aufgefüllt.

LAK-Zellen

Die Stimulierung der CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺-Zellen durch genügend hohe Konzentrationen von Interleukin-2, über wenigsten 48 Stunden, bewirkt ihre Differenzierung zu zytotoxischen Lymphokin-aktivierten Killerzellen [Ortaldo et al. 1986]. LAK-Zellen weisen eine gesteigerte zytolytische Aktivität und eine sehr breite Zielzell-Spezifität auf und sind zur Lyse einer großen Auswahl neoplastischer und normaler Zellen, einschließlich Epithelzellen, befähigt. Demnach stellen LAK-Zellen wahrscheinlich keine eigene Zelllinie dar, sondern erlangen diese Qualität als Folge der Aktivierung [Herberman et al. 1987]. Unterschiede in der Spezifität könnten ebenfalls vom Aktivierungsgrad abhängen, außerdem noch von der Verteilung von

Die Unterdrückung der zellvermittelten Immunität ist häufig bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zu finden und ist charakterisiert durch eine Ungleichgewicht der T-Zell-proliferativen Antwort wie auch der NK-Zell- und LAK-Aktivität [Bugis et al. 1990].

In meiner Arbeit wird eine Reduzierung der LAK-Zellaktivität im peripheren Blut erst bei HNO-Tumor-Patienten im G1-Stadium deutlich. Dies kann man folgendermaßen erklären.

In der Regel werden in einem Zytotoxizitätstest PBMC ungereinigt als Effektorzellen verwendet, d.h. es handelt sich hier um eine Mischpopulation von Monozyten und Lymphozyten [Lötzerich et al. 1997]. Die Monozyten wurden durch Adhärenz an das Kulturgefäß kurz vor Versuchsbeginn depletiert. Insbesondere Monozyten können durch die Produktion von Prostaglandin-E2 NK-Zellen in ihrer Funktion beeinträchtigen [Baxevanis et al. 1993]. Die aus peripheren Blut isolierten mononukleären Zellen wurden 7 Tage als Mischkultur kultiviert, so daß man annehmen könnte, daß die Monozyten in der Kultur diese hemmenden Prostaglandine serzenierten.

Da sowohl mononukleäre Zellen von Kontrollpersonen, als auch von Patienten den gleichen Bedingungen ausgesetzt worden sind, ist zu vermuten, daß vielleicht eine erhöhte Anzahl von Monozyten bzw. eine erhöhte Prostaglandin-Produktion durch Monozyten für die reduzierte LAK-Zellaktivität bei den Patienten verantwortlich gemacht werden kann.

Die LAK-Zellaktivität von PBL von Patienten mit cervicalen und bronchialen Karzinomen ist mit Kontrollpersonen vergleichbar, unabhängig vom Krankheitsstadium. Dennoch haben andere Forschungsgruppen eine reduzierte LAK-Zellaktivität bei Patienten mit bronchial- und fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom sowie Melanomen gefunden [Brittenden et al. 1996].

Die suppressiven biologischen Effekte erscheinen aber auch durch Faktoren im Serum ausgelöst zu werden [Bugis 1990]. Einige Zytokine, wie z.B. transformierender-Wachstumsfaktor (TGF- β) und Interleukin-10 induzieren ähnliche immunsuppressive Effekte. Interleukin-10 wird als möglicher Mediator der Immunsuppression bei Patienten mit Kopf und Hals-Tumoren angesehen [Avadopoulos et al. 1997].

Die durchflußzytometrische Bestimmung des NK-Zellanteils ergab, genau wie bei Dammer et al. (1997), aber anders als Eskinazi et al. (1985), keinen erhöhten prozentualen Anteil der NK-Zellen bei Karzinompatienten.

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf und Hals Bereich haben andere Autoren eine signifikante Supprimierung der NK-Zellaktivität im peripheren Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Tumor festgestellt [Wustrow et al. 1985, Mickel et al. 1988, Schantz et al. 1986, Schantz et al. 1989a, Lakhdar et al. 1989, Kumazawa et al. 1991]. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Befund nicht bestätigt werden. Der Grund könnte darin liegen, daß den Autoren mehr Tumorpatienten im fortgeschrittenen Tumorstadium zur Verfügung standen. Hier waren die Untersuchungen nur auf 3 Patienten beschränkt.

2.3.3. Zelluläres Immunprofil in Abhängigkeit verschiedener konventioneller

Es ist bekannt, daß konventionelle Behandlungen von Tumoren, sei es durch einen chirurgischen Eingriff, Chemo- oder Strahlentherapie, die Immunabwehr der Patienten schwächen und besonders Subpopulationen der T-Lymphozyten beeinflussen. Durch Operation verursachte Immundefekte sind im Gegensatz zu Immundefekten die durch Radio- und Chemotherapie vermittelt werden, von kurzer Dauer [Hadden et al. 1997].

Der Einfluß des chirurgischen Eingriffs, der Chemo-, Radio- sowie einer Kombination aus Chemo- und Radiotherapie bei Patienten mit Tumoren im Kopf-/Halsbereich auf die zellulären immunologischen Parameter wurde bislang kaum untersucht, und war unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Bei 49 Patienten (M = 195) mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, Hypopharynx und Larynx wurden im Verlauf der Therapie, einem Zeitraum von drei Monaten, die Lymphozyten-Subpopulationen phänotypisch untersucht.

Das Ausmaß der Immunsuppression als Folge der verschiedenen konventionellen Therapien im Kopf-/Halsbereich läßt sich in dieser Studie anhand von bestimmten Immunparametern des peripheren Blutes relativ gut darstellen. Alle Therapien verursachen einen hochsignifikanten Abfall bzw. Zunahme sämtlicher Lymphozyten-Subpopulationen.

Die Immunparameter reagierten therapieabhängig sehr differenziert. Die signifikanten Veränderungen der Lymphozytenpopulationen unter Einfluß einer bestimmten Therapieform werden im Folgenden diskutiert:

Tab. 34 - Tab. 40 (Abb. 25 - Abb. 31)

Operation

Nach einem operativen Eingriff nimmt die IL-2R- α -Expression besonders auf CD2-positiven Zellen im Vergleich zum Kontrollkollektiv zu. Diese Zellen sind vermutlich T-Lymphozyten.

In der Studie von Heimlich et al. (1999) wurden die Auswirkungen der chirurgischen Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren insbesondere auf das zelluläre Immunsystem dargestellt. Bei Operationen, die länger als 7 Stunden andauerten, kam es postoperativ zu einem signifikanten Abfall der Gesamt-Lymphozyten, der CD4⁺-T-Lymphozyten und der CD8⁺-T-Lymphozyten in pathologische Bereiche unterhalb der Normwerte. Die von den erwähnten Autoren beobachtete Abnahme der T-Lymphozyten könnte durch Blutverlust oder einen Verdünnungseffekt durch intraoperative Blut- oder Volumensubstitution erklärt werden [Dietz et al. 2000]. Die Gesamt-Lymphozytenzahl und die CD4-Population erreichten bereits nach 7 Tagen, die CD8-Population erst nach 4 Wochen postoperativ den Normwert [Heimlich et al 1999, Dietz et al. 2000].

In meiner Studie konnte der Abfall der Lymphozytenanteile nicht beobachtet werden, da die Überprüfung des Immunstatus vier Wochen nach der Operation vorgenommen worden ist, um deren Einfluß auf immunologischen Parameter auszuschalten [Colacchio et al. 1994]. Trotz der schon genannten Maßnahme blieben immer noch, aufgrund des operativen Eingriffs, restliche Veränderungen, die sich in einer starken Aktivierung der T-Lymphozyten manifestierten. Die Beobachtung des Anteils CD25-positiver Zellen und anderer Aktivierungsmarker innerhalb von sechs Monaten nach einem operativen Eingriff wäre sinnvoll.

Chemotherapie

Die Chemotherapie bewirkt sowohl eine starke Erhöhung der Expression des CD25-Moleküls auf T-Zellen oder NK-Zellen, als auch eine Erhöhung der Zahl unreifer T-Lymphozyten. Besonders interessant ist die Zunahme der NK-Zellpopulation bei einer gleichzeitigen Zunahme der LAK-Zellfunktion.

Die von Dammer et al (1997) gefundenen erniedrigten Anteile von T-Zellen bzw. T-Helferzellen sowie ein signifikanter Abfall des B-Zellanteils sind hier nicht beobachtet worden. Da aber die zellulären Veränderungen im Blut nach Chemotherapie bekanntermaßen von der Art, Dosierung und Kombination der eingesetzten Zytostatika abhängig sind, sind die divergierenden Ergebnisse dieser Arbeit und der von Dammer damit erklärbar. Die in meiner Studie registrierten Veränderungen der Anteile bestimmter immunkompetenter Zellen der Patienten ist unter der Gabe eine Polychemotherapie mit Cisplatin, Folinsäure, 5-FU, Fortecortin zu beobachten.

Schantz et al. (1989b) fanden bei 43 Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie mit Cisplatin, 5-FU und Bleomycin keine Beziehung zwischen der zellulären Immunantwort und dem Ansprechen der Chemotherapie. In ihrer umfassenden Studie erwies sich lediglich die Aktivität der Komplementkomponente C1q mit einer Signifikanz von $p < 0,001$ als verwertbarer Parameter für die Vorhersage der Ansprechbarkeit der Zytostatika. Es gibt hierzu zwei Faktoren, die differenziert betrachtet werden müssen: Zum einen die Ansprechbarkeit der Zytostatika mit resultierendem Rückgang eines Tumors, zum anderen die begleitenden Veränderungen von immunkompetenten Zellen, die durch die Zytostatika-Therapie hervorgerufen werden. Fehlende Änderungen der Lymphozytenpopulationen im Blut bei einer bestimmten Zytostatika-Kombination, ebenso eine gute Ansprechbarkeit sowie eine höhere Lebenserwartung bei den Tumorpatienten könnte auf eine gute Wirkung einer Zytostatika-Kombination hindeuten.

Die von Okamoto et al. (1998) beschriebene Verstärkung der LAK-Zell-Generierung durch 5-FU und Cisplatin konnte hier ebenfalls beobachtet werden. Obwohl die Mechanismen der immunmodulatorischen Effekte dieser Substanzen immer noch ungeklärt sind, wurde berichtet, daß die Behandlung von PBMC mit Cisplatin das intrazelluläre Ca^{2+} , den ATP-Spiegel und die Proteinkinase-C-Aktivität steigert. Diese Faktoren sind unerlässlich für die Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen [Pai et al. 1992]. Die deutliche Zunahme der CD56⁺-Zellpopulation und der IL-2-Rezeptor-Expression wurde auch bei PBMC von Patienten mit Kolon-Tumoren, die mit 5-FU behandelt wurden, nachgewiesen [Holcombe et al. 1994]. Cisplatin und 5-FU induzieren die Freisetzung einiger Zytokine, wie z.B. IFN- γ , TNF α , - β und

IL-1 β , IL-6 und IL-12, aber nicht von IL-2, IL-4, IL-10 und IL-15 [Okamoto et al. 1998]. Das CD25-Molekül wurde in meiner Arbeit in Kombination mit dem CD2-Molekül bestimmt.

Da NK-Zellen ebenfalls CD2 und nach Aktivierung zusätzlich CD25 exprimieren können [Bieger et al. 1997], ist zu vermuten, daß die Zunahme der CD2⁺CD25⁺-positiven Zellen ein Ausdruck der Aktivierung von NK-Zellen sein könnte.

Bestrahlungstherapie

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Bestrahlungstherapie eine signifikante Abnahme des Anteils der T-Lymphozyten, besonders der CD4-T-Helferzellen, bei gleichzeitiger Zunahme der CD4⁺ CD8⁺-positiven Zellen bewirkte. In Folge dieser Therapie konnte eine Minderung der B-Zellen sowie eine Erhöhung der NK-Zell-Population beobachtet werden.

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde bei den Patienten, unabhängig von der Vorbehandlung, eine signifikante Reduktion der CD3-positiven Lymphozyten sowie des B-Lymphozytenanteils nach radioaktiver Bestrahlung ermittelt. Dies findet in der Literatur Bestätigung [Gray et al. 1985, Dammer et al. 1997]. Die Abnahme der CD4-T-Helferzellen wird durch Daten von Maier et al. (1995) und Tisch et al. (1998) unterstützt. Die hier deutlich zu erkennende Zunahme der NK-Zellen wird in keiner dieser Arbeiten erwähnt. Louagie und Mitarbeiter (1999) fanden alle bisher genannten Veränderungen der Lymphozytenpopulationen. Sie beobachteten zudem, daß eine unterschiedliche Apoptoseinduktion durch Einwirkung vom γ -Strahlen in vitro bei PBL existiert. Demnach sind die B-Lymphozyten radiosensitive Lymphozyten und die NK-Zellen radioresistente Zellen.

Radio-Chemotherapie

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen deutlich, daß eine Radio-Chemotherapie zu einem signifikanten Abfall der T-Lymphozytenanteile (CD3-, CD2-Oberflächenmarker), besonders der zytotoxischen T-Zellpopulation, sowie zu einer Erhöhung der IL-2R α exprimierenden Zellen führt.

Die Zunahme der NK-Zellpopulation war sowohl unter Chemo- als auch Bestrahlungstherapie deutlich. Die B-Zellanteil war unter Radiotherapie vermindert. Diese Veränderungen konnten bei Patienten mit kombinierter Therapie nicht beobachtet werden.

Nollert et al. (1999) untersuchten den Einfluß der primären akzelerierten Radiochemotherapie mit Carboplatin auf zelluläre und subzelluläre immunologische Parameter bei Patienten mit fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Halsbereichs und erhielten vergleichbare Ergebnisse. Sie beobachteten zusätzlich eine starke Absenkung der CD4-Population.

Die in der vorliegende Arbeit eingesetzte adjuvante Polychemotherapie beinhaltete ein Zytostatika-Gemisch aus Cisplatin, 5-FU, Folinsäure, Dexametason, Rescuvolin und Fortecortin, die in drei Zyklen appliziert worden sind. Unverändert blieb die Gabe von Cisplatin und 5-FU, während die anderen Zytostatika anders kombiniert wurden. Zum Schluß wurde eine additive Strahlentherapie eingesetzt. Der Unterschied in Bezug auf die CD4-Population unter Radio-Chemotherapie zwischen meiner Arbeit und der von Nollert et al. (1999) könnte auf der Kombination verschiedener Zytostatika beruhen.

Ohne Therapie

Um die direkten Auswirkung der Tumorerkrankung auf das Immunsystem feststellen zu können, wurden immunkompetente Zellen einer Gruppe von Tumor-Patienten ohne Therapie verfolgt. Bei Patienten ohne Therapie (M = 33) kommt es zur Abnahme des Anteils CD3-positiver Zellen, insbesondere der Zellen, die CD8-Oberflächenmarker tragen, bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils IL-2R α positiver Zellen, der in dieser Studie ohne Unterschied zwischen T- oder NK-Zellen bestimmt wurde. Eine erhöhte Anzahl unreifer T-Zellen und eine Zunahme der NK-Zell-Populationen sowie eine Minderung der B-Lymphozytenanteile wurde beobachtet.

2.4. Interleukin-2 Spiegel

Das Zytokin IL-2 und sein Rezeptor stellen ein inzwischen gut charakterisiertes Ligand-Rezeptor-System dar, dem eine wichtige Bedeutung innerhalb des Immunsystems zukommt.

Während die Spezifität einer zellulären Immunreaktion durch den T-Zell-Rezeptor gegeben ist, bestimmt IL-2 hauptsächlich die Dauer und Stärke der Immunantwort [Cantrell et al. 1984, Breidenbach et al. 1998].

In dieser Arbeit wurde der Aktivierungsmarker CD25 auf T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen bestimmt. Durch die Messung der IL-2-Spiegel kann die Stimulierung bzw. die Supprimierung hauptsächlich der T-Zellen beobachtet werden, da die T-Zellen die Haupt-IL-2-Produzenten sind. Der IL-2-Spiegel wurde bei Patienten mit HNO-Tumoren im Tumorstadium T3-T4, G2 und mit Lymphknotenmetastasen verfolgt. Dazu wurde der Einfluß der IL-2-Freisetzung bei chirurgischem Eingriff, Chemo- und Bestrahlungstherapien beobachtet.

2.4.1. Interleukin-2 Spiegel und Tumorpatienten

Die IL-2 Spiegel im Plasma wurden bei sechs Tumor-Patienten (M = 26) und sechs tumorfreien Kontrollen (M = 23) gemessen. 98,5 % der Interleukin-2 Spiegel der getesteten Proben lagen oberhalb der von der Firma angegebenen Nachweisgrenze von 10 pg/ml. Nur 1,5 % lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Tab. 41-Tab. 43

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den IL-2-Plasmakonzentrationen zwischen der Kontrollgruppe (M = 16, Median = 23,6) und Tumorpatienten (M = 26, Median = 23,6) festgestellt. Die Ergebnisse zeigten weiter, daß die alleinige Bestimmung des Interleukin-2 Proteins keine Auskunft über die Wirkung des Tumors und der verschiedenen Therapiemodalitäten (Operation, Chemo- und Bestrahlungstherapie) auf Bildung und Sekretion dieses Peptids gibt.

Wustrow et al. (1989) fanden keine Unterschiede in der IL-2-Konzentration bei Patienten mit Larynxkarzinomen, jedoch eine signifikante Reduktion bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen und bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten im Hals. Die IL-2-Konzentration wurde bei dieser Untersuchung anhand des Wachstums einer IL-2 abhängigen Maus-Zelllinie (CTLL) bestimmt. Dies läßt auf einen Einfluß von Plattenepithelkarzinomen im Oropharynx auf das Immunsystem schließen. Der Oropharynx ist in unmittelbarer Nähe von lymphatischen Geweben und zahlreiche Gefäßen im Waldeyerschen Rachenring der Tonsillen zu finden. Interessanterweise hatte keiner der Patienten in meiner Arbeit, die für die IL-2 Bestimmung ausgewählt wurden, einen Tumor im Oropharynx, sondern im Gaumen- und Zungenbereich. Heimdal et al. (1998) fanden in einem gewissen Grade eine verminderte IL-2-Konzentration bei Kopf-Hals Karzinom-Patienten mit Lymphknotenmetastasen.

Heimlich et al. (1999) konnten genau wie in meiner Studie keine durch tumorchirurgischen Eingriff bedingten signifikanten Veränderungen des IL-2 Proteins messen. Nollert et al. (1999) fanden nach Radiochemotherapie stark gestreute IL-2-Werte, die keine systematische Tendenz zeigten.

Orditura et al. (2000) wiesen einen erhöhten IL-2-Spiegel bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungen-Krebs unter Behandlung mit Chemotherapie nach. Tumorpatienten im Stadium IV erreichten niedrigere IL-2-Werte als Patienten des Tumorstadiums III. Es gab auch eine entscheidende Differenz zwischen Patienten, die auf eine Chemotherapie ansprechen (erhöhte IL-2-Spiegel) und Patienten, die nicht auf eine Chemotherapie anprechen (niedrige IL-2-Spiegel). Patienten mit erniedrigten IL-2-Konzentrationen hatten eine kürzere Überlebenszeit, als diejenigen mit erhöhtem Spiegel.

In einer Pilotstudie der Phase II bei Patienten mit fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen im Kopf -und Hals-Bereich wurde Megastrolacetat zwischen drei Zyklen Chemotherapie administriert und dabei dessen Toxizität untersucht. Magestrolacetat fördert den Appetit und die Zunahme des Körpergewichts. Keine signifikanten Effekte wurden während der Therapie gefunden, die IL-2-Werte waren jedoch vor der Therapie mit Megastrolacetat erhöht [Mantovani et al. 1995].

Auch wurde eine Zunahme des IL-2-Spiegels bei Patienten unter photodynamischer Therapie mit fort dauernden und rezidivierenden nasopharyngealen Karzinomen beobachtet [Lai et al. 1997]. In einer Studie von Prasad et al. (1997) wurde gefunden, daß unter Zinkmangel Patienten einen niedrigeren IL-2-Spiegel aufwiesen als Patienten ohne Zinkmangel.

2.4.2. Interleukin-2 Spiegel und Besonderheiten des Kontrollkollektivs

Tab. 44

Bei den IL-2-Bestimmungen hatte sich ergeben, daß IL-2-Konzentrationen von zwei Kontrollpersonen (K5 und K6) im Vergleich zu anderen Kontrollwerten und den Patienten deutlich höher lagen. Bei K5 und K6 kann der Anstieg der IL-2-Werte über die Norm möglicherweise ein Ausdruck einer akuten Infektion sein. Es ist bekannt, daß der Proband K6 in kindlichem Alter unter einer chronischen Sinusitis gelitten hat. Auch aktuell wurde eine Neigung zu rezidivierenden Entzündungen der Nebenhöhlen angegeben. Bei der zweiten Kontrollperson liegen dagegen keine Hinweise für eine chronische Infektneigung vor, es besteht aber ein Verdacht. In der Literatur wird über IL-2-Spiegel bei Patienten mit chronischer Sinusitis nichts berichtet.

Der Vergleich der IL-2-Werte der Kontrollen-Gesamt (M = 23, Median 33,5) mit den Patientenwerten (M = 26, Median 23,6) ergab einen signifikanten Unterschied von $p = 0,04$. Dieser Unterschied beruhte auf den Kontrollpersonen mit erhöhten IL-2-Werten. Daher wurden die Kontrollpersonen in zwei Gruppen unterteilt:

Kontrollpersonen: Kontrollen ohne chronische Entzündung, die für den Vergleich mit Tumorpatienten herangezogen wurden und Personen mit bekannter chronischer Entzündung: Diese wurden aufgrund der erhöhte IL-2-Werte für den Vergleich mit den Patienten ausgeschlossen.

2.4.3. Zeitlicher Verlauf des Interleukin-2 Spiegels

Da bei nicht zeitlich aufgelöster Darstellung die IL-2 Medianwerte bei Patienten und Kontrollen ähnlich sind, ist die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs interessant. Verlaufsbestimmungen des IL-2-Spiegels im Plasma wurden bei sieben Patienten, vier Kontrollen ohne bekannte chronischen Entzündung und zwei Kontrollen mit bekannter chronische Entzündung durchgeführt

Abb. 32 - Abb. 34

Kontrollpersonen

Im Allgemeinen hat jede Kontrollperson ein individuelles IL-2-Profil, das jeweils um einen bestimmten Gleichgewichtswert streut. Diese Niveaus lassen sich bei den Kontrollen durch die Ermittlung der Mittelwerte finden. K1 = 17,3 pg/ml, K2 = 27,9 pg/ml, K3 = 23,5 pg/ml, K4 = 32,2 pg/ml. Die Erhöhung der IL-2-Werte innerhalb jedes Profil: K1 auf 23,6 pg/ml, K2 auf 35,9 pg/ml, K3 auf 35,9 pg/ml, K4 auf 45,8 pg/ml könnte mit einer viralen Infektion in Zusammenhang stehen.

Bei Kontrollpersonen mit chronischer Entzündung liegt das individuelle Profil im Mittel viel höher als bei Kontrollen ohne eine chronische Entzündung: K5 = 90,3 pg/ml und K6 = 134,2 pg/ml. Auch hier lassen sich Erhöhungen unter dem Einfluß eines grippalen Infekts erkennen: bei K5 auf 105,2 pg/ml und K6 auf 147,3 pg/ml. IL-2-Werte von Personen mit chronischer Entzündung liegen in einem Bereich vom 80,5 - 147,3 pg/ml. Trotz externer Einflüsse unterliegen die IL-2 Spiegel beider besprochenen Gruppen geringeren Schwankungen, als die IL-2-Spiegel der Tumorkontrollpersonen.

Abb. 35 - Abb. 38

Tumorkontrollpersonen

Das individuelle IL-2-Profil bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Hals-Bereich schwankt um die Werte: P7 = 24,3 pg/ml, P8 = 21,1 pg/ml, P9 = 19,4 pg/ml, P10 = 19,2 pg/ml, P11 = 31 pg/ml, P12 = 18,3 pg/ml und P13 = 39,2 pg/ml. Die Werte sind tendenziell niedriger als bei den Kontrollen.

Auffällig ist der drastische IL-2 Anstieg (65,6 pg/ml) bei Patient 11. Hier ist es natürlich wichtig, den klinischen Verlauf dieses Patienten zu betrachten. Einige Tage vor der dritten Blutentnahme wurde bei dem Patienten mit dem ersten Zyklus einer Chemotherapie begonnen. Diese Beobachtung deckt sich mit der Aussage von Orditura et al. (2000), der einen erhöhten IL-2-Spiegel bei Patienten mit Lungenkarzinomen unter Chemotherapie fand. Mantovani et al. (1995) beobachteten dies bei Patienten mit Hals-Nasen-Tumoren. Die massive Zytokinfreisetzung beruht höchstwahrscheinlich auf der Zerstörung von Lymphozyten.

Die drastische Abnahme des IL-2-Spiegels bei Patient 11 auf ein Wert vom 3,8 pg/ml ist wahrscheinlich auf einen operativen Eingriff zurückzuführen.

Weiterhin ist eine drastische Abnahme der IL-2-Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze bei Patient 8 auf 6,3 pg/ml, Patient 12 auf 6,3 pg/ml hervorzuheben. Beide Patienten erhielten zum Abnahmezeitpunkt eine Radiotherapie.

2.5. Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α

Bei der Aktivierung lymphoider Zellen kommt es zur proteolytischen Abspaltung eines 42 kDa Fragments von der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, das als löslicher Interleukin-2-Rezeptor α (sIL-2R α) im Blut nachzuweisen ist [Rubin et al.1985]. Der sIL-2R α -Spiegel im Serum wird als ein sensitiver und quantitativer Marker für die Aktivierung zirkulierender PBL -2R α den Aktivierungszustand des Immunsystems in anderen Geweben und Flüssigkeitskompartimenten wiedergeben, da sIL-2R α von diesen Orten in den Zirkulationpool eintreten kann [Rubin et al.1990].

Die Bestimmung des sIL-2R α wurde bei Patienten mit Autoimmun- und Infektionskrankheiten, malignen hämatologischen Erkrankungen sowie Leber- Brust- und Lungentumoren durchgeführt [Rubin et al. 1990]. Weiterhin sind sIL-2R α -Messungen bei Patienten mit Neoplasien des Gastrointestinaltraktes, des Kolons und des Ovariums dokumentiert worden [Murakami et al.1994a, Murakami et al.1994b, Hurteau et al.1995].

Während sIL-2R α bei anderen Krebserkrankungen bereits frühzeitig untersucht wurde, liegt bis heute nur eine geringere Zahl von Untersuchungen bei Patienten mit Tumoren des Kopf-/Halsbereiches vor [Dadian et al. 1993, Hsu et al.1995, Gottschlich et al.1997, Tartour et al.1997]. Bisläng gibt es nur wenige Arbeitsgruppen, die sIL-2R α -Konzentrationsbestimmungen ohne vorherige Stimulierung des Immunsystems mit IL-2 oder anderen Substanzen durchführen. Außerdem beschränken sich die meisten Studien auf die Wirkung einer einzigen Therapieart.

In meiner Arbeit wurde die Konzentration von sIL-2R α im Plasma bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes unter Berücksichtigung Tumormalignität, Lymphknotenmetastasen sowie verschiedener Therapiemodalitäten bestimmt. Außerdem war die Beziehung der sIL-2R α -Konzentration zu den zellulären Immunparametern von Interesse.

2.5.1. Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α bei Kontrollpersonen

Die Serumkonzentration von sIL-2 α erreicht während der früheren Kindheit ihr Maximum, fällt bis zum 10. Lebensjahr auf den typischen Erwachsenen Spiegel kontinuierlich ab und steigt bei älteren Personen wieder an. Geschlechtsunterschiede existieren nicht [Nelson et al. 1987, Kloster et al. 1987, Komp et al. 1988]. Die altersbedingte Veränderung des sIL-R α wurde bei der Auswahl der Kontrollkollektive mitberücksichtigt.

Plasma-Spiegel zwischen 437 und 1090 U/ml (Mittelwert: 738 ± 196 , Median: 694) wurden bei den Probanden ($n = 10$; $M = 34$) festgestellt. Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten von gesunden Erwachsenen überein, bei denen Bereiche zwischen 404 und 942 U/ml, sowie zwischen 50 und 919 U/ml angegeben wurden [Komp et al. 1988, Dadian et al. 1993].

Wesentlich niedrigere Mittelwerte (< 738 U/ml) im Vergleich zu den hier dargestellten wurden in Arbeiten von Lai et al. (1991), Hsu et al. (1995) und Gottschlich et al. (1997) gefunden. Die Blutentnahme und Isolierung des Plasmas bei meiner Studie wurde ohne Berücksichtigung einer grippalen Infektionen durchgeführt, im Gegensatz dazu bevorzugten beispielsweise Lai und Mitarbeiter (1991) infektionsfreie Intervalle. Dies kann eine Erklärung dafür sein, warum die hier vorgestellten Mittelwerte der Kontrollen wesentlich höher liegen als die in der oben genannten Literatur beschriebenen. In der Literatur sind auch Werte zu finden, die deutlich über den hier gemessenen Werten (sIL-2R α 1315 ± 861 U/ml) liegen [Gooding et al. 1995]. Die dort gefundenen erhöhten Werte können mit der geringeren Anzahl der Kontrollproben ($n = 5$) erklärt werden. Eine weitere Ursache der erhöhten Werte kann zum Teil auf die Messmethode zurückgeführt werden. In meiner Arbeit wurde die Messung mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und 620 nm (Korrekturwellenlänge) durchgeführt.

Die Messung nur bei 450 nm ohne Korrektur kann zwar angewendet werden, doch sind die Ergebnisse höher. Zusätzlich spielen noch weitere Faktoren, die zu den differierenden Resultaten bei der Bestimmung von Zytokinen und löslichen Proteinen beitragen können, eine wichtige Rolle. Hier zu nennen sind die Probensammlung und -aufbereitung sowie die Standards der Testkits, die von Firma zu Firma variieren können. Wichtig ist auch die Tatsache, daß die Zytokin- oder lösliche Faktor-Konzentrationen im Plasma höher als im Serum sind [Aziz et al. 1999].

2.5.2. Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α und Tumorstadium

Tab. 45 - Tab. 47 (Abb. 39 - Abb. 41)

sIL-2R α -Konzentration in Abhängigkeit von der Tumorgröße

Es wurde eine signifikante Erhöhung der sIL-2R α -Konzentration mit zunehmender Größe des - T2 und T3 im Vergleich zu den Kontrollpersonen festgestellt. Die Freisetzung des sIL-2R α verhält sich proportional zu der Größe des Primärtumors. So fand sich bei Patienten mit T1 - T2-Tumoren eine niedrigere Konzentration (Median = 698 U/ml) des löslichen Rezeptors ($p = 0,004$) im Vergleich zu Patienten mit T3-Tumoren (Median = 1336 U/ml).

sIL-2R α -Konzentration in Abhängigkeit von der Tumormalignität

Hier konnten weder Unterschiede zu Kontrollpersonen noch Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der sIL-2R α -Konzentration festgestellt werden.

sIL-2 α in Abhängigkeit von Lymphknotenmetastasen

Weder Patienten mit, noch Patienten ohne regionäre Lymphknotenmetastasen wiesen Veränderungen der sIL-2R α -Konzentration untereinander und gegenüber dem Kontrollkollektiv auf.

Die verantwortlichen Mechanismen für die Zunahme der Sekretion des sIL-2R α bei Patienten mit solider fortgeschrittener Neoplasie sind bisher noch unklar. Verschiedene Autoren glauben, daß die sIL-2R α -Blutkonzentration ein Maß für die Lymphozytenproliferation darstellt, - Lymphozyten.

Einige experimentelle Beobachtungen suggerieren, daß die sIL-2R α -Freisetzung von vielen komplexen regulatorischen Interaktionen zwischen den Immunzellen abhängig ist und Monozyten das Absondern des sIL-2R α von den Lymphozyten stimulieren [Crispino et al. 1993].

Vitolo et al. (1993) zeigten, daß HNSCC in situ viele infiltrierende mononukleären Zellen enthalten, die IL-2R exprimieren. Auch sind menschliches HNSCC-Zelllinien und in situ Tumoren in der Lage, die drei Ketten (α , β , γ) des IL-2R zu exprimieren [Weidmann et al. 1992, Yasumura et al. 1994].

Der Anstieg der Serum bzw. Plasma sIL-2R α -Konzentration mit fortschreitender Tumorgroße, die bei Kopf-Hals-Karzinomen in den Untersuchungen von Tartour et al. (1997) und in meiner Arbeit beobachtet werden konnte, spricht dafür, daß auch vom Tumor sIL-2R α freigesetzt werden könnte. Hsu et al. (1991) fanden bei Patienten mit Nasopharyngealkarzinom und Gottschlich et al. (1997) bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Aerodigestivtraktes eine Korrelation zwischen Tumorstadium I-IV und der Zunahmen der sIL-2R α -Konzentration. Bezüglich des Tumormaligntätsgrads fanden Gottschlich et al. (1997) ebenfalls keine Beziehung zur sIL-2R α -Konzentration.

Murakami et al. (1994a, 1994b) fanden, anders als in meiner Untersuchung, eine signifikante Erhöhung des löslichen sIL-2R α bei kolorektalen und Magen-Krebspatienten mit Lymphknotenmetastasen und erklärt diese Erhöhung dadurch, daß die T-Lymphozyten in regionalen Lymphknoten von den metastasierenden Krebszellen stimuliert werden, eine große Menge sIL-2R α zu produzieren.

IL-2 hat eine direkte Wirkung auf IL-2R positive HNSCC-Tumorzellen, wie z.B. die Inhibition des Tumorwachstums oder eine Zunahme der Sensitivität der Tumorzellen für die zytotoxische Aktivität anderer Zytokine. Injektion von IL-2 in Nacktmäuse induziert die Regression von xenotransplantierten menschlichen HNSCC. Bei Kopf-Hals-Karzinom Patienten, behandelt mit IL-2, wurde eine partielle klinische Antwort beobachtet. Höhere sIL-2R α -Spiegel könnten mit den verschiedenen antitumoralen Aktivitäten von IL-2 durch die Verhinderung der IL-2-Bindung an den IL-2 Oberflächenrezeptor interferieren [Tartour et al. 1997].

Durch enzymatische Spaltung des Zelloberflächenrezeptors wird sIL-2R α freigesetzt. Die für die Freisetzung verantwortlichen Enzyme wurden auch bei anderen löslichen Zytokinrezeptoren identifiziert, wie z.B. sTNF-R oder sIL-6R, welche die Antitumoreaktivität der zugehörigen Zytokine behindern [Bazil et al. 1995]. Die Blockierung dieser Enzyme könnte einen neuen therapeutischen Ansatz zur Steigerung der Zytokinaktivität darstellen [Tartour et al. 1997].

2.5.3. Löslicher Interleukin-2-Rezeptor- α -Konzentration unter dem Einfluß verschiedener Therapiemodalitäten

Tab. 48 (Abb. 42)

Die Konzentration von sIL-2R α im Plasma von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes unter Chemo-, Bestrahlung- und Radio-Chemotherapie erreichte wesentlich höhere Werte im Vergleich zu den Kontrollen. Der niedrigste Spiegel fand sich bei Patienten unter Bestrahlungstherapie (Median = 840 U/ml), gefolgt von der Patientengruppen mit Radio-Chemotherapie (Median = 1027 U/ml), mit chirurgischer Therapie (Median = 1058 U/ml) und abschließend mit Chemotherapie (Median = 1400 U/ml).

Plasma-Untersuchungen bei Patienten mit Lungenkarzinomen zeigen postoperativ einen Anstieg der sIL-2R α -Werte gegenüber den präoperativen Werten [Tisi et al. 1992]. Die in meiner Arbeit gemessenen sIL-2R α -Konzentration tendieren postoperativ (präoperativ: Median = 788 U/ml, postoperativ: Median = 1058 U/ml) zu höheren Werten, die jedoch ohne statistische Signifikanz bleiben.

Untersuchungen des sIL-2R α -Spiegels vor der Behandlung bei Patienten mit Hodgkin-Lymphom und nasopharyngealem Karzinom haben gezeigt, daß niedrige Konzentrationen des sIL-2R α mit einer guten Ansprechbarkeit der Behandlung einhergehen, während dies bei höheren Konzentrationen nicht der Fall ist [Gause et al. 1991, Lai et al. 1991].

Bei Lymphomen und Leukämien kann der sIL-2R α -Spiegel als ein prognostischer Marker eingesetzt werden [Barak et al. 1992]. Hier dient die sIL-2R α -Konzentrationsbestimmung als Kontrolle nach einer Chemo- und/oder Radiotherapie. Nicht selten können Rezidive und Metastasen bei einem sinnvollem Einsatz der Tumormarker schon Monate vor einer klinischen Manifestierung erkannt und somit eine Therapieänderung rechtzeitig eingeleitet werden.

In der Untersuchung vom Nollert und Mitarbeiter (1999), in der unter anderem lösliche Zytokinrezeptoren z.B. der sIL-1R-Antagonist, sIL-2R α oder sIL-6R bestimmt wurden, fand man keine Veränderung in der Konzentration des sIL-2R α unter Radio-Chemotherapie. Als Zytostatikum wurde Carboplatin infundiert, dies hatte eine Erhöhung der Serumkonzentration des sIL-1R-Antagonists zur Folge. Dieser Mediator wird von Monozyten/Makrophagen sezerniert und deutet auf eine gesteigerte Aktivierung dieser Zellen hin.

Die in meiner Arbeit applizierten Chemotherapeutika waren dagegen Cisplatin, 5-FU, Folsäure, Dexametason, Rescuvolin und Fortecortin. Anscheinend haben einzelnen oder mehrere dieser Zytostatika einen steigenden Einfluß auf die Produktion von sIL-2R α durch T-Zellen.

2.5.4. Lösliche Interleukin-2-Rezeptor- α -Spiegel und Besonderheiten des Kontrollkollektivs

Der durchschnittliche sIL-2R α Spiegel wurde bei gesunden erwachsenen Probanden untersucht und stellt einen Basis-Spiegel der Immunaktivierung unter normalen physiologischen Bedingungen dar. Da sich der sIL-2R α -Spiegel durch klinisch unscheinbare exogene und endogene Faktoren ändert und dies wiederum die Interpretation erschweren würde, [Komp et al.1988], wurden in meiner Arbeit stark erhöhte sIL-2R α -Spiegel bei 13 Kontrollproben von 2 Kontrollpersonen (Median = 2995, Bereich: 2366 - 4171) nicht in die Auswertung einbezogen. Die gleichen Kontrollpersonen zeigten in der IL-2-Bestimmung ebenfalls erhöhte Werte.

Über den sIL-2 α -Spiegel bei einer chronischen Sinusitis liegen keine Publikationen vor. Bei Virus- infizierten Patienten wird ein Mittelwert \pm SD von 1658 ± 164 (Bereich: 1230 - 2000) angegeben [Noronha et al. 1990].

2.6. Korrelationsanalyse

50 - Tab. 53

Drei Parameter sind für die Regulation der T-Zellvermehrung nach einem Antigenkontakt wichtig, die Konzentration von IL-2, die Dichte der Rezeptoren für IL-2 auf der Zelloberfläche, die nach Kontakt mit dem Antigen erst exprimiert werden, und die Dauer des Kontaktes zwischen IL-2 und seinem Rezeptor [Cantrell et al. 1984]. Da die Menge von sIL-2R α proportional zu der CD25-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche ist [Rubin et al. 1985], wurde dieses Molekül mit dem Anteil CD25-exprimierender Lymphozyten und der CD25-Rezeptordichte verglichen. Die Analyse der Membranexpression von CD25 auf den Blutlymphozyten zeigte keine Korrelation mit der sIL-2R α -Konzentration im Plasma, weder bei Tumor-Patienten, noch bei Kontrollen. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese von Kloster et al. (1987), daß Produktion und Regulation beider Proteine unabhängig voneinander sind.

Die Ausschüttung des IL-2-Proteins durch T-Helferzellen steht bei dem Immunsystem der Kontrollpersonen, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, in Beziehung zum B-Zellanteil (CD19-Marker). Weiterhin konnte bei den Kontrollpersonen eine negative Korrelation zwischen sIL-2R α und den Anteilen CD19- und CD45-positiver Zellen festgestellt werden.

Bei Patienten mit der Tumorgröße T1 - T2 besteht jedoch eine negative Korrelation zwischen der sIL-2R α -Konzentration und der CD25-Rezeptordichte. Man kann daher vermuten, daß eine Disregulation in der T-Zellvermehrung oder -entwicklung vorliegt.

Der Interleukin-2 Plasmaspiegel korreliert bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen positiv mit dem Anteil CD3-exprimierender Zellen sowie negativ mit dem Anteil CD56-positiver Zellen. Die gefundene negative Korrelation zwischen der sIL-2R α -Konzentration und dem Anteil CD8-positiver Zellen bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen deutet auf ein Ungleichgewicht in der Hämatopoese von T-Zell-Subgruppen [Sharma et al. 1991]. Dieses Ungleichgewicht könnte durch eine signifikante Erhöhung der sIL-2R α -Konzentration verursacht werden, die in meiner Arbeit bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen nicht detektiert wurde, aber bei Murakami et al. (1994a, 1994b). Löslicher IL-2R α kann möglicherweise den Einstrom von aktivierten Lymphozyten in den Tumor verhindern [Sharma et al. 1991].

Obwohl unter Operation, Bestrahlungstherapie und Radio-Chemotherapie die prozentualen Anteile bestimmter Immunzellen verändert werden, werden die Interaktionen zwischen den immunkompetenten Zellen nicht beeinträchtigt. Die gefundenen Korrelationen zwischen den Immunzellen der Patienten unter den schon genannten Behandlungsmöglichkeiten sind ebenfalls bei der Kontrollgruppe wiederzufinden.

Es konnte eine Korrelation des Anteils $CD4^+CD8^+$ -Zellen mit dem Anteil der NK-Zellen ($r = 0,5$; $p < 0,001$) bei Patienten mit Chemotherapie beobachtet werden. Weiterhin sind Korrelationen zwischen dem Interleukin-2 Plasmaspiegel und dem Anteil $CD4^+CD8^+$ -Zellen ($r = 0,75$; $p = 0,05$) zu verzeichnen. Eine Korrelation zwischen diesen Parametern ist bei der Gruppe der Kontrollen nicht zu finden. Patienten unter Chemotherapie, speziell mit Cisplatin und 5-FU, erfahren, wie im Abschnitt 3.3 beschrieben, eine starke Zunahme des Anteils von NK-Zellen und der LAK-Zellaktivität. Cisplatin und 5-FU induzieren die Freisetzung von einigen Zytokinen, wie z.B. $IFN-\gamma$, $TNF\alpha$, $-\beta$, $IL-1\beta$, $IL-6$ und $IL-12$ aber nicht von $IL-2$, $IL-4$, $IL-10$ und $IL-15$ [Okamoto et al. 1998]. Das durch aktivierte Monozyten freigesetzte $IL-12$ ist genau wie $IL-2$ in der Lage NK-Zellen zu stimulieren [Trinchieri et al. 1998]. Es ist somit anzunehmen, daß es ein Ungleichgewicht zwischen $IL-2$ produzierenden $CD4^+$ -positiven Zellen und $IL-12$ produzierende Monozyten unter dem Einsatz vom Cisplatin und 5-FU gibt. Die NK-Zell-Vermehrung wird mehr durch die Monozyten beeinflusst. Der Rückgang des Anteils $CD3^+$ -Lymphozyten bei den Patienten ohne Therapie im Vergleich zu den Kontrollen könnte mit dem Tumor in Verbindung gebracht werden. Die Korrelation des $CD3$ -Anteils mit $CD2^+CD25^+$ -positiven Zellen ($r = 0,5$ $p = 0,004$) ist nicht bei Kontrollen zu finden.

Die $sIL-2R\alpha$ -Konzentration bei Patienten ohne Therapie, unter Chemo- und Bestrahlungstherapie korreliert positiv mit dem Anteil $CD3$ -positiver Zellen, jedoch negativ mit dem Anteil $CD56$ -positiver Zellen. Zusätzlich zeigten sich Korrelationen bei Patienten unter Chemotherapie mit dem Anteil $CD8$ -positiver PBL, unter Bestrahlungstherapie mit dem Anteil $CD19$ - und $CD25$ -positiver Zellen sowie der $CD25$ -Rezeptordichte. Hinzu kommt bei der Bestrahlungstherapie eine negative Korrelation zwischen der $sIL-2R\alpha$ -Konzentration und der NK-Zellaktivität. Alle diese Korrelationen sind bei den Kontrollen nicht zu finden. Die Korrelation des $sIL-2R\alpha$ mit zellulären Immunparametern hilft somit gestörte Interaktionen zwischen den Zellen besser zu erfassen.

2.7. Untersuchung immunkompetenter Zellen im Primärtumor, in metastasierten Lymphknoten und im peripheren Blut

Der prozentuelle Anteil immunkompetenter Zellen in sechs Gewebeproben aus dem Primärtumor und acht Gewebeproben aus regionären metastasierten Lymphknoten von Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich wurden immunhistochemisch untersucht. Von besonderem Interesse war die Lokalisierung der Phänotypen: CD45, CD3, CD8 und HLA-DR von TIL und von metastasierten Lymphknoten Lymphozyten (MLNL). Es wurde die Streptavidin-Biotin-Peroxidase Methode angewandt. Die gleichen Antigene wurden bei peripheren Blutlymphozyten der selben Patienten vor der Operation mittels fluoreszenz-gekoppelter monoklonaler Antikörper bestimmt. Die prozentualen Anteile an Lymphozyten in peripheren Blut bei Patienten mit Primärtumor und Lymphknotenmetastasen wurde verfolgt. Anschließend wurden die Korrelationen zwischen peripheren Blutlymphozyten und Lymphozyten im Tumor sowie in metastasierten Lymphknoten analysiert.

2.7.1. Lymphozyten-Infiltrate im Primärtumor und metastasierten Lymphknoten

Das Vorhandensein von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) kann sowohl als unspezifische Entzündungsreaktion, als auch als lokale Antitumorantwort angesehen werden [Wustrow 1995]. Ein vermehrtes Vorhandensein von TIL ist mit einer verbesserten Prognose und Überlebensrate verbunden [Kreider et al. 1984, Wolf et al. 1986, Marrogi et al. 1997, Naito et al. 1998]. Demzufolge wird den mononukleären Zellen, die sich im Gewebe aufhalten, eine besondere Bedeutung für die Tumorablewehr zugeschrieben.

Plattenepithelkarzinome im HNO-Bereich sind sowohl um den Tumor herum, als auch im Tumorstroma mit mononukleären Zellen infiltriert. Es handelt sich dabei vor allem um CD3⁺-T-Lymphozyten [Hiratsuka et al. 1984, Wolf et al. 1986, Guo et al. 1987, Ogawa et al. 1987] und einige Makrophagen [Svennevig et al. 1979]. B-Zellen sind sehr selten und NK-Zellen sind nur in geringer Zahl vorhanden [Vose et al. 1985, Wolf et al. 1986].

Die Majorität der T-Zellen im Tumorgewebe und im Tumor umgebenden Gewebe bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes exprimieren den $\alpha\beta$ -TCR, während $\gamma\delta$ -TCR-positive Zellen weniger als 1,6 % der T-Zellen repräsentieren. Die Anzahl sowohl von $\alpha\beta$ - als auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen ist im Tumorgewebe im Vergleich zum Tumor umgebenden Gewebe erniedrigt [Liavaag et al. 1994].

Tab. 54 - Tab. 55 (Abb. 43)

Der Anteil infiltrierender CD3⁺-Lymphozyten im Primärtumor, identifiziert mit einem Antikörper gegen die ϵ -Kette, ist signifikant erniedrigt im Vergleich zu metastasierten Lymphknoten. Die hier beobachtete Erniedrigung des Anteils CD3-positiver Zellen im Tumor könnte auf einen Defekt in einer der fünf Proteine des CD3-Moleküls hinweisen, zum Beispiel der ϵ - oder ζ -Ketten.

Die verlorengegangene oder erniedrigte Fähigkeit zur Expression der ζ -Kette ist besonders in TIL ausgeprägt [Reichert et al. 1998]. Diese Beobachtung und der Nachweis einer signifikanten Abnahme oder des Nichtvorhandenseins der ζ -Kette in T-Zellen, die mit Tumorzellen koinkubiert wurden, legen nahe, daß diese Änderung durch den Tumor induziert wurde [Rabinowich et al. 1998].

Die Ergebnisse von Reichert et al. (1998) zeigen zudem, daß Patienten mit Tumorstadium III oder IV mit fehlender oder erniedrigter Expression der ζ -Kette bei TIL eine äußerst schlechte Überlebenschance im Vergleich zu Patienten mit normaler ζ -Kette-Expression haben. Eine normale Expression der TCR-Rezeptor-assoziierten ζ -Kette in TIL wird von Reichert et al. (1998) mit einem niedrigen Tumorstadium, gering entwickelten Knoten und der Abwesenheit von Fernmetastasen bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom in Verbindung gebracht. Dagegen ist eine niedrige ζ -Expression mit entwickeltem, fortgeschrittenem Lymphknotenbefall, höherem Primärtumorstadium sowie der Anwesenheit von Fernmetastasen assoziiert.

Alle untersuchten Primärtumor-Gewebe in meiner Arbeit stammten von Patienten mit einem Tumorgrad G3 und vorhandenen Lymphknotenmetastasen, so daß man vielleicht annehmen kann, daß auch die Expression der ϵ -Kette durch den Tumor erniedrigt ist. Dies würde die erniedrigte Anzahl CD3-positiver TIL erklären. Anwesende T-Zellen können demnach von dem Antikörper nicht detektiert werden.

Da sich alle Arbeiten mit der Expression der ζ -Ketten beschäftigen, wird in der folgenden Diskussion hauptsächlich auf diese Kette eingegangen.

Die für den Zerfall der ζ -Kette der im Tumor befindlichen Lymphozyten verantwortlichen Mechanismen sind noch unklar.

Es werden vom Tumor freigesetzte Faktoren [Rabinowich et al. 1998], von Makrophagen stammende Enzyme [Kono et al. 1996] oder Produkte wie H_2O_2 [Loeffler et al. 1992] als hierfür verantwortlich diskutiert.

Die biologischen Folgen der ζ -Expressions-Abnahme bei Immunzellen sind schwerwiegend, da dieses Protein eine Schlüsselrolle in der Vermittlung des T-Zell-Rezeptor- oder Fc γ RIII-Signals ausübt [Correa et al. 1997].

Ob das Fehlen oder die erniedrigte ζ -Ketten-Expression ein Resultat der progressiven Tumorerkrankung ist oder zur Progression dieser Krankheit beiträgt oder aber beides zutrifft bleibt unklar. Studien weisen darauf hin, daß der Zerfall des ζ -Proteins in TIL oder zirkulierenden T-Zellen bei Krebs-Patienten mit einer tumorinduzierten Apoptose der Effektorzellen verbunden ist [Reichert et al. 1998].

In meiner Arbeit wurde gefunden, daß in Tumorgewebe infiltrierende Lymphozyten einen $CD8^+$ -T-Lymphozytenanteil haben, als metastasierten Lymphknoten, die relativ wenig von diesen Zellen enthalten. Im Vergleich zu metastasierten Lymphknoten wurde im Primärtumor ein höherer Anteil an aktivierten (HLA-DR $^+$)-T-Zellen und ein niedrigerer Anteil der CD45-Population gefunden. Obwohl alle besprochenen Veränderungen keine statistische Signifikanz aufwiesen, sollen sie kurz kommentiert werden:

Snyderman et al. (1991) erhielten bei der durchflußzytometrischen Untersuchung von Immunzellen isoliert aus Tumorgewebe, tumorbefallenen und nicht befallenen Lymphknoten, ungefähr zu meiner Studie vergleichbare Ergebnisse. Im Tumorgewebe beobachteten sie einen geringeren CD4 $^+$ - und einen erhöhten CD8 $^+$ -T-Zellanteil im Vergleich zu tumorbefallenen und nicht befallenen Lymphknoten. Die immunhistochemische Untersuchung von zehn Geweben mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Halsbereiches und 41 Gewebeproben mit zervikalen Lymphknotenmetastasen von Horst et al. (1991) läßt ebenfalls bei Gegenüberstellung von Primärtumoren mit entsprechenden zervikalen Lymphknotenmetastasen einen Unterschied in der Verteilung der CD8- bzw. CD4-Zellpopulationen erkennen.

Das zur Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie gehörende OX-40 Glykoprotein wird in erster Linie auf aktivierten CD4 $^+$ -T-Zellen exprimiert. TIL und Lymphozyten aus drainierenden Lymphknoten (DLN), jedoch nicht PBL von Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich, weisen das OX-40-Molekül auf ihrer Zelloberfläche auf.

Desweiteren sezernieren CD4⁺-T Zellen, isoliert aus DLN, TH1 Zytokine (IL-2, γ -Interferon). TIL und PBL setzen T_H2-Zytokine frei [Vetto et al. 1997].

2.7.2. Periphere Blutlymphozyten bei Patienten mit Primärtumor und Lymphknotenmetastasen

Tab. 56 - Tab. 58 (Abb. 44)

Meine Untersuchungen der peripheren Blutlymphozyten bei Patienten mit Primärtumor ergaben eine signifikante Erhöhung der CD3-Population bei gleichzeitiger Erniedrigung der CD45-positiven Zellen. Interessanterweise ist der Anteil infiltrierender CD3⁺-Lymphozyten im Primärtumor erniedrigt. Bei Patienten mit Metastasenbefall der Lymphknoten ist keine nennenswerte Änderung festzustellen.

2.7.3. Korrelationsanalysen

Tab. 59a - Tab. 59b

Es bestand für CD45 positive Lymphozyten ein signifikanter Zusammenhang zwischen peripherem Blut und Tumordinfiltrierenden Lymphozyten von Patienten mit Primärtumor mit einem Spearman Rang Korrelationskoeffizient von $r = 0,9$; $p = 0,05$. Bezüglich der Oberflächenmoleküle CD8, CD3 und HLA-DR konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden.

Während die immunhistochemische Analyse alle Leukozyten umfaßte, wurde bei Auswertung der durchflußzytometrischen Daten gezielt die Population der Lymphozyten untersucht. Aber es ist anzunehmen, daß auch andere Leukozytenpopulationen involviert sind, die spezifische Korrelation liefern könnten. So sollten zudem weitere PBL-Phänotypen und sezernierte Lymphozyten-Faktoren, die Auskunft über den Verlauf der Tumorerkrankung geben könnten, untersucht werden.

Eine Korrelation zwischen PBL von Patienten mit Lymphknotenmetastasen und im Lymphknoten befindlichen Lymphozyten bezüglich der Oberflächenmarker CD8, CD3, CD45 und HLA-DR war nicht zu finden. Von den genannten Antigenen eignet sich nur CD45 als prognostischer Marker.

VI. Zusammenfassung

Im Rahmen einer klinische Studie wurden bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich Lymphozyten-Subpopulationen phänotypisch und funktionell charakterisiert sowie deren Aktivierungszustand anhand der Bestimmung des Interleukin-2-Titers und der Konzentration von löslichem Interleukin-2-Rezeptor α (sIL-2R α) im Plasma gemessen. Hierbei interessierte der Einfluß des Tumors bzw. der Therapieformen wie Operation, Chemo-, Bestrahlungstherapie und kombinierte Radio-Chemotherapie auf diese immunologischen Parameter.

Die Zusammensetzung der Populationen peripherer Blutlymphozyten wird durch die Größe und Malignität des Primärtumors sowie durch Lymphknotenmetastasen beeinflusst. In der Anfangsphase, bei einer Tumormalignität G1, ist eine starke Reduzierung der LAK-Zellaktivität zu sehen, was mit suppressiven Faktoren, wie zum Beispiel Prostaglandin-E2, abgesondert von Monozyten, in Verbindung gebracht werden könnte. Der Anteil CD3-positiver Zellen ist im G3-Stadium sehr stark erniedrigt und deutet auf eine Herunterregulierung der zu dem CD3-Komplex gehörenden ϵ -Kette hin. Weiterhin war bei den HNO-Tumorpatienten der Anteil der CD4-Lymphozyten auffällig erniedrigt, während die Zahl der doppelpositiven CD4⁺CD8⁺-Zellen sowie die HLA-DR-Werte erhöht war.

Einen Monat nach einem operativen Eingriff ließ sich eine starke Zunahme der CD25-Expression, besonders auf T-Lymphozyten erkennen. Die Chemotherapie mit Cisplatin, Folinsäure, 5-FU, Fortecortin - eine sogenannte Polychemotherapie - bewirkte eine starke Erhöhung der NK-Zellpopulation und eine höhere Expression des CD25-Markers auf NK-Zellen sowie eine Zunahme der LAK-Zellfunktion. Die Veränderung der NK-Zellpopulation ist wahrscheinlich auf den Einsatz von Cisplatin und 5-FU zurückzuführen. Die Bestrahlungstherapie bewirkte eine signifikante Abnahme der T-Lymphozyten, besonders der CD4-T-Helferzellen, bei gleichzeitiger Zunahme der CD4⁺CD8⁺-positiven Zellen. B-Zellen sind γ -Strahlen sensitiv, so daß unter Bestrahlung ihr Anteil vermindert wird. Die Erhöhung der NK-Zellpopulation ist wahrscheinlich auf eine Radioresistenz dieser Lymphozytensubpopulation zurückzuführen. Die Radio-Chemotherapie beinhaltet drei Zyklen mit einem Zytostatikagemisch: Cisplatin, 5-FU, Folinsäure, Dexametason, Rescuvolin und Fortecortin und anschließender Behandlung mit γ -Strahlen.

VI. Zusammenfassung

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen deutlich, daß es unter dieser Radio-Chemotherapie zu einem signifikanten Abfall der CD3- und CD2-positiven Zellen, besonders der zytotoxischen T-Zellpopulation, sowie zu einer Erhöhung der CD25-exprimierenden Zellen kommt.

Die Beziehungen der Zellen untereinander sind unter Operation, Bestrahlung- und Radio-Chemotherapie nicht verändert, die Chemotherapie verursacht jedoch vermutlich ein Ungleichgewicht zwischen T-Helferzellen und Makrophagen bezüglich der Vermehrung von NK-Zellen. Bei Patienten ohne Therapie kam es zu einer Abnahme der CD3-positiven Zellen. Dies unterstützt die Hypothese der Herunterregulierung der ϵ -Kette des CD3-Komplexes unter Tumoreinwirkung.

Die Ergebnisse zeigen weiter, daß die alleinige Bestimmung des Interleukin-2 Proteins keine Auskunft über die Wirkung des Tumors auf die Sezernierung dieses Peptids bei einer Tumorkalisation im Gaumen- und Zungenbereich gibt. Erst im Verlauf der Erkrankung können Änderungen durch virale Infektionen und der Einfluß verschiedener Therapiemodalitäten beobachtet werden.

Die Konzentration von sIL-2R α verhielt sich proportional zur Tumorgroße. Dies unterstützt die Hypothese, daß dieser Rezeptor eher vom Tumor abstammt und nicht von den infiltrierten Lymphozyten.

Die Konzentration von sIL-2R α im Plasma war abhängig von der Therapieart. Sie erreichte wesentlich höhere Werte bei Tumorpatienten im Vergleich zu den Probanden. Der niedrigste Spiegel bei Patienten fand sich bei Bestrahlungstherapie (Median = 840 U/ml), die höchsten Werte bei Patienten mit Chemotherapie (Median = 1400 U/ml).

Infiltrierende CD3⁺-Lymphozyten im Primärtumor, identifiziert mit einem Antikörper gegen die ϵ -Ketten, sind im Vergleich zu metastasierten Lymphknoten signifikant erniedrigt. Untersuchungen der peripheren Blutlymphozyten bei Patienten mit Primärtumor ergaben eine signifikante Erhöhung der CD3-Populationen bei gleichzeitiger Erniedrigung des Anteils CD45-positiver Zellen. Es bestand für CD45-positive Zellen ein signifikanter Zusammenhang zwischen peripheren Blutlymphozyten und tumorinfiltrierenden Lymphozyten.

VII. Literaturverzeichnis

- Abbas**, A.K., Murphy, K.M. and Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes.
Nature 383: 787-793
- Aberer**, W. and Leibl, H. (1987) Effect of UVB radiation on the biosynthesis of HLA-DR antigens.
Arch Dermatol Res 279: 321-326
- Adams**, T.E., Bodmer, J.G. and Bodmer, W.F. (1983) Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing the alpha-chain subunits of human Ia alloantigens.
Immunology 50: 613-624
- Ahrens**, P.B. (1993) Role of target cell glycoproteins in sensitivity to natural killer cell lysis.
J Biol Chem 268: 385-391
- Apiller**, T. J. and Hood, L. (1989) Diversity of the immunoglobulin gene superfamily.
Adv Immunol 44: 1-63
- Avadopoulos**, K., Mehta, S., Blackinton, D. and Wanebo, H.J. (1997) Interleukin-10 as a possible mediator of immunosuppressive effect in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.
Ann Surg Oncol 4: 184-190
- Aziz**, N., Nishanian, P., Mitsuyasu, R., Detels, R. and Fahey, J.L. (1999) Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation marker.
Clin Diagn Lab Immunol 6: 89-95
- Banchereau**, J. and Rousset, F. (1992) Human B lymphocytes: Phenotype, proliferation and differentiation.
Adv Immunol 52: 125-263
- Baniyash**, M., Garcia-Morales, P., Bonifacino, J.S., Samelson, L.E. and Klausner, R.D. (1988) Disulfide linkage of the ζ and η chains of the T cell receptor. Possible identification of two structural classes of receptors.
J Biol Chem 263: 9874-9878
- Barkwill**, F.R. and Burke, F. (1989) The cytokine network reviews.
Immunol Today 10: 299-304
- Barak**, V., Ginzburg, M., Kalickman, I. and Polliac, A. (1992) Serum soluble interleukin-2 receptor levels are associated with clinical disease status and histopathological grade in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic lymphoma.
Leuk Lymphoma 7: 431-438
- Baxevanis**, C.N., Reclos G.J., Gritzapis, A.D., Dedousis, G.V., Missitzis, I., Papamichail, M. (1993) Elevated prostaglandin E2 production by monocytes is responsible for the depressed levels of natural killer and lymphokine-activated killer cell function in patients with breast cancer.
Cancer 72: 491-501
- Bazil**, V. (1995) Physiological enzymatic cleavage of leukocyte membrane molecules.
Immunol Today 16: 135-140
- Bellacosa**, A., Almadori, G., Cavallo, S., Cadoni, G., Galli, J., Ferrandina, G., Scambia and Neri, G. (1996) Cyclin D1 Gene Amplification in Human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications.
Clin Cancer Res 2: 175-180
- Belldegrun**, A., Pierce, W., Kaboo, R., Tso, C.L., Shau, H., Turcillo, P., Moldawer, N., Golub, S., de-Kernion, J. and Figlin, R. (1993) Interferon-alpha primed tumor-infiltrating lymphocytes combined with interleukin-2 and interferon-alpha as therapy for metastatic renal cell carcinoma.
J Urol 150: 1384-1390

VII. Literaturverzeichnis

- Bieger, W.P.** (1997) NK-cells: a topical survey. *Immun Infekt* 1: 12-23
- Birk, R.W., Gratchev, A., Hakiy, N., Politz, O., Schledzewski, K., Guillot, P., Orfanos, C.E. and Goerdts, S.** (2001) Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. *Hautarzt* 52:193-200
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. and Wiley, D.C.** (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512
- Blomberg, K., Granberg, C., Hemmilä, I. and Lövgren, T.** (1986) Europium-labelled target cell in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. *J Immunol Methods* 86: 225-229
- Bordignon, C., Carlo-Stella, C., Colombo, M.P., De Vincentiis, A., Lanata, L., Lemoli, R.M., Locatelli, F., Olivieri, A., Rondelli, D., Zanon, P. and Tura, S.** (1999) Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 84: 1110-1149
- Borst, J., Prendiville, M.A. and Terhorst, C.** (1983a) The T3 complex on human thymus-derived lymphocytes contains two different subunits of 20 kDa. *Eur J Immunol* 13: 576-580
- Borst, J., Alexander, S., Elder, J. and Terhorst, C.** (1983b) The T3 complex on human T Lymphocytes involves four structurally distinct glycoproteins. *J Biol Chem* 258: 5135-5141
- Borst, J., Coligan, J.E., Oettgen, H., Pessano, S., Malin, R. and Terhorst, C.** (1984) The δ - and ϵ -chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature* 312: 455-458
- Borst, J., van de Griend R.J., van Oostveen, J.W., Ang, S-L., Melief, C.J., Seidman, J.G. and Bolhuis, R.L.H.** (1987) A T cell receptor γ /CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature* 325: 683- 688
- Böyum, A.** (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Clin Lab Invest Suppl* 97: 77-82
- Brachman, D.G.** (1994) Molecular biology of head and neck cancer. *Semin Oncol* 21: 320-329
- Brandhuber, B.J., Boone, T., Kenney, W.C., and McKay, D.B.** (1987) Three-dimensional structure of interleukin-2. *Science* 238: 1707-1709
- Brandt, E., Ulmer, A.J. and Flad, H.D.** (1986) Binding characteristics of a monoclonal antibody against human IL-2 and its application for IL-2 measurement. *Lymphokine Res* 5 Suppl 1: 35-42
- Breidenbach, T.** (1998) Fortschritte in der Transplantationsimmunologie Basiliximab ein chimärischer monoklonaler Antikörper. *Innovartis* 4: 3-12
- Brenner, M.B., McLean, J., Dialynas, D.P., Strominger, J.L., Smith, J.A., Owen, F.L., Seidman, J.G., Ip, S., Rosen, F. and Krangel, M.S.** (1986) Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322: 145-149

VII. Literaturverzeichnis

- Brittenden**, J. Hey, S.D., Ross, J. and Eremin, O. (1996) Natural killer cells and cancer.
Cancer 77: 1226-1242
- Brunner**, K.T., Mavel, J., Cerottini, M.C. and Chapius, B. (1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.
Immunology 14: 181-196
- Brown**, J.H., Jardetzky, T., Saper, M.A., Samraoui, B., Bjorkman, P.J. and Wiley, Don C. (1988) A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules.
Nature 332: 845-850
- Brown**, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, Don C. (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1.
Nature 364: 33-39
- Bugis**, S.P., Lotzova, E., Savage, H.E., Hester, J.P., Racz, T., Sacks, P.G. and Schantz S.P. (1990) Inhibition of lymphokine-activated killer cell generation by blocking factors in sera of patients with head and neck cancer.
Cancer Immunol Immunother 31: 176-181
- Burnet**, F.M. (1971) Immunological surveillance in neoplasia.
Transplant Rev : 723-725
- Bühling**, K.J., Lepenies, J. and Witt, K. (1995) Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie.
Urban und Schwarzenberg München, Wien Baltimore
- Califano**, J. van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W. and Sidransky, D. (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for cancerization.
Cancer Res 56: 2488-2492
- Cantrell**, D.A. and Smith, K. A. (1984) The Interleukin-2 T-cell System: A new cell growth model.
Science 224: 1312-1316
- Chang**, A.E., Aruga, A., Cameron, M.J., Sondak, V.K., Normolle, D.P., Fox, B.A. and Shu S. (1997) Adoptive immunotherapy with vaccine-primed lymph node cells secondarily activated with anti-CD3 and interleukin-2.
J Clin Oncol 15: 796-807
- Charbonneau**, H., Tonks, N.K., Walsh, K.A. and Fischer, E.H. (1988) The leukocyte common antigen (CD45): A putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 7182-7186
- Clavel**, M., Vermorken, J.B., Cognetti, F., Cappelaere, P., De Mulder, P.H.M., Schornagel, J.H., Tueni, E.A., Verweij, J., Wildiers, J., Clerico, M., Dalesio, O., Kirkpatrick, A. and Snow, G.B. (1994) Randomized comparison of cisplatin, methotrexate, bleomycin and vincristine (CABO) versus cisplatin and 5-fluorouracil (CF) versus cisplatin (c) in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. A phase III study of the EORTC Head and Neck Cancer Co-operative Group.
Ann Oncol 5: 521-526
- Clayton**, L.K., Bauer, A., Jin, Y.-J., D'Adamio, L., Koyasu, S. and Reinherz, E.L. (1990) Characterisation of thymus-derived lymphocytes expressing T α - β CD3 $\gamma\delta\epsilon\zeta$, T α - β CD3 $\gamma\delta\epsilon\eta$, T α - β CD3 $\gamma\delta\epsilon\zeta\eta$ antigen receptor isoforms: analysis by gene transfection.
J Exp Med 172: 1243-1253

VII. Literaturverzeichnis

- Cohen, S., Bigazzi, P.E. and Yoshida, T. (1974)** Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production.
Cellular Immunol 12: 150-159
- Colacchio, T.A., Yeager, M.P. and Hildebrandt, L.W. (1994)** Perioperative immunomodulation in cancer surgery.
Am J Surg 167:174-179
- Cortesina, G., De Stefani, A., Sacchi, M., Rosso, S. and Galeazzi, E. (1993a)** Immunomodulation Therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck.
Head and Neck 15: 266-270
- Correa, M.R., Ochoa, A.C., Ghosh, P., Mizoguchi, H., Harvey, L. and Longo, D.L. (1997)** Sequential development of structural and functional alterations in T cells from tumor-bearing mice.
J Immunol 158: 5292-5296
- Crispino, S., Lissoni, P., Ardizzoia, A., Rovelli, F., Perego, M.S., Grassi, M.G., Barni, S., Pittalis, S. and Tancini, G. (1993)** Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on soluble interleukin-2 receptor serum levels and their relation to neopterin and tumor necrosis factor-alpha in cancer patients.
J Biol regul Homeost Agents 7: 92-94
- Dadian, G., Riches, P.G., Henderson, D.C., MacLennan, K., Lorentzos, A., Moore, J., Hobbs, J.R. and Gore, M.E. (1993)** Immune changes in peripheral blood resulting from locally directed interleukin-2 therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck.
Oral Oncol Eur J Cancer 29B: 29-34
- Dammer, R., Wurm, E.-M., Niederdellmann, H. and Fleischmann, R.K. (1997)** Immunohistochemical investigation of venous blood in patients with manifest oral cavity carcinomas, precancerous lesions and benign tumours and chronic alcoholics.
Mund Kiefer Gesichts Chir 1: 95-103
- Davies, D.A. (1957)** What are tumor specific antigens?
Nature 254: 653-654
- Dawson, D.E., Everts, E.C., Vetto, R.M. and Burger, D.R. (1985)** Assessment of immunocompetent cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma.
Ann Otol Rhinol Laryngol 94: 342-345
- Decker, J. and Goldstein, J. (1982)** Risk factors in head and neck cancer.
N Engl J Med 306: 1151-1155
- Dianzani, U., Regolia, V., Malavasi, F., Pileri, A., Janeway, C.A. Jr. and Bottomly, K. (1992)** Isoform-specific associations of CD45 with accessory molecules in human T lymphocytes.
Eur J Immunol 22: 365-371
- Dietz, A., Heimlich, F., Daniel, V., Polarz, H., Weidauer, H. and Maier, H. (2000)** Immunomodulating effects of surgical intervention in tumors of the head and neck.
Otolaryngol Head Neck Surg 123: 132-139
- Dische, S. (1994)** Radiotherapy - new fractionation schemes.
Semin Oncol 21: 304-310
- Donnerstag, B., Henzel, K., Staib-Sebler, E., Holzer, K. und Lorenz, M. (1993a)** Phänotypisierung und Funktionsanalyse von Lymphocyten bei Patienten mit colorectalem Carcinom.
Chir Forum (Forumband): 101-104

VII. Literaturverzeichnis

- Donnerstag**, B., Oltrogge, J.B., Henzel, K., Rüenauer, A. and Baum, R. (1993b) Functional analysis of peripheral blood lymphocytes from healthy volunteers.
J Clin Lab Immunol 40: 91-95
- Donnerstag**, B., Henzel, K., Staib-Sebler, E., Oltrogge, J.B., Lorenz, M. and Träger, L. (1994) Relevance of immunological parameters in progression of colorectal carcinoma.
Oncology Reports 1: 419-422
- Dubben**, H.H. Baumann, M., Fassbender, T. and Beck-Bornholdt, H.P. (1992) Hyperfractionated radiotherapy of head and neck tumours.
Strahlenther Onkol 168: 373-382
- Dumonde**, D.C., Wolstencroft, R.A., Panayi, G.S., Matthew, M., Morley, J. and Howson, W.T. (1969) „Lymphokines“: Non-Antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation.
Nature 224: 38-42
- Dukovich**, M., Wano, Y., Thuy, L.T.B., Katz, P., Cullen, B.R., Kehrl, J.H. and Greene, W.C. (1987) A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high affinity interleukin-2 receptors.
Nature 327: 518-522
- Eckardt**, A. (1996) 4th international conference on head and neck cancer.
Onkologie 2: 517-528
- Eicher**, S.A., Clayman, G.L., Liu, T.-J., Shillito, E.J., Storthz, K.A., Roth, J.A. and Lotan, R. (1996) Evaluation of topical gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma in a organotypic model.
Clin Cancer Res 2: 1659-1664
- Elangbam**, C.S, Qualls, C.W. Jr and Dahlgren, R.R. (1997) Cell adhesion molecules-update.
Vet Pathol 34: 61-73
- Eskinazi**, D.P., Perna, J.J. and Mihail, R. (1987) Mononuclear cell subsets in patients with oral cancer.
Cancer 60: 376-381
- Eura**; M., Ogi, K., Chikamatsu, K., Lee, K.D., Nakano, K., Masuyama, K., Itoh, K. and Ishikawa, T. (1995) Expression of the MAGE gene family in human head and neck squamous cell carcinomas.
Int J Cancer 64: 304-308
- Farace**, F., Angevin, E., Vanderplancke, J., Escudier, B. and Triebel, F. (1994) The decreased expression of CD3 zeta chains in cancer patients is not reversed by IL-2 administration.
Int J Cancer 59: 752-755
- Farrar**, W.L., Linnekin, D., Brini, A.T., Kelvin, D.J. and Michiel, D.F. (1990) The interleukin-2 receptor complex: structure, gene regulation and signal transduction. Ligands, Receptors, and signal transduction in regulation of lymphocyte function (Cambier, J.C. ed.).
American Society for Microbiology, Washington: pp. 267-295
- Faust**, R.A., Tawfic, S., Davis, A.T., Bubash, L.A. and Ahmed K. (2000) Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2-alpha inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro.
Head Neck 22: 341-346

VII. Literaturverzeichnis

- Fischer, S., Marie-Cardine, A., Ramos-Morales, F., Bougeret, C., Soula, M., Maridonneau-Parini, I. and Benarous R. (1994)** P56lck A lymphocyte specific protein tyrosine kinase: activation, regulation and signal transduction.
Cell Mol Biol 40: 605-609
- Fowlkes, B.J. and Pardoll, D.M. (1989)** Molecular and cellular events of T cell development.
Adv Immunol 44: 207-264
- Furusaka T., Yokode, Y., Nakajima M., Iida, H., Kida, A., Kikuchi, K. and Tomita, H. (1986)** T-lymphocyte subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.
Auris Nasus Larynx 13 (Suppl 1): 143-148
- Gao, G.F. and Jakobsen, B.K. (2000)** Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor.
Immunol Today 21: 630-636
- Gause, A., Roschansky, V., Tschiersch, A., Smith, K., Hasenclever, D., Schmits, R., Diehl, V. and Pfreundschuh, M. (1991)** Low serum interleukin-2 receptor levels correlate with a good prognosis in patients with Hodgkin's lymphoma.
Ann Oncol (Suppl. 2): 43-47
- Gehman, L.O. and Robb, R.J. (1984)** An ELISA-based assay for quantitation of human interleukin 2.
J Immunol Methods 74: 39-47
- Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W. and Smith K.M. (1978)** T-cell growth factor: Parameters of production and quantitative microassay for activity.
J Immunol 120: 2027-2032
- Golde, D.W. and Gasson, J.C. (1988)** Blutbildende Hormone.
Spektrum der Wissenschaft: 70-79
- Golde, D.W. (1992)** Transplantation von Stammzellen des Knochenmarks.
Spektrum der Wissenschaft: 70-78
- Goldrath, A.W. and Bevan, M.J (1999)** Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire.
Nature 402: 255-262
- Gonzalez, F.M., Vargas, J.A., Gea-Banacloche, J.C., Garcia J.R., Berrocal, E., Gorriz, C. and Duran-
tez, A. (1994)** Functional and phenotypic analysis of T-lymphocytes in laryngeal carcinoma.
Acta Otolaryngol 114: 663-668
- Gooding, R., Riches, P., Dadian, G., Moore, J. and Gore, M. (1995)** Increased soluble interleukin-2
receptor concentration in plasma predicts a decreased cellular response to IL-2.
Br J Cancer 72: 452-455
- Gore, S.D., Kastan, B. and Civin, C.I. (1991)** Normal human bone marrow precursors that express
terminal deoxynucleotidyl transferase include T-cell precursors and possible lymphoid stem
cells.
Blood 77: 1681-1690
- Gottschlich, S., Görögh, T., Lippert, B.M., Niemann, A.M., Folz, B.J. and Werner, J.A. (1995)** The
soluble interleukin-2 receptor - an unspecific marker in the serum of patients with squamous
cell carcinoma of the upper aerodigestive tract.
Anticancer Res 15: 2417
- Gottschlich, S., Görögh, T., Lippert, B.M., Niemann, A.M., Folz, B.J. and Werner, J.A. (1997)** The
soluble Interleukin-2 receptor - A marker for squamous cell carcinoma of the upper aeri-
digestive tract.
Anticancer Res 17: 2921-2922

VII. Literaturverzeichnis

- Gray**, W.C., Chretien, P.B., Suter, C.M., Revie, D.R., Tomazic, V.T., Blanchard, C.L., Aygun, C., Amornmarn, R. and Ordonez, J.V. (1985) Effects of radiation therapy on T-lymphocyte subpopulations in patients with head and neck cancer.
Otolaryngol Head Neck Surg 93: 650-660
- Greenfield**, E.A., Nguyen, K.A. and Kuchroo, V.K. (1998) CD28/B7 costimulation: a review.
Crit Rev Immunol 18:389-418
- Grimm**, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z. and Rosenberg, S.A. (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes.
J Exp Med 155: 1823-1841
- Grimm**, E.A., Ramsey, K.M., Mazumder, A., Wilson, D.J., Djeu, J.Y. and Rosenberg S.A. (1983) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells.
J Exp Med 157: 884-897
- Guo**, M., Rabin, B.S., Johnson, J.T. and Paradis I.L. (1987) Lymphocytes phenotypes at tumor margins in patients with head and neck cancer.
Head Neck Surg 9: 165-217
- Gupta**, S. (1989) Mechanisms of transmembrane signalling in human T cell activation.
Mol Cell Biochem 91: 45-50
- Hadden**, J.W. (1997) The immunopharmacology of head and neck cancer: an update.
Int J Immunopharmacol 19: 629-644
- Harris**, C.L. and Morgan, B.P. (1995) Characterization of a glycosyl-phosphatidylinositol anchor-deficient subline of Raji cells. An analysis of the functional importance of complement inhibitors on the Raji cell line.
Immunology 86: 311-318
- Hatakeyama**, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, T., Miyasaka, M. and Taniguchi, T. (1989) Interleukin-2 receptor β chain gene: Generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNAs.
Science 244: 551-556
- Haynes**, B.F. (1981) Human T lymphocyte antigens as defined by monoclonal antibodies.
Immunol Rev 57: 127-161
- Haynes**, B.F. (1984) The human thymic microenvironment.
Adv Immunol 36: 87-142
- He**, Y., Zeng, Q., Drenning, S.D., Melhem, M.F., Tweardy, D.J., Huang, L. and Grandis J.R. (1998) Inhibition of human squamous cell carcinoma growth in vivo by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter.
J Natl Cancer Inst 90: 1080-1087
- Heimdal**, J.H., Aarstad, H.J., Klementsens, B. and Olofsson J. (1998) Disease stage related in vitro responsiveness of peripheral blood T-lymphocytes in patients with head and neck carcinoma.
Acta Otolaryngol 118: 887-891
- Heimlich**, F., Dietz, A., Daniel, V. and Maier, H. (1999) Immunosuppression caused by head and neck surgery.
HNO 47: 885-892

VII. Literaturverzeichnis

- Hemmilä, I., Dakubu, S., Mukkala, V-M., Siitari, H. and Lövgren, T. (1984)** Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays.
Analyt Biochem 137: 335-343
- Henny, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E. and Gillis, S. (1981)** Interleukin-2 augments natural killer cell activity.
Nature 291: 335-338
- Henzel, K. (1995)** Bestimmung der Plasmakonzentrationen von 5-Fluoruracil und Metaboliten mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie und Untersuchung immunologischer Parameter bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom.
Promotionsarbeit in Fachbereich Biochemie, Pharmazie, Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M
- Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R. (1981)** Natural killer cells: Their role in defenses against disease.
Science 214: 24-30
- Herberman, R.B. (1987)** Lymphokine-activated killer cell activity.
Immunol Today 8: 178-180
- Herrmann, F. and Mertelsmann, R. (1989)** Polypeptides controlling hematopoietic cell development and activation.
Blut 58: 117-128
- Hiratsuka, H., Imamura, M., Kasai, K., Kamiya, K., Ishii, Y., Kohama, G. and Kikuchi, K. (1984)** Lymphocytes subpopulations and T-cell subsets in human oral cancer tissues: immunohistologic analysis by monoclonal antibodies.
Am J Clin Pathol 81: 464-470
- Holcombe, R.F., Stewart, R.M., Betzing, K.W. and Kannan, K (1994)** Alteration in lymphocyte phenotype associated with administration of adjuvant levamisole and 5-fluorouracil.
Cancer Immunol Immunother 38: 394-398
- Holtmann, H. and Resch, K. (1995)** Cytokines.
Naturwissenschaften 82: 178-187
- Horst, H.A. and Horny, H.P. (1991)** Tumor-infiltrating lymphoreticular cells. Histologic and immunohistologic investigations performed on metastasizing squamous cell carcinomas of the head and neck.
Cancer 68: 2397-2402
- Howard, F.D. and Ledbetter, J.A., Wong, J., Bieber, C.P., Stinson, E.B. and Herzenberg, L.A. (1981)** A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation.
J Immunol. 126: 2117-2122
- Hsu, M-M., Chen, Y-J., Chang, Y-L., Ko, J-Y. and Sheen, T-S. (1995)** Soluble interleukin-2 receptor as a clinical parameter for nasopharyngeal carcinoma.
Asian Pac J Allergy Immunol 13: 1-4
- Hurteau, J.A., Woolas, R.P., Jacobs, I.J., Oram, D.C., Kurman, C.C., Rubin, L.A., Nelson, D.L., Berchuck, A., Bast, R.C. and Mills, G.B. (1995)** Soluble interleukin-2 receptor alpha is elevated in sera of patients with benign ovarian neoplasms and epithelial ovarian cancer.
Cancer 76: 1615-1620
- Ishitoya, J., Toriyama, M., Oguchi, N., Kitamura, K., Ohshima, M. and Asano, K. (1989)** Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck.
Br J Cancer 59: 559-562

VII. Literaturverzeichnis

- Janeway**, C.A. and Travers, P. (1995) Spektrum Lehrbuch Immunologie.
Spektrum akademischer Verlag
- Janossi**, G., Tidman, N., Papageorgiou, E.S., Kung, P.C. and Goldstein, G. (1981) Distribution of T lymphocyte subsets in the human bone marrow and thymus: an analysis with monoclonal antibodies.
J Immunol 126: 1608-1613
- Ju**, G., Collins, L., Kaffka, K.L., Tsien, W.-H., Chizzonite, R., Crow, R., Bhatt, R., and Kilian, P.L. (1987) Structure-Function analysis of human interleukin-2 identification of amino acid residues required for biological activity.
J Biol Chem 262: 5723-5731
- Justement**, L.B., Campbell, K.S., Chien, N.C. and Cambier, J.C. (1991) regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45.
Science 252:1839-1842
- Kappler**, J., Kubo, R., Haskins, K., Hannum, C., Marrack, P., Pigeon, M., McIntyre, B., Allison, J. and Trowbridge, I. (1983) The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man: identification of constant and variable peptides.
Cell 35: 295-302
- Kazim**, K., Wild, G and Ward, A. (1998a) Anti-soluble interleukin-2R alpha combinations measure different epitopes: comparison between different anti-sIL-2R alpha antibody combinations and a newly developed in-house sIL-2R alpha sandwich ELISA.
J Clin Lab Immunol 50: 17-25
- Kazim**, K., Wild, G and Ward, A. (1998b) Soluble interleukin-2R alpha test kits measure different epitopes: sIL-2R alpha test kits comparison with a newly developed inhouse sIL-2R alpha sandwich ELISA.
J Clin Lab Immunol 50: 55-61
- Keegan**, A.D. and William, E.P. (1992) Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways.
Immunol Today 13: 63- 68
- Klehr**, N.W. (1992) Therapeutische Möglichkeiten zur Verwertung von autologem Tumorgewebe.
Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren 10: 820-826
- Kirchner**, H., Kruse, A., Neustock, P. und Rink, L. (1993) Cytokine und Interferone: Botenstoffe des Immunsystems.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin Oxford
- Kloster**, B.E., John, P.A., Miller, L.E., Rubin, L.A., Nelson, D.L., Blair, D.C. and Tomar, R.H. (1987) Soluble interleukin 2 receptors are elevated in patients with AIDS or at risk of developing AIDS.
Clin Immunol Immunopathol: 440-446
- Knapp**, W., Dörken, B., Rieber, P., Schmidt, R.E. Stein, H. and von dem Borne, A.E. (1989) CD antigens 1989.
Blood 74: 1448-1450
- Koldovsky**, U., Perschmann, U. und Feldhammer, B. (1987) Lymphozyten-Subpopulationen bei Brustkrebspatientinnen in verschiedene Krankheitsstadien. In: Breitbach, G.P. und Bastert, G. (ed.), Klinische Tumormunologie in der Gynäkologie,
Zuckschwerdt Verlag München-Bern-Wien-San Francisco

VII. Literaturverzeichnis

- Komp**, D.M., Shapiro, E. and McNamara, J. (1988) soluble interleukin-2 receptor in childhood non-hodgkins lymphoma.
Blood 71: 1172-1173
- Kono**, K., Salazar-Onfray, F., Petersson, M., Hansson, J., Masucci, G., Wasserman, K., Nakazawa, T., Anderson, P. and Kiessling, R. (1996) Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell and natural killer cell-mediated cytotoxicity.
Eur J Immunol 26: 1308-1313
- Koretzky**, G.A., Picus, J., Thomas, M.L. and Weiss, A. (1990) Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway.
Nature 346: 66-68
- Kornfehl**, J., Formanek, M., Temmel, A., Knerer, B. and Willheim M. (1996) Antiproliferative effects of the biologically active metabolite of vitamin D₃ (1,25 [OH]₂ D₃) on head and neck squamous cell carcinoma cell lines.
Eur Arch Otorhinolaryngol 253: 341-344
- Kreider**, J.W., Bartlett, G.L. and Butkiewicz, B.L. (1984) Relationship of tumor leukocytic infiltration to host defense mechanisms and prognosis.
Cancer Metastasis Rev 3: 53-74
- Kumazawa**, H. and Hess, M. (1991) Influence of serum derived from patients with head and neck cancer on natural killer cell activity.
Oncology 48: 372-376
- Kung**, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L. and Schlossman, S.F. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens.
Science 206: 347-349
- Kuss**, I., Saito, T., Johnson, J.T. and Whiteside, T.L. (1999) Clinical significance of decreased zeta chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer.
Clin Cancer Res 5: 329-334
- Lai**, J.P., Tao, Z.D., Xiao, J.Y., Zhao, S.P. and Tian YQ. (1997) Effect of photodynamic therapy on selected laboratory values of patients with nasopharyngeal carcinoma.
Ann Otol Rhinol Laryngol 106: 680-682
- Lai**, K.N., Ho, S., Leung, J.C.K. and Tsao, S.Y. (1991) Soluble interleukin-2 receptor in patients with nasopharyngeal carcinoma.
Cancer 67: 2180-2185
- Lang**, S., Zeidler, R., Mayer, A., Reiman, V., Wollenberg, B., and Kastenbauer E. (1999) Targeting head and neck cancer by GM-CSF-mediated gene therapy in vitro.
Anticancer Res 19: 5335-5339
- Lanier**, L.L., Le A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. and Phillips, J.H. (1986a) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu 19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T-lymphocytes.
J Immunol 136: 4480-4486
- Lanier**, L.L., Phillips, J.H., Hackett, J, Jr., Tutt, M. and Kumar, V. (1986b) Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function.
J Immunol 137: 2735-2739
- Lakhdar**, M., Queslati, R., Ellouze, R., Thameur, H., Cammoun, M., Khedhiri, N., (1989) High interferon titre and defective NK-cell activity in the circulation of nasopharyngeal carcinoma patients.
Int J Cancer 43: 543-548

VII. Literaturverzeichnis

- Ledbetter**, J.A., Deans, J.P., Aruffo, A., Grosmaire, L.S., Kanner, S.B., Bolen, J.B. and Schieven, G.L. (1993) CD4, CD8 and the role of CD45 in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 5:334-340
- Leonard**, W.J., Depper, J.M., Crabtree, G.R., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Robb, R.J., Kronke, M., Svetlik, P.B., Pfeffer, N.J., Waldmann, T.A. and Greene, W.C. (1984) Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature* 311: 626-635
- Leong**, A.S.Y. (1993) «Immunohistochemistry: theoretical and practical aspects», In Leong A.S.Y Ed, *Applied Immunohistochemistry for the Surgical Pathologist*, Edward Arnold, London: pp. 2-22
- Leong**, A.S.Y., Milios, J. and Leog, J.F. (1996) Epitope retrieval with microwaves. A comparison of citrate buffer and EDTA with three commercial retrieval solutions. *Appl Immunohistochem* 4: 201-207
- Liavaag**, P.G. Johannessen, A.C., Nilsen, R. and Jonsson, R. (1994) Analysis of T-cell receptor expressing lymphocytes infiltrating squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 251: 452-456
- Liebovitz**, D. (1994) Nasopharyngeal carcinoma: The Epstein-Barr virus association. *Semin Oncol* 21: 376-381
- Lissoni**, P., Barni, S., Rovelli, F., Viviani, S., Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Tancini, G. (1990) The biological significance of soluble interleukin-2 receptors in solid tumors. *Eur J Cancer* 26: 33-36
- Loeffler**, C.M., Smyth, M.J., Longo, D.L., Kopp, W.C., Harvey, L.K., Tribble, H.R., Tase, J.E., Urba, W., Leonard, A.S., Young, H.A. and Ochoa, A.C. (1992) Immunoregulation in cancer-bearing hosts: down-regulation of gene expression and cytotoxic function in CD8⁺ T cells. *J Immunol* 149: 949-956
- Lötzerich**, H. and Hirt, W. (1997) Flow cytometric non-radioactive method for the determination of the cytotoxic activity of natural killer cells: comparison with the classical ⁵¹Cr-release assay. *J Lab Med* 21: 13-20
- Louagie**, H., Van Eijkeren, M., Philippe, J., Thierens, H. and de Ridder, L. (1999) Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 75: 767-771
- Lozzio**, C.B. and Lozzio, B.B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-334
- Lozzio**, B.B. and Lozzio, C.B. (1979) Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leukemia Res* 3: 363-370
- Lövgren**, J. and Blomberg, K. (1994) Simultaneous measurement of NK cell cytotoxicity against two target cell lines labelled with fluorescent lanthanide chelates. *J Immunol Methods* 173: 119-125
- Mahmoud**, M.S., Huang, N., Nobuyoshi, M., Lisukov, I.A., Tanaka, H. and Kawano, M.M. (1996) Altered Expression of Pax-5 gene in human myeloma cells. *Blood* 87: 4311-4315
- Maier**, H., Daniel, V., Heimlich, F., Frank, C. and Opelz, G. (1995) Cellular immune defect caused by postoperative irradiation in patients with squamous epithelial carcinomas of the upper aerodigestive tract. *HNO* 43: 364-370

VII. Literaturverzeichnis

- Malkovsky**, M., Loveland, B., North, M., Asherson, G.L., Gao, L., Ward, P., and Fiers, W. (1987) recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes.
Nature 325: 262-265
- Mantovani**, G., Maccio, A., Bianchi, A., Curreli, L., Ghiani, M., Santona, M.C. and Del Giacco, G.S. (1995) Megestrol acetate in neoplastic anorexia/cachexia: clinical evaluation and comparison with cytokine levels in patients with head and neck carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy.
Int J Clin Lab Res 25: 135-141
- Marrack**, P. and Kappler, J. (1986) The antigen-specific, Major Histocompatibility complex-restricted receptor on T cells
Adv Immunol 38: 1-30
- Marrogi**, A.J., Munshi, A., Merogi, A.J., Ohadike, Y., El-Habashi, A., Marrogi, O.L. and Freeman, S.M. (1997) Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma.
Int J Cancer 74: 492-501
- Martin**, E.P., Arnaud, J., Alibaud, L., Gouaillard, C., Llobera, R., Huchenq-Champagne, A., Rubin, B. (1999) Molecular mechanisms in the TCR (TCR alpha beta-CD3 delta epsilon, gamma epsilon) interaction with zeta 2 homodimers: clues from a 'phenotypic revertant' clone.
Int Immunol 11: 1005-1015
- Mason**, D.Y., Cordell, J.L., Gaulard, P., Tse, A.G.D. and Brown, M.H. (1992) Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence.
J Clin Pathol 45: 1084-1088
- Matsumoto**, A.K., Kopicky-Burd, J., Carter, R.H., Tuveson, D.A., Tedder, T.F. and Fearon, D.T. (1991) Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19.
J Exp Med 173: 55-64
- Matthews**, D.J., Clark, P.A., Herbert, J., Morgan, G., Armitage, R.J., Kinnon, C., Minty, A., Grabstein, K.H., Caput, D. and Ferrara, P. (1995) Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma-chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13, and IL-15.
Blood 1995 85: 38-42
- Meuer**, S.C., Schlossman, S.F. and Reinherz, E. (1982) Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4⁺ and T8⁺ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions.
Proc Natl Acad Sci USA 79: 4395- 4399
- Mickel**, R.A. Kessler, D.J. Taylor, J.M.G. and Lichtenstein, A. (1988) Natural killer cell cytotoxicity in the peripheral blood, cervical lymph nodes, and tumor of head and neck cancer patients.
Cancer Res 48: 5017-5022
- Micksche**, M. und Vinzenz (1992) Immundiagnostik und Immuntherapie bei Kopf-Hals-Malignomen 209-233. In: Chirurgische Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen Hrsg Vinzenz, K., Waclawiczek, H.W. Springer Verlag Wien New York
- Miller**, T., Auld, J., Jessup, E., Rhodes, A. and Ashton-Key, M. (1995) Antigen unmasking in formalin-fixed routinely processed paraffin wax-embedded sections by pressure cooking: a comparison with microwave heating and traditional methods.
Adv Anat Pathol 2: 60-64
- Minami**, Y., Kono, T., Miyazaki, T. and Taniguchi, T. (1993) The IL-2 Receptor complex: Its structure, function and target genes.
Annu Rev Immunol 11: 245-267

VII. Literaturverzeichnis

- Mizel**, S.B., and Farrar, J.J. (1979) Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors (letter).
Cell Immunol 48: 433-436
- Moll**, R (1993) Cytokine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren.
Fischer, Stuttgart
- Morgan**, D.A. and Ruscetti, F.W. (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.
Science : 107-108
- Mosmann**, T.R. and Sad, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: T_H1, T_H2 and more.
Immunol Today 17:138-146
- Murakami**, S., Satomi, A., Ishida, K., Murai, H. and Okamura, Y. (1994a) Serum soluble interleukin-2 receptor in colorectal cancer.
Acta Oncologica 33: 19-21
- Murakami**, S., Satomi, A., Ishida, K., Murai, H. Matsuki, M. and Hashimoto, T. (1994b) Serum-soluble interleukin-2 receptor concentrations in patients with gastric cancer.
Cancer 74: 2745-2748
- Nadler**, L.M. and Anderson, K.C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J.F. and Schlossmann, S.F. (1983) B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal and malignant B lymphocytes.
J Immunol 131: 244-250
- Nagler**, A., Lanier, L.L. and Phillips, J.H. (1990) Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16⁺ natural killer cells in vivo.
J Exp Med: 1527-1533
- Naito**, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H. and Ohtani H. (1998) CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer.
Cancer Res 58: 3491-3494
- Nakanishi**, K., Cohen, D.I., Blackman, M., Niesel, E., Ohara, J., Hamaoka, T., Koshland, M.E. and Paul, W.E (1984) Ig RNA expression in normal B cells stimulated with anti-IgM antibody and T cell-derived growth and differentiation factors.
J Exp Med 160: 1736-1751
- Naronha**, I.L. Daniel, V., Rambausek, M., Waldherr, R. and Opelz, G. (1990) Soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) and tumor necrosis factor Plasma levels in renal allograft recipients.
Transplant Proc 22: 1859-1860
- Nelson**, D.L., Wagner, D.K., Marco , L. et al. (1987) An analysis of soluble IL-2 receptor in human neoplastic disorders. In: Albertini, A., Lentant, C., Poeletti, R. eds.
Biotechnol
Clin Med, New York Raven Press: 277-286
- Ning**, J.P., Yu, M.C. Wang, Q.S. and Henderson, B.E. (1990) Consumption of salted fish and other risk factor for nasopharyngeal carcinoma (NPC) in Tianjin, a low-risk region for NPC in the People's republic of china.
J Natl Cancer Inst 82: 291-296
- Nollert**, J., Rudat, V., Daniel, V., Maier, H. and Dietz, A (1999) Effect of primary radiochemotherapy on cellular and subcellular immunologic parameters.
HNO 47: 1058-1062

VII. Literaturverzeichnis

- O'Brien**, M. et al. Schofield, J.B., Lorentzos, A., Moore, J., Atkinson, H., Henk, J.M., MacLennan, K.A. and Gore, M:E. (1994) The use of cisplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy in an unselected group of patients with recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck.
Eur J Cancer B Oral Oncol 30b: 265-267
- Ogawa**, Y., Maeda, T., Seguchi, H., Yoshida, S., Inomata, T., Hamada, F., Kishimoto, S., Saito, H. and Osaki, T. (1987) Immunohistochemical study of mononuclear cell infiltrates in squamous cell carcinoma of oral cavity and paranasal sinus.
Oncology 44: 219-223
- Okamoto**, M., Kasetani, H., Kaji, R., Goda, H., Ohe, G., Yoshida, H. and Sato, M. (1998) Cis-Diamminedichloroplatinum and 5-fluorouracil are potent inducers of the cytokines and natural killer cell activity in vivo and in vitro.
Cancer Immunol Immunother 47: 233-241
- Orditura**, M., Romano, C., De Vita, F., Galizia, G., Lieto, E., Infusino, S., De Cataldis, G. and Catalano, G. (2000) Behaviour of interleukin-2 serum levels in advanced non-small- cell lung cancer patients: relationship with response to therapy and survival.
Cancer Immunol Immunother 49: 530-536
- Ortaldo**, J.R., Oldham, R.H., Cannon, G.C. and Herbermann, R.B. (1977) Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line.
J Natl Cancer Inst 59: 77-83
- Ortaldo**, J.R., Mason, A. and Overton, R. (1986) Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors.
J Exp Med 164: 1193-1205
- Pabst**, R. (1988) The spleen in lymphocyte migration.
Immunol Today 9: 43-45
- Pai**, K. and Sodhi, A. (1992) Studies on the intracellular Ca²⁺, protein kinase activity, and ATP contents of cisplatin- and rIFN- γ -treated non-adherent mononuclear cells.
Biochem Int 26: 1017-1024
- Perussia**, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N.L., Faust, J., Rumpold, H., Kraft, P. and Lanier, L.L. (1984) The Fc-receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies using monoclonal antibodies.
J Immunol 133: 180-189
- Peters**, L.J. Ang, K.K. and Thames, H.D. jr (1988) Accelerated fractionation in the radiation treatment of head and neck cancer. A critical comparison of different strategies.
Acta Oncol 27: 185-194
- Pinto**, A., Gattei, V., Soligo, D., Parravicini, C. and del Vecchio, L. (1994) New molecules bursts at the leukocyte surface. A comprehensive review based on 5th International Workshop on Leukocyte Differentiation Antigens.
Leukemia 8: 347-358
- Prasad**, A.S., Kaplan, J., Beck, F.W., Penny, H.S., Shamsa, F.H., Salwen, W.A., Marks, S.C. and Mathog, R.H. (1997) Trace elements in head and neck cancer patients: zinc status and immunologic functions.
Otolaryngol Head Neck Surg 116: 624-629
- Pulvertaft**, R.J.V. (1964) Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma).
Lancet 1: 238-240

VII. Literaturverzeichnis

- Rabinowich**, H., Reichert, T.E., Kashii, Y., Bell, M.C. and Whiteside, T.L. (1998) Lymphocytes apoptosis induced by Fas ligand-expressing ovarian carcinoma cells: implications for altered expression of TCR in tumor-associated lymphocytes.
J Clin Invest 101: 2579-2588
- Ralph**, S.J., Thomas, M.L., Morton, C.C. and Trowbridge, I.S. (1987) Structural variants of human glycoprotein (leucocyte-common antigen).
The EMBO J 6: 1251-1257
- Rangel**, R., Rocha, L., Ramirez, J.L., Ibarra, M.J., Solorza, G., Monroy, A., Ramirez, M.A., Herrera, A. and Weiss-Steider B. (1995) Generation of memory CD4+, CD8+, CD45RO+ and CD16- lymphocytes activated with IL-2, INF-gamma, and TNF-alpha with specific cytotoxicity against autologous cervical cancer cells in a mixed leukocyte-tumour cell culture.
Eur Cytokine Netw 6: 195-202
- Rath**, A.V., Schmahl, G.E. and Niemeyer, C.M. (1997) Expression of transcription factors during sodium phenylacetate induced erythroid differentiation in K562 cells.
Blood cells Mol Dis 23: 27-38
- Raulet**, D.H. (1985) Expression and function of interleukin-2 receptors on immature thymocytes.
Nature 314: 101-303
- Reichert**, T.E., Day, R., Wagner, E.M. and Whiteside, T.L. (1998) Absent or low expression of the ζ chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma.
Cancer Res 58: 5344-5347
- Reinherz**, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. and Schlossmann, S.F. (1979) Further characterisation of the human inducer T-cell subset defined by a monoclonal antibody.
J Immunol 123: 2894-2896
- Reinherz**, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. and Schlossmann, S.F. (1980a) A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T-cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH₂.
J Immunol 124: 1301-1307
- Reinherz**, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H. and Schlossmann, S.F. (1980b) Discrete stages of human intrathymic differentiation.
Proc Natl Acad Sci USA 77: 1588-1592
- Reth**, M., Hombach, J., Wienands, J., Campbell, K.S., Chien, N., Justement, L.B. and Cambier, J.C. (1991) The B-cell antigen receptor complex.
Immunol Today 12: 196-201
- Romagnani**, S. (1991) Human T_H1 and T_H2 subsets: doubt no more.
Immunol Today 12: 256-257
- Rosenberg**, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., et al. (1990) Gene transfer into humans- immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction.
N Engl J Med 323: 570-578
- Rubin**, L.A. Kurman, C.C., Fritz, M.E., Biddison, W.E., Boutin, B., Yarchoan, R. and Nelson, D.L. (1985) soluble interleukin-2 receptor are released from activated human lymphoid cells in vitro.
J Immunol 135: 3172-3177
- Rubin**, L.A. and Nelson, D.L. (1990) The soluble interleukin-2 receptor: biology, function and clinical application.
Annals of internal medicine 113: 619-627

VII. Literaturverzeichnis

- Saito**, T., Kuss, I., Dworacki, G., Gooding, W., Johnson, J.T. and Whiteside, T.L (1999) Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer.
Clin Cancer Res 5: 1263-1273
- Sakihama**, T., Smolyar, A. and Reinherz, E.L. (1995) Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, MHC class II and TCR molecules.
Immunol Today 16: 581-587
- Samelson**, L.E., Phillips, A.F., Luong, E.T. and Klausner, R.D. (1990) Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor.
Proc Natl Acad Sci 87: 4358-4362
- Sanchez**, M.J., Muench, M.O., Roncarolo, M.G., Lanier, L.L. and Phillips J.H. (1994).
Identification of a common T/natural Killer cell progenitor in human fetal thymus.
J Exp Med 180: 569-576
- Schantz**, S.P., Campbell, B.H. and Guillaumondegul, O.M. (1986) Pharyngeal carcinoma and natural killer cell activity.
Am J Surg 152: 467-474
- Schantz**, S.P. and Liu, F.J. (1989a) An immunological profile of young adults with head and neck cancer.
Cancer 64: 1232-1237
- Schantz**, S.P., Savage, H.E., Racz, T., Liu, F.J., Brown, B.W., Rossen, R.D. and Hong, W.K. (1989b)
Immunologic determinants of head and neck cancer response to induction chemotherapy.
J Clin Oncol 7: 857-864
- Schipper**, J.H., Frixen, U.H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K. and Birchmeier, W. (1991) E-Cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis.
Cancer Res 51: 6328-6337
- Schmitz**, G. und Rothe, G. (1993) Anwendung der Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik .
DG Klinische Chemie Mitteilungen 24: 1-14
- Schmitz-Moormann**, P., Gebert, G. and Thomas, C. (1995) Allgemeine Pathologie.
Hrs Thomas, C. Shattauer, Stuttgart, New York
- Seigel**, L.J., Harper, M.E., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Nash, W.G. and O'Brien, S.J. (1984) Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1.
Science 223: 175-178
- Sharma**, S., Saha, K., Shinghal, R.N. and Malik, G.B. (1991) Serum soluble interleukin-2 (IL-2) receptor levels in women with breast carcinoma and ist correlation with IL-2 receptor expression on blood lymphocytes and lymphocytic infiltration within the tumour.
Cancer Immunol Immunother 33: 198-202
- Shaw**, S (1987) Characterization of human leukocyte differentiation antigens.
Immunol Today 8: 1-3
- Shi**, S.R., Cote, R.J. and Taylor, C.R. (1997) Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future.
J Histochem Cytochem 45: 327-343
- Smith**, S.H., Brown, M.H., Rowe, D., Callard, R.E. and Beverley, P.C.L. (1986) Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1.
Immunology 58: 63-70

VII. Literaturverzeichnis

- Snyderman**, C.H., Heo, D.S., Johnson, J.T., D'Amico, F., Barnes, L. and Whiteside, T.L. (1991) Functional and phenotypic analysis of lymphocytes in head and neck cancer.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 117: 899-905
- Somers**, K.D., Merrick, M.A., Lopez, M. E., Incognito, L.S., Schechter, G.L and Gasey, G. (1992) Frequent p53 Mutations in head and neck cancer.
Cancer Res 52: 5997-6000
- Spits**, H., Lanier, L.L. and Phillips, J.H.(1995) Development of human T und natural killer cells.
Blood 85: 2654-2670
- Spitz**, M.R. (1994) Epidemiology and risk factors for head and neck cancer.
Semin Oncol 21: 281-288
- Steel**, C.M. (1984) ed Disease Markers: Human MHC Class II Antigens: Genetics, structure and function.
Wiley, J. and Sons
- Stevens**, A. und Lowe, J. (1997) Pathologie pp. 35, pp. 37.
Ullstein Mosby, Berlin,Wiesbaden
- Streuli**, M., Matsuyama, T., Morimoto, C., Schlossmann, S.F. and Saito, H. (1987) Identification of the sequence required for expression of the 2H4 epitope on the human leucocyte common antigens.
J Exp Med 166: 1567-1572
- Streuli**, M., Morimoto, C., Schrieber, M., Schlossman, S.F. and Saito, H. (1988) Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leucocyte common antigens.
J Immunol 141: 3910-3914
- Strome**, M., Clarc, J.R., Fried, M., Rodliff and Blazer, B.A. (1987) T cell subsets and natural killer cell function with squamous cell carcinoma of the head and neck.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 113: 1090-1093
- Stupp**, R., Ralph, R., Weichselbaum, and Vokes, E.E. (1994) Combined modality therapy of head and neck cancer.
Semin Oncol 21: 349-358
- Stutman**, O (1978) Intrathymic and extrathymic, T-cell maturation.
Immunol Rev 42: 138-184
- Sussmann**, J.J., Bonifacino, J.S., Lippincott-Schwartz, J., Weissmann, A.M., Saito, T., Klausner, R.D. and Ashwell, J.D. (1988) Failure to synthesize the T cell CD3- ζ chain: Structure and function of a partial T cell receptor complex.
Cell 52: 85-95
- Svennevig**, J-L. and Svaar, H.(1979) Content and distribution of macrophages and Lymphocytes in solid malignant human tumors.
Int J Cancer 24: 754-758
- Swain**, S.L., Dutton, R.W., Schwab, R. and Yamamoto, J. (1983) Xenogeneic human anti-mouse T cell responses are due to the activity of the same functional T cell subsets responsible for allo-specific and major histocompatibility complex-restricted responses.
J Exp Med 157: 720-729
- Takeshita**, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kamaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M. and Sagamura, K. (1992) Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor.
Science 257: 379-382

VII. Literaturverzeichnis

- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., and Hamuro, J. (1983)** Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2.
Nature 302: 305-310
- Tartour, E., Deneux, L., Jaulerry, C., Brunin, F., Point, D., Validire, P., Dubray, B., Fridman, W.H and Rodriguez, J. (1997)** Soluble Interleukin-2 receptor serum level as a predictor of locoregional control and survival for patients with head and neck carcinoma.
Cancer 79: 1401-1408
- Tiggis, M.A., Casey, L.S. and Koshland, M.E. (1989)** Mechanism of interleukin-2 signaling: mediation of different outcomes by a single receptor and transduction pathway.
Science 243: 781-786
- Tisch, M., Heimlich, F., Daniel, V., Opelz, G. and Maier, H. (1998)** Cellular immune defect caused by postsurgical radiation therapy in patients with head and neck cancer.
Otolaryngol Head Neck Surg 119: 412-417
- Tisi, E., Lissoni, P., Angeli, M., Arrigoni, C., Corno, E., Cassina, E., Ballabio, D., Benenti, C., Barni, S. and Tancini, G. (1992)** Postoperative increase in soluble interleukin-2 receptor serum levels as predictor for early recurrence in non-small cell lung carcinoma.
Cancer 69: 2458-2462
- Trinchieri, G. (1989)** Biology of natural killer cells.
Adv Immunol 47: 187-376
- Trinchieri, G. (1998)** Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12.
Int Rev Immunol 16: 365-396
- Tsudo, M., Kozak, R.W., Goldman, C.K. and Waldmann, T.A. (1986)** Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: a potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex.
Proc Natl Acad Sci USA 83: 9694-9698
- Tsudo, M., Goldmann, C.K., Bongiovanni, K.F., Chan, W.C., Winton, E.F., Yangita, M., Grimm, E.A. and Waldmann, T.A. (1987)** The p75 peptide is the receptor for interleukin-2 expressed on large granular lymphocytes and is responsible for the interleukin-2 activation of these cells.
Proc Natl Acad Sci USA 84: 5394-5398
- Tuyns, A., Esteve, J., Raymond, L., Berrino, F., Benhamou, E., Blanchet, F., Boffetta, P., Crosignani, P., Del-Moral A.L., Merletti, F., Peguignot, G., Riboli, E., Sancho-Garnier, H., Terracini, B., Zubiri, A. and Zubiri, L. (1988)** Cancer of the larynx/ hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France).
Int J Cancer 41: 483-491
- Uchiyama, T., Broder, S. and Waldmann, T.A. (1981)** A monoklonal antibody (anti-Tac) reactive and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells.
J Immunol 126: 1393-1397
- UICC (1987)** TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Hermanek, P., Scheibe, O., Spiessl, B. und Wagner, G. (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg- New York-London-Paris-Tokyo
- Van Noesel, C.J.M., Borst, J., De Vries, E.F.R. and Van Lier, R.A.W. (1990)** Identification of two distinct phosphoproteins as components of the human B cell antigen receptor complex.
Eur J Immunol 20: 2789-2793
- Venkitaraman, A.R., Williams, G.T. and Dariavach, P. (1991)** The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes.
Nature 352: 777-781

VII. Literaturverzeichnis

- Vetto**, J.T., Lum, S., Morris, A., Sicotte, M., Davis, J., Lemon, M. and Weinberg A. (1997) Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers.
Am J Surg 174: 258-265
- Virgilio**, L., Shuster, M., Gollin, S.M., Veronese, M.L., Ohta, M., Huebner, K. and Croce, C.M. (1996) FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas.
Proc Natl Acad Sci 93: 9770-9775
- Vitolo**, D., Kanbour, A., Johnson, J.T., Herberman, R.B. and Whiteside, T.L. (1993) In situ hybridisation for cytokine gene transcripts in the solid tumour microenvironment.
Eur J Cancer 29A: 371-377
- Vokes**, E (1993) Interactions of chemotherapy and radiation.
Semin Oncol 20: 70-79
- Volgmann**, T., Klein-Struckmeier, A. and Mohr, H. (1989) A fluorescence-based assay for quantitation of lymphokine-activated killer cell activity.
J Immunol Methods 119: 45-51
- Von Zons**, P., Crowley-Nowick, P., Friberg, D., Bell, M., Koldovsky, U. and Whiteside, T.L. (1997) Comparison of europium and chromium release assays: cytotoxicity in healthy individuals and patients with cervical carcinoma.
Clin Diagn Lab Immunol 4: 202-207
- Vose**, B.M. and Moore, M. (1985) Human tumor-infiltrating lymphocytes: A marker of host response.
Semin Hematol 22: 27-40
- Waldmann**, T.A., Goldman, C.K., Robb, R.J., Depper, J.M., Leonard, W.J., Sharrow, S.O., Bongiovanni, K.F., Korsmeyer, S.J. and Greene, W.C (1984) Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells.
J Exp Med 160: 1450-1466
- Waldmann**, T.A.(1986) The structure, function, and expression of interleukin-2 receptor on normal and malignant lymphocytes.
Science 232: 727-732
- Waldmann**, T.A.(1991) The interleukin-2 receptor.
J Biol Chem 266: 2681-2684
- Waldmann**, T., Tagaya, Y. and Bamford, R. (1998) Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors.
Int Rev Immunol 16: 205- 226
- Weidmann**, E., Sacchi, M., Plaisance, Seog Heo, D., Yasumura, S., Lin, W-C., Johnson, J.T., Herberman, R.B., Azzarone, B. and Whiteside, T (1992) receptor for interleukin 2 on squamous cell carcinoma cell lines and tumor in situ.
Cancer Res 52: 5963-5970
- Weissmann**, A.M., Samelson, L.E. and Klausner, R.D. (1986) A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex.
Nature 324: 480-482
- Westermann**, J. and Pabst , R. (1990) Lymphocytes subsets in the blood : a diagnostic window on the lymphoid system?
Immunol Today 11: 406-409
- Westermann**, J. and Pabst , R. (1992) Distribution of lymphocytes subsets and natural killer cells in the human body.
Clin Investing 70: 539-544

VII. Literaturverzeichnis

- Westphal**, J.R., Willems, H.W., Ruiters, D.J. and De Waal, R.M. (1993) Involvement of LFA- 1/ICAM and CD2/LFA-3 in human endothelial cell accessory function. Behring Inst Mitt (92): 51-62
- Whiteside**, T.L. (1999) Signal defects in T-lymphocytes of patients with malignancy. Cancer Immunol Immunother 48: 346-352
- Williams**, A.F. and Barclay, A.N. (1988) The Immunoglobulin superfamily- domains for cell surface recognition. Ann Rev Immunol 6: 381-405
- Wingren**, A.G., Parra, E., Varga, M., Kalland, T., Sjogren, H.O., Hedlund, G. and Dohlsten, M. (1995) T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. Crit Rev Immunol 15: 235-253
- Wolf**, G.T., Hudson, J.L., Peterson, K.A., Miller, H.L and McClatchey, K.D. (1986) Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent of tumor and prognosis. Otolaryngol Head Neck Surg 95: 142-152
- Wolf**, G.T., Schmaltz, S., Hudson, J., Robson, H., Stackhouse, T., Peterson, K.A., Poore, J.A. and McClatchey, K.D. (1987) Alterations in T-lymphocyte subpopulations in patients with head and neck cancer. Correlations with prognosis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 113: 1200-1206
- Wustrow**, T.P.U. and Zenner, HP.(1985) Natural killer cell activity in patients with carcinoma of the larynx and hypopharynx. Laryngoscope 95: 1391-1399
- Wustrow**, T.P. and Kabelitz, D. (1989) Interleukin-2 release from lymphocytes of patients with head and neck cancer. Ann Otol Rhinol Laryngol 98: 179-184
- Wustrow**, T.P.U. (1995) Grundlagen immunologischer Vorgänge beim Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich-Diagnostik und Ursachen. Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl: pp. 220-294
- Yanagi**, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S.P., Aleksander, I. and Mak, T.W. (1984) A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. Nature 308: 145-149
- Yasumura**, S., Lin, W.C., Weidmann, E., Hebda, P. and Whiteside, T.L. (1994) Expression of interleukin-2 receptor on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin-2. Int J Cancer 59: 225-234

Standardkurve zur Bestimmung vom IL-2 Protein und löslichen IL-2Ra

Standardkurve für IL-2 Protein

Extinktion (A)	Konzentration (B) pg/ml
0,053	62,5
0,080	125
0,120	250
0,204	500
0,382	1000
0,840	2000

Standarkurve für lösliche IL-2Ra

1. Versuch

Extinktion (A)	Konzentration (B) U/ml
0,0105	100
0,046	360
0,129	740
0,318	1680
0,734	3100

2. Versuch

Extinktion (A)	Konzentration (B) U/ml
0,038	110
0,167	410
0,433	860
0,832	1740
1,603	3150

3. Versuch

Extinktion (A)	Konzentration (B) U/ml
0,0095	110
0,058	400
0,1445	830
0,374	1740
0,823	2940

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Träger, der mir die Möglichkeit gab, am Zentrum der Biologischen Chemie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main zu promovieren. Für seine immer freundliche und in jeder Hinsicht hilfreiche Unterstützung, für zahlreiche anregende Diskussionen, für seine jederzeit fundierte und konstruktive Kritik.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Brendel für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie, dessen Seminare mir für meine Doktorarbeit Motivation und Ideen lieferten.

Bei Frau Dr. B. Donnerstag bedanke ich mich für die Überlassung des Themas.

Herrn PD Dr. R. Knecht bin ich tief verbunden für die sehr gute Zusammenarbeit, für die Bereitstellung der Patientenproben und für zahlreiche kompetente Anregungen zur Erhellung klinischer Aspekte.

Allen meinen Kollegen und Kolleginnen am Zentrum der Biologischen Chemie, mit denen ich Höhen und Tiefen des Forschungsalltags teilte, danke ich für kooperative Zusammenarbeit, die anregenden fruchtbaren fachlichen Diskussionen und das nette Arbeitsklima.

Ein Dankeschön geht an die medizinisch-technischen Assistenten Frau B. Wittke, Frau C. Göbel, Frau A. Diehl, Frau E. Weit und Frau H. Baumann für die praktische Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders herzlich möchte ich zwei lieben Freunden und Kollegen, V. Buchta und D. Henrich danken für die Geduld, die sie mir bei der Abfassung dieser Arbeit entgegenbrachten und für die kritische Lektüre und Verbesserungsvorschläge. Schließlich gilt mein ausdrücklicher Dank mit dieser Arbeit meinem Freund und Partner Dirk Henrich für seine in jeder Hinsicht verständnisvolle Unterstützung, die mich vor allem nie aufgeben ließ.

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Frankfurt am Main, den 06.08.2001

LEBENS LAUF

Name: Penna Martinez
Vornamen: Marissa Susana
Geburtsdatum: 19.06.1962
Geburtsort: Valparaiso/Chile
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULISCHER WERDEGANG

1969 - 1974 Grundschule in Vina del Mar/ Chile
1975 Hauptschule Schule Nr.13 in Talca/ Chile
1975 - 1976 Hauptschule Friedrich-Stolze-Schule in Frankfurt/ M
1976 - 1983 Gesamtschule Ernst-Reuter-Schule in Frankfurt/ M
mit Abschluß Abitur: Note *gut*

AKADEMISCHER WERDEGANG

1983 Aufnahme des Studiums der Biologie an der Johann
Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/ M
1986 Vordiplom in den Fächern:
Zoologie, Botanik, Chemie und Physik
1986 Hauptstudium mit folgenden Schwerpunkten:
Hauptfach: Humangenetik und Anthropologie
Nebenfächer: Zoologie und Anatomie
1990 Beginn der Diplomarbeit mit dem Thema:
Isolierung und Kultivierung von lymphoiden Zellen mit
bestimmten Oberflächenrezeptoren
Betreuer: **Dr. J. Cinatl**
Sept 1991 Abschluß des Diplom-Studiums mit der Note *sehr gut*
Juli 1993 Aufnahme des Promotionsstudiums an der J.W.Goethe Universität im
Fachbereich Biologie mit dem Arbeitstitel:
Untersuchung zellulärer und humoraler Immunparameter bei Patienten
mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich in Abhängigkeit
von Tumorstadium und Therapieform
Betreuer: **Prof. Dr. M. Brendel und Prof. Dr. L. Träger**

BERUFLICHER WERDEGANG

- 1987 **Studentische Hilfskraft**, zuständig für die Literaturrecherche bei **Prof. Dr. med. H. Braak** (Zentrum der Morphologie)
- Okt/Nov 1989 **Studentische Hilfskraft**, zuständig für die Organisation der Führungen bei der Senckenberg Naturforschungsgesellschaft
- 1990 **Studentische Hilfskraft**, zuständig für die Vorbereitung von Zellkulturen für Routineuntersuchungen bei **Prof. Dr. med. H. W. Doerr** (Zentrum der Hygiene)
- seit Okt 1992 **Dozentin für Zytologie und Histologie** in der Krankenpflegeschule der Schwesternschaft vom Roten Kreuz
- April/Mai 1993 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Zentrum der Hygiene, Abt. Med. Virologie**, zuständig für die Isolierung von HIV-Patientenisolaten, Etablierung biologischer Testsysteme zur Charakterisierung therapieresistenter HIV-Viren bei **Prof. Dr. med. H. W. Doerr**
- seit Juli 1993 **Wochenend- und Feiertagsdienste im Krankenhauslabor GmbH** der Kliniken des Hochtaunuskreises Bad Homburg, zuständig für Routine Untersuchungen
- seit 1994 **Mitglied der Gesellschaft für Immunologie**
- 21.-24. Sept 1994 **Teilnahme**: 25. Jahrestagung der Gesellschaft für Immunologie, Universität Konstanz
- 7.-11. März 1994 **Teilnahme**: 21. Deutscher Krebskongreß, Hamburg
- Okt 1993 - Febr 1995 **Dozentin in dem Fächern Anatomie, Physiologie** in der Krankenpflegeschule St. Markus-Krankenhaus
- 3.- 4. Juni 1996 **Teilnahme**: Tagung „Anwendung der Durchflußzytometrie“ Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- April/Juli 1997 **Dozentin im Fach Immunologie** an der staatl. Lehranstalt der Uni-Klinik, Frankfurt/ M
- Okt 1998 **Aushilftätigkeit in der Praxis für pädiatrische Endokrinologie**, zuständig für die quantitative Bestimmung von Hormonparameter mittels Immulite, bei **Priv. Dov. Dr. K. Hartmann**
30. Sept - 2.Okt **Teilnahme: Laborseminar PCR**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- seit Januar 1999 **Mitglied der Robert-Koch-Stiftung**
29. - 30. April 1999 **Teilnahme: Seminar, Quantitative PCR,**
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- ab Mai 1999 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Zentrum der Innere
Medizin, Abt. Endokrinologie,** zuständig für Etablierung
und Arbeit an verschiedenen Zellkultursystemen, Immunhisto-
chemie, Evaluierung von Labormethoden zur Diagnostik von
Autoimmunerkrankungen bei Frau **Prof. Dr. med. P.-M.
Schumm-Draeger**
03. - 05. Mai 2000 **Teilnahme: Fortbildungsveranstaltung gemäß § 15 GenTSV
mit dem Thema „Gentechnikrecht“**
veranstaltet von der DECHEMA e.V., Frankfurt am Main in
Karl-Winnacker-Institut
- seit Sept 2000 **Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie**

Veröffentlichungen

M. Penna-Martinez

Isolierung und Kultivierung von lymphoiden Zellen mit bestimmten Oberflächenrezeptoren (1993)

Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt /M

M. Penna-Martinez, B. Donnerstag, R. Knecht, L.Träger, C. v. Ilberg (1994)

Charakterisierung der Lymphozyten-Populationen von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes.

VIII. Arbeitstagung „Anwendung der Durchflußzytometrie in der Klinischen Zelldiagnostik“ Regensburg, Abstraktband S. 40

B. Donnerstag, R. Knecht, M. Penna-Martinez and C. v. Ilberg (1994)

Evaluation of the immunological stage in patients with head and neck cancer

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120 Suppl. : 130

M. Penna-Martinez, M. Skierlo, B. Donnerstag, R. P. Baum, R. Knecht, G. Hör, C. v. Ilberg

Evaluation of Interleukin-2 levels in the sera of Patients with head and neck cancer and ovarian cancer

XVI International Cancer Congress New Delhi, abstract

B. Donnerstag, R. Knecht, M. Penna-Martinez, L.Träger (1994)

Immunologische Profil von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen- I. Methodik

Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie Jahresversammlung in Chemnitz, Vortrag

R. Knecht, B. Donnerstag, M. Penna-Martinez, C. v. Ilberg (1994)

Immunologische Profil von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen- II. Klinik

Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie Jahresversammlung in Chemnitz, Vortrag

M. Penna-Martinez, B. Donnerstag, R. Knecht, L. Träger, C .v .Ilberg (1994)

Interleukin-2 Spiegel im Serum von Patienten mit HNO-Plattenepithelkarzinome

Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie Jahresversammlung in Chemnitz, Poster und Vortrag

M. Penna-Martinez, G. Caspar, K.H.Usadel, P.-M.Schumm-Draeger (1999)

Untersuchungen zur Expression von TSH-Rezeptoren in Thyrozytenzellkulturen

15. Arbeitstagung experimentelle Schilddrüsenforschung Berlin, Vortrag

M. Penna-Martinez, G. Caspar, K. H. Usadel, P.-M. Schumm-Draeger (2000)

Expression of TSH-receptor in cultured cells from benign thyroid tissue

Experimental and Clinical Endocrinology Suppl. 1: 145

M. Penna-Martinez, G. Caspar, K. H. Usadel, P.-M. Schumm-Draeger (2000)

Determination of TSH-receptor in cultured cells from benign thyroid tissue using RT-PCR

The Endocrine Society's 82nd Annual Meeting in Toronto, Abstraktband S. 386

G. Caspar, W. Joba, **M. Penna-Martinez**, A. E. Heufelder, J. Morris, P.-M. Schumm-Draeger (1999)

Untersuchungen zur Expression von NIS (Natrium-Iodid-Symporter) am Schilddrüsentransplantat im Xenotransplantationsmodell der thymusaplastischen Nacktmaus

15. Arbeitstagung experimentelle Schilddrüsenforschung Berlin, Vortrag

G. Caspar, W. Joba, **M. Penna-Martinez**, K. Jungheim, J. C. Morris, A.E. Heufelder, P.M. Schumm-Draeger (2000)

Sodium-Iodide-Symporter expression in xenotransplanted thyroid tissue

Experimental and Clinical Endocrinology Suppl. 1: 51

G. Caspar, K. Jungheim, **M. Penna-Martinez**, M. Kock, K.H. Usadel, P.-M. Schumm-Draeger (2000) Boosting of lymphocyte homing and characteristic autoimmune feature in xenotransplanted thyroid tissue by prestimulation with Graves' sera

Experimental and Clinical Endocrinology Suppl. 1: 105

G. Caspar, K. Jungheim, **M. Penna-Martinez**, K. H. Usadel, P.-M. Schumm-Draeger (2000) Prestimulation with graves' sera enhances lymphocyte homing and characteristic autoimmune features in xenotransplanted thyroid tissue

The Endocrine Society's 82nd Annual Meeting Toronto, Abstraktband S. 586

G. Caspar, W. Joba, **M. Penna-Martinez**, K. Jungheim, J.C. Morris, A.E. Heufelder, P. M. Schumm-Draeger (2000)

Expression of sodium-iodine-symporter in human thyroid xenotransplants

The Endocrine Society's 82nd Annual Meeting Toronto, Abstraktband S. 591

K. Jungheim, G. Caspar, **M. Penna-Martinez**, M. Kock, K. H. Usadel, P.-M. Schumm-Draeger (2000) Inhibition of lymphocyte homing, characteristic for thyroid autoimmune disease in xenotransplanted thyroid tissue by LFA-1 and ICAM-1-antibodies

Experimental and Clinical Endocrinology Suppl. 1: 105

K. Jungheim, G. Caspar, **M. Penna-Martinez**, K.H. Usadel, P.-M. Schumm-Draeger (2000) Inhibition of lymphocyte homing in xenotransplanted thyroid tissue by LFA-1 and ICAM-1-autoantibodies

The Endocrine Society's 82nd Annual Meeting Toronto, Abstraktband S. 586

G. Caspar, W. Joba, **M. Penna-Martinez**, K. Jungheim, A.E. Heufelder, P.-M. Schumm-Draeger (2001)

Expression des Natrium-Jodid-Symporters bei M. Basedow: Stimulation von Schilddrüsentransplantaten durch Basedow-Seren und Basedow-Lymphozyten

45th Annual Meeting of the German Society of Endocrinology Magdeburg, Poster

G. Caspar, W. Joba, **M. Penna-Martinez**, K. Jungheim, K.H. Usadel, A.E. Heufelder, P.-M. Schumm-Draeger (2001)

Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1/LFA-1) durch spezifische Antikörper vermindert die Expression des Natrium-Jodid-Symporters (NIS)

45th Annual Meeting of the German Society of Endocrinology Magdeburg, Vortrag

M. Penna-Martinez, G. Caspar, K.H. Usadel, P.-M. Schumm-Draeger (2001)

Expression of thyroid specific genes in cultured cells from benign thyroid tissue

27th Annual meeting of European Thyroid Association Warschau, Poster